



HAL
open science

Rôle du récepteur nucléaire FXR dans la régulation de la production de GLP-1 : nouvelle cible thérapeutique dans le traitement du diabète de type 2 ?

Mohamed-Sami Trabelsi

► **To cite this version:**

Mohamed-Sami Trabelsi. Rôle du récepteur nucléaire FXR dans la régulation de la production de GLP-1 : nouvelle cible thérapeutique dans le traitement du diabète de type 2 ?. Médecine humaine et pathologie. Université du Droit et de la Santé - Lille II, 2015. Français. NNT : 2015LIL2S012 . tel-01261544

HAL Id: tel-01261544

<https://theses.hal.science/tel-01261544>

Submitted on 25 Jan 2016

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

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

UNIVERSITE LILLE 2 DROIT ET SANTE
Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

THESE

pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LILLE 2

Discipline : Aspects Moléculaires et Cellulaires de la Biologie
Spécialité : Biochimie, Physiologie et Biologie Cellulaire

Présentée par

Mohamed-Sami TRABELSI

**Rôle du récepteur nucléaire FXR dans la régulation de
la production de GLP-1 : nouvelle cible thérapeutique
dans le traitement du diabète de type 2 ?**

Soutenue publiquement le
1^{er} avril 2015

Devant le jury composé de:

Pr. Bart STAELS
Pr. Nathalie DELZENNE
Pr. Christophe MAGNAN
Dr. Xavier COLLET
Pr. Sophie LESTAVEL

Président du jury
Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Directrice de thèse

Unité INSERM U1011
Université Lille 2 Droit et Santé – Institut Pasteur de Lille

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier le Professeur Bart STAELS pour m'avoir accueilli au sein de son unité pendant ses quatre ans et demi (en comptant le Master 2) ainsi que pour l'aide qu'il m'a apportée.

Je remercie Madame le Professeur Nathalie DELZENNE et Monsieur le Professeur Christophe MAGNAN d'avoir accepté d'être les rapporteurs de mon travail de thèse.

Je tiens aussi à remercier le Docteur Xavier COLLET pour avoir bien voulu participer à mon jury de thèse ainsi que pour le temps qu'il m'a consacré lors de ma venue à Toulouse.

Je tiens également à vivement remercier le Professeur Sophie LESTAVEL pour avoir su faire preuve de patience et de grande pédagogie à mon égard. Merci pour la rigueur et pour le goût de la recherche que vous m'avez transmis. Sophie, ces années m'ont appris beaucoup sur moi-même et sur les autres, cela est en grande partie grâce à vous.

Véronique, sache que ton aide et ton écoute m'ont été essentielles pour gérer de manière plus sereine ces années de doctorat pleines de pression et parfois de désillusions. Heureusement que tu étais là !

A Olivier, merci pour les instants de travail et de détente passés ensemble. Ce fut une joie d'être ton voisin de paillasse ces quelques années.

Camille et Sarah, vous reprenez le flambeau des 'thésards' du groupe intestin et je sais que vous le porterez bien haut. Camille, arrête les Welch, ce n'est pas sain (bon je te l'accorde, c'est vrai que c'est délicieux). Tu testes quand la tomate ?!. Sarah, les manip enfermés à Pasteur jusqu'à minuit en train de couper de l'intestin resteront comme un souvenir mémorable de ma thèse... De plus, les éclats de rire partagés seront encore longtemps dans mes pensées. Enfin les filles, bon courage et tenez bon !!!

Valeria !!! Pas la peine de trop m'étendre ici, tu sais que tu es une amie. On reste en contact. Bon courage à toi aussi !

Alors chère Dr. De Paoli... En ta compagnie et celle de Valeria, j'ai vraiment aimé partager ma thèse. Nos discussions sur le monde et la science (et nos soirées...) furent parmi les meilleures. A quand la prochaine ? OK, je t'ai poussé à faire du saut à l'élastique, mais pourquoi veux-tu te venger en m'obligeant à sauter du haut d'un avion ?! (PS. : sache que c'est quand tu veux :)). Tu resteras longtemps une amie chère.

A Nabil, Sarah, Wahiba, Michal, Racha, Aline... Un grand merci pour m'avoir soutenu et supporté durant ces années ! A bientôt !

Hélène, ton écoute et tes conseils m'ont également été précieux. Merci !

Je remercie également les Anciens (Michal, Wahiba, Sarah,...) et les doctorants 'en cours' (Maheul, Claire, Guillaume Le Flamand et Yann Le Breton) d'être qui ils sont. Tenez bon !

Lise et Marianne, je vous aime.

Kalim, Kamel et Rémi, nos soirées bowling furent mémorables. Promis, je m'entraîne et la prochaine fois ce sera à vous de payer la tournée.

Mes frères, je tiens également à vous remercier pour votre soutien inconditionnel. Tous les bons moments qu'on a partagé ensemble m'ont aidé et m'aiderons à rester qui je suis.

Enfin, je tenais plus particulièrement à remercier mes parents, sans qui rien n'aurait été possible. Quoique bateau, cette formule résume bien tous les sacrifices réalisés depuis mon enfance pour me permettre aujourd'hui d'être l'homme que je suis. Papa, si dès le départ j'ai bossé autant, c'était pour te ressembler. Je me rappelais des soirs où, moi enfant, tu rentrais de Belgique à 22h, épuisé pour repartir avant notre réveil. Tu as toujours été là pour nous et tu l'es encore aujourd'hui. Maman, je t'aime, tu es la prunelle de mes yeux.

Qu'à jamais on reste une famille unie.

SOMMAIRE

AVANT-PROPOS.....	11
INTRODUCTION.....	14
PARTIE I : L'intestin est le plus grand organe endocrine de l'organisme	14
A) Anatomie de l'intestin	14
1) Structure du tractus gastro-intestinal	14
2) Embryologie et histologie de l'intestin.....	15
3) Renouvellement et différenciation de l'épithélium intestinal.....	16
B) Différenciation et importance physiologique des cellules entéroendocrines.....	17
1) Localisation et fonctions physiologiques des cellules entéroendocrines	17
a) Les cellules entéroendocrines de type X/A-like sécrétrices de ghréline.....	17
b) Les cellules entéroendocrines de type G sécrétrices de gastrine	18
c) Les cellules entéroendocrines de type EC sécrétrices de sérotonine	19
d) Les cellules entéroendocrines de type I sécrétrices de cholécystokinine.....	20
e) Les cellules entéroendocrines de type S sécrétrices de sécrétine.....	21
f) Les cellules entéroendocrines de type K sécrétrices de GIP	21
g) Les cellules entéroendocrines de type L sécrétrices de GLP-1	22
h) Les autres types de cellules entéroendocrines.....	23
i) Révision du dogme une cellule entéroendocrine / un peptide.....	24
2) Différenciation des cellules entéroendocrines.....	24
PARTIE II : Régulation du métabolisme énergétique <i>via</i> la sécrétion de l'incrétine GLP-1 par les cellules L.....	26
A) Modèles d'études	26
B) Régulation de la transcription du proglucagon par le glucose.....	28
1) Structure du promoteur du proglucagon	29
2) Régulation de l'activité du promoteur du proglucagon dans le pancréas et dans l'intestin	29
3) Régulation de la transcription du proglucagon par le glucose.....	30

C) Le glucose est un sécrétagogue de GLP-1.....	31
1) Les sécrétagogues de GLP-1	31
2) Sécrétion de GLP-1 en réponse au glucose	31
a) Récepteurs au goût sucré et sécrétion de GLP-1 en réponse au glucose	31
b) Transport de glucose et sécrétion de GLP-1	32
3) Vers un compromis ?	34
D) Rôles physiologiques de GLP-1	35
1) Le récepteur au GLP-1	35
2) Effets pléiotropes de GLP-1	36
a) Effets pancréatiques de GLP-1	36
b) Effets de GLP-1 <i>via</i> le système nerveux central (SNC)	38
c) Effets de GLP-1 sur la sensibilité à l'insuline	40
d) Effets du GLP-1 sur le système cardiovasculaire	40
E) Importance thérapeutique de la voie de GLP-1	41
1) Les analogues de GLP-1.....	42
2) Les inhibiteurs de DPP-4.....	43
3) Quelques molécules prometteuses.....	43
a) Les inhibiteurs de SGLT1	43
b) Les inhibiteurs d' α -glucosidases.....	44
 PARTIE III : Les acides biliaires sont des molécules régulatrices de l'homéostasie énergétique <i>via</i> le récepteur membranaire TGR5.....	
45	
A) Synthèse et recyclage des acides biliaires	45
1) Synthèse des acides biliaires	45
2) Recyclage des acides biliaires <i>via</i> la circulation entérohépatique.....	46
B) Le récepteur membranaire des acides biliaires TGR5	47
1) Expression tissulaire et fonctions de TGR5	47
2) Mécanismes d'action de TGR5 sur la production de GLP-1 par la cellule L.....	47
3) TGR5 et régulation homéostatique.....	48
a) TGR5 et métabolisme des acides biliaires.....	48
b) TGR5 et dépense énergétique	48
c) TGR5 et régulation du métabolisme lipidique	48

PARTIE IV : Le récepteur nucléaire FXR.....	49
A) Généralités sur les récepteurs nucléaires.....	49
1) Structure des récepteurs nucléaires.....	49
2) Classification des récepteurs nucléaires.....	50
a) Classification phylogénétique.....	50
b) Classification de Mangelsdorf.....	50
c) Classification physiologique.....	51
3) Mode de fonctionnement des récepteurs nucléaires.....	52
a) Transactivation.....	52
b) Transrépression.....	52
B) Le récepteur nucléaire des acides biliaires FXR.....	53
1) Expression tissulaire et isoformes de FXR.....	53
2) Ligands et fonctionnement de FXR.....	54
a) Les ligands naturels de FXR.....	54
b) Les ligands synthétiques de FXR.....	54
3) Rôle de FXR dans la régulation de l'homéostasie énergétique.....	55
a) FXR et régulation du métabolisme des acides biliaires.....	55
b) FXR et régulation du métabolisme lipidique.....	56
c) FXR et régulation du métabolisme du glucose.....	58
C) Comment la modulation de la voie des acides biliaires dans l'intestin peut être une cible thérapeutique pour soigner le diabète de type 2.....	59
1) Les résines séquestrantes des acides biliaires.....	59
2) Modulation des acides biliaires par un prébiotique.....	61
3) D'autres molécules ciblant la voie des acides biliaires.....	61
a) Les inhibiteurs de ASBT.....	62
b) Les inhibiteurs d' α -glucosidase.....	62
OBJECTIFS.....	64
RESULTATS.....	67
DISCUSSION-PERSPECTIVES.....	100
BIBLIOGRAPHIE.....	126

AVANT-PROPOS

AVANT-PROPOS

L'homéostasie énergétique ou 'balance énergétique' est l'équilibre qui s'établit chez l'Homme et l'animal adulte entre la prise quotidienne de nutriments sous la forme de glucides, de lipides ou de protéines et leur oxydation pour ne produire que la quantité énergétique strictement nécessaire. Pour maintenir cette balance, l'organisme doit recueillir en permanence des signaux nerveux, métaboliques ou hormonaux de la part de cellules spécifiques. Ces senseurs des besoins énergétiques transmettent alors à des centres régulateurs leurs informations qui en retour, par voie hormonale ou nerveuse, informent les organes effecteurs des mesures à prendre pour stocker, produire ou consommer l'énergie. Les trois principaux centres de cette balance sont 1/ un centre senseur de la qualité et de la quantité des aliments, le tractus gastrointestinal ; 2/ le cerveau, centre intégrateur de l'information et 3/ un groupe d'organes effecteurs parmi lesquels le foie, le tissu adipeux, les muscles squelettiques, le pancréas) (Migrenne *et al.* 2006) **FIGURE 1**. En plus d'être la source d'énergie nécessaire à la vie des cellules, les nutriments tels que les acides gras, le cholestérol ou encore le glucose sont aussi des molécules de signalisation cellulaire à la fois par leur fixation à des récepteurs membranaires mais aussi *via* des récepteurs nucléaires. Un déséquilibre dans l'homéostasie énergétique dû à une alimentation déséquilibrée, à un manque d'exercice physique ou à des facteurs génétiques est une caractéristique de l'obésité et de complications telles que le diabète de type 2 et les maladies cardiovasculaires (Hill *et al.* 2006).

Au cours de ma thèse je me suis intéressé à l'intestin pour son rôle de régulateur de l'homéostasie énergétique *via* sa capacité à sécréter l'incrétine Glucagon-Like Peptide-1 (GLP-1) en réponse au glucose et aux acides biliaires dans des contextes physiologiques ou physiopathologiques d'obésité. J'ai étudié plus particulièrement le rôle du récepteur nucléaire FXR en tant que senseur moléculaire des acides biliaires dans les cellules L sécrétrices de cette incrétine car jusqu'à maintenant rien n'était rapporté quant à son rôle ni même quant à son expression dans les cellules L.

Pour cela, j'ai utilisé des lignées cellulaires murines et humaines où j'ai mis au point les conditions expérimentales pour répondre aux questions posées. Grâce à différents modèles de souris transgéniques ou non, nous avons pu étudier si ces effets se retrouvaient chez la souris. Parmi ces modèles, 3 sont le fruit de collaborations européennes (avec l'équipe du Professeur Fiona Gribble, Cambridge, Royaume-Uni, avec l'équipe du Professeur Kristina Schoonjans, Lausanne, Suisse et avec l'équipe du Professeur Fredrik Bäckhed, Goteborg, Suède). Enfin, grâce à une collaboration avec l'équipe du Professeur

François Pattou (UMR INSERM U859, Lille), la relevance chez l'Homme de ces résultats sur des biopsies intestinales a pu être testée. L'ensemble de ce travail de thèse m'a permis de participer à différents congrès nationaux et internationaux où j'ai eu l'opportunité de présenter mes travaux.

INTRODUCTION

INTRODUCTION

PARTIE I : L'intestin est le plus grand organe endocrine de l'organisme

Longtemps considéré uniquement pour son rôle absorbant, l'intestin est maintenant reconnu comme un organe métabolique majeur capable de sentir la qualité et la quantité des aliments et d'émettre des signaux mécaniques, nerveux ou hormonaux pour réguler la prise alimentaire (**FIGURE 1**). Dans l'intestin, la majorité des signaux hormonaux sont émis par une population cellulaire spécifique : les cellules entéroendocrines. Ces cellules sont essentielles au maintien de l'homéostasie énergétique (Mellitzer *et al.* 2010, Pedersen *et al.* 2013). La première observation d'un rôle de l'intestin sur le métabolisme énergétique dans des conditions physiopathologiques fut faite par Benjamin Moore en 1906. Ce biochimiste Anglais administra par voie orale à 3 patients diabétiques des extraits de muqueuse duodénale de cochon et observa une disparition des polyuries et glycosuries, disparition qui se prolongeait après arrêt du traitement (Moore 1906). Quoique empirique, cette observation montra 16 ans avant la découverte de l'insuline par Banting et Best (Banting *et al.* 1922) que certaines substances de la muqueuse intestinale peuvent être bénéfiques pour traiter le diabète de type 2 (**FIGURE 2**). Ce n'est que depuis moins d'un siècle que les progrès en biologie cellulaire et moléculaire ont permis d'identifier les peptides bio-actifs sécrétés par les cellules endocrines de l'intestin ainsi que leur fonctionnement (Mellitzer *et al.* 2010, Pedersen *et al.* 2013).

A) Anatomie de l'intestin

1) Structure du tractus gastro-intestinal

Anatomiquement, le tractus gastro-intestinal peut être divisé en 2 parties. Le tractus gastro-intestinal supérieur allant des lèvres au ligament de Treitz du duodénum et le tractus gastro-intestinal inférieur allant de la fin du duodénum à l'anus. Le tractus gastro-intestinal inférieur est divisé en 2 parties anatomiques distinctes : l'intestin grêle (4 à 6m chez l'Homme adulte, 10 à 15 m chez le mini-cochon et 30 cm chez la souris), constitué de la fin du duodénum, du jéjunum et de l'iléon ; et le gros intestin (2 m environ chez l'Homme adulte, 6 à 7 m chez le mini-cochon et 6 à 7 cm chez la souris) qui comprend le cæcum, l'appendice, le colon (ascendant, médian et descendant), le rectum et le canal anal. Cette longueur mais aussi le repliement de la muqueuse épithéliale en villosités ainsi que la présence de microvillosités à l'apex des entérocytes confèrent à l'intestin une surface absorbante de 40 m² soit la taille d'un demi-terrain de badminton (chiffres révisés par Helander *et al.* 2014) (**FIGURE 3**).

2) Embryologie et histologie de l'intestin

D'un point de vue développemental, 3 structures endodermes sont à l'origine du tractus digestif : l'intestin primitif antérieur, moyen et postérieur. L'intestin primitif antérieur (« hindgut » en anglais) donne le fond de la cavité buccale, le pharynx, l'appareil respiratoire, l'œsophage, l'estomac et le duodénum. Une excroissance du plancher du duodénum, le diverticule hépatique, conduit à la formation de l'épithélium glandulaire du foie. À partir de cet épithélium, une autre excroissance produit l'épithélium tapissant la vésicule biliaire. Chez l'Homme, vers le trentième jour de développement embryonnaire, une prolifération du toit du duodénum donne les bourgeons pancréatiques dorsaux et ventraux qui fusionneront à la sixième semaine pour donner le pancréas. L'intestin primitif moyen (ou « midgut »), en contact permanent avec la vésicule ombilicale par l'intermédiaire du canal vitellin, donne le duodénum terminal, le jéjunum, l'iléon, le cæcum et les 2/3 du colon transverse. Enfin, l'intestin primitif postérieur (ou « foregut ») est à l'origine du 1/3 distal du colon transverse, du colon descendant et sigmoïde, du rectum et des 2/3 supérieurs du canal anal. Il est à noter que les termes « hindgut », « midgut » et « foregut » sont encore utilisés dans la littérature pour désigner les parties proximales, médiales et distales de l'intestin adulte chez la souris.

D'un point de vue histologique, l'intestin est un cylindre sous-divisé en 4 tuniques concentriques (**FIGURE 3**). De la partie la plus externe à la partie la plus interne on retrouve successivement l'adventice tapissée d'une séreuse, la musculeuse (ou *muscularis externa*), la sous-muqueuse et la muqueuse. L'adventice, contenue dans le péritoine viscéral, est une paroi de tissu conjonctif où se fixent les couches de cellules musculaires longitudinales et circulaires constituant la musculeuse. Les contractions coordonnées de ces couches musculaires permettent le péristaltisme. Ce péristaltisme est contrôlé nerveusement par le plexus myentérique (ou plexus de Auerbach) dont les terminaisons nerveuses se situent entre les 2 couches musculaires. La sous-muqueuse consiste en une tunique dense et irrégulière de tissu conjonctif avec de larges vaisseaux sanguins et lymphatiques faisant le lien entre la muqueuse et la musculeuse. Les fibres nerveuses qui s'y projettent forment le plexus de Meissner, un plexus nerveux spécifiquement entérique. Enfin, la muqueuse est la tunique la plus interne de l'intestin. Histologiquement, elle diffère selon la partie du tractus gastro-intestinal considérée. Alors qu'elle comporte de nombreuses villosités dans l'intestin grêle où l'absorption des nutriments doit être maximale, elle en est dépourvue dans le colon. Elle se constitue de la *muscularis mucosae*, de la *lamina propria* et de l'épithélium intestinal. La *muscularis mucosae*, constituée de fibres musculaires lisses, maintient la structure des villosités facilitant ainsi le contact de l'épithélium avec les éléments du chyme. La *lamina propria* ou chorion est un tissu conjonctif jouant le rôle de soutien de l'épithélium et où l'on retrouve de nombreux éléments anti-inflammatoires. L'épithélium est quant à lui constitué

d'une monocouche de cellules épithéliales simples prismatiques, les entérocytes, organisée en villosités de 1 mm de haut. Ces cellules possèdent à leur pôle apical des microvillosités augmentant encore la surface d'absorption des entérocytes. Hormis ces cellules absorbatives, on retrouve dans cet épithélium des cellules sécrétrices qui, quoique moins nombreuses, ont des fonctions cruciales. Parmi ces dernières, on retrouve les cellules de Paneth sécrétrices d'éléments antibactériens (défensines, lysozymes, TNF α , PLC, PLA₂,...) et les cellules caliciformes (ou « Goblet cells ») sécrétrices de mucus. Ces 2 types de cellules sécrétrices déversent leur contenu dans la lumière intestinale. Ne représentant que environ 1% des cellules de l'épithélium intestinal et situées de préférence dans le 1/3 inférieur des villosités et dans les cryptes de Lieberkühn, les cellules entéroendocrines sont un troisième type cellulaire sécrétoire qui déversent leur contenu du côté basolatéral. Ces cellules confèrent à l'intestin une fonction endocrinienne majeure faisant de celui-ci le plus grand organe endocrine de l'organisme.

3) Renouvellement et différenciation de l'épithélium intestinal

Les cellules des villosités (entérocytes, cellules entéroendocrines et cellules caliciformes) se renouvellent tous les 3 à 4 jours alors que celles des cryptes de Lieberkühn (cellules de Paneth) ont un renouvellement d'environ 21 jours. Des expériences de suivi de différenciation dans l'intestin de souris adulte à l'aide d'un marquage GFP inducible par le tamoxifène ont permis de montrer que des cellules à la base des cryptes étaient à l'origine de toutes les cellules de l'épithélium intestinal (Barker *et al.* 2007) (**FIGURE 4**). De plus, ces expérimentations ont permis de montrer que ces cellules souches marquées étaient encore présentes un an après injection de tamoxifène montrant ainsi une longévité importante pour ces cellules souches intestinales adultes. D'un point de vue mécanistique, ces cellules souches multipotentes donnent naissance à des progéniteurs à l'origine des différentes sous-populations cellulaires de l'épithélium intestinal. L'expression dans ces cellules souches d'un récepteur à 7 traversés membranaires couplé aux protéines G, Lgr5, semble clé (Barker *et al.* 2007, Sato *et al.* 2011, de Lau *et al.* 2012). Au moins 2 voies intracellulaires contrôlent le devenir de ces cellules progénitrices. D'une part, la voie Notch cible les phénomènes précoces de renouvellement et de différenciation des cellules souches en augmentant notamment l'expression de Lgr5 (pour revue, Koo *et al.* 2014). L'autre voie de signalisation importante dans ces phénomènes de différenciation est la voie Wnt. En effet, l'expression de différents facteurs de transcription sous dépendance de cette voie permet le lignage de ces cellules progénitrices en cellules absorbatives (Math1-, Gfi- et Hes1+), en cellules sécrétrices de mucus (Math1+, Gfi+ et Elf3+) ou d'éléments anti-bactériens (Math1+, Gfi+ et Sox9+). Il est à noter que l'expression de facteurs de transcription sous dépendance de la voie Wnt peut être conditionnée à celle de facteurs de transcription dépendants de

Notch, et réciproquement, créant ainsi des rétro-contrôles favorisant l'un ou l'autre des lignages (Koo *et al.* 2014) (**FIGURE 4**). Parce qu'elles présentent une importance physiologique majeure, nous nous intéresserons plus particulièrement à la différenciation des cellules entéroendocrines.

B) Différenciation et importance physiologique des cellules entéroendocrines

L'existence de certaines substances intestinales pouvant induire des sécrétions du pancréas endocrine fut montrée au début des années 1900 (Bayliss & Starling 1902, Moore 1906), époque à laquelle furent identifiées les premières hormones intestinales : la sécrétine, la gastrine et la cholécystokinine (Bayliss & Starling 1902, Edkins *et al.* 1905) (**FIGURE 2**). Ce n'est qu'à l'avènement des outils de biologie cellulaire et de clonage génique qu'on a pu identifier l'ensemble des hormones intestinales. On compte aujourd'hui plus de 30 gènes codant pour des peptides intestinaux à activités hormonales diverses.

1) Localisation et fonctions physiologiques des cellules entéroendocrines

L'identification de ces hormones ainsi que l'analyse de la morphologie de leurs vésicules de sécrétion ont permis de distinguer et de nommer 11 sous-types de cellules entéroendocrines (Sjölund *et al.* 1983). L'un des marqueurs utilisés classiquement pour détecter par immunohistochimie les cellules entéroendocrines, la chromogranine A, apparaît aujourd'hui peu fiable car peu ou pas exprimé dans certains types de cellules entéroendocrines isolées par cytométrie en flux (FACS) (Habib *et al.* 2012). Un autre marqueur, la claudine 4, semble plus approprié pour marquer l'ensemble des cellules entéroendocrines (Nagatake *et al.* 2014). Les différentes populations de cellules entéroendocrines ont une distribution intestinale spécifique selon leur(s) rôle(s) dans l'organisme. Hormis la ghréline stomacale, tous les peptides sécrétés par les cellules entéroendocrines présentent une activité anorexigène *via* leur capacité à stimuler la sécrétion de peptides satiétogènes (POMC et CART) par les cellules du noyau arqué de l'hypothalamus ou par une inhibition de la vidange gastrique et/ou de la motilité intestinale (**FIGURE 5**).

Par soucis de clarté, je détaillerai ci-dessous quelques exemples de cellules entéroendocrines selon leur gradient d'expression le long de l'intestin et je donnerai quelques exemples de leurs rôles dans l'organisme (**FIGURE 6**).

- a) Les cellules entéroendocrines de type X/A-like sécrétrices de ghréline

Les cellules X/A-like ou P/D1 sont présentes dans le fundus stomacal puis décroissent en nombre jusqu'au duodénum (**FIGURE 6**). Ces cellules sécrètent la ghréline, seul peptide orexigène sécrété par les cellules entéroendocrines. En accord avec son rôle dans la promotion de l'ingestion d'aliments, les niveaux de ghréline dans le plasma augmentent juste avant et diminuent très rapidement après un repas (Moran 2009). La ghréline se fixe à un récepteur à 7 séquences transmembranaires couplé aux protéines G, le GHRS (Growth Hormone Secretagogue Receptor). Très récemment, la ghréline a été identifiée comme un sécrétagogue de GLP-1 *via* une signalisation intracellulaire Erk1/2/MAPK après activation du récepteur à la ghréline (Gagnon Diabetes 2014).

b) Les cellules entéroendocrines de type G sécrétrices de gastrine

La gastrine est une hormone polypeptidique de 34 acides aminés sécrétée par les cellules G surtout présentes dans l'antrum gastrique et dans le duodénum (**FIGURE 6**). Elle est aussi exprimée chez l'Homme et la souris dans les cellules du pancréas endocrine lors du développement embryonnaire (Suissa *et al.* 2013). La gastrine est synthétisée sous forme d'un précurseur, la préprogastrine maturée ensuite en 3 différentes isoformes par la prohormone convertase 2 (PC2, *Pcsk2*) : la gastrine 34 (34aa, sécrétée par les cellules G du duodénum), la gastrine 17 (17aa, sécrétée par les cellules G de l'antrum gastrique) et la gastrine 14. Ces isoformes ont une t1/2 de 2-3 minutes (G14 et G17) et de 15 minutes (G14) dans la circulation. Quelle que soit l'isoforme considérée, les 5 derniers acides aminés sont communs à ceux de la cholécystokinine des cellules I. De plus, la gastrine se fixe au récepteur CCK-2, récepteur qu'elle partage avec la CCK. La sécrétion de gastrine est sous contrôle mécanique, chimique et nerveux. La vue des aliments va déclencher un réflexe vagal gastrique qui va induire la sécrétion de gastrine. La distension de l'estomac est aussi un des stimuli de la libération de gastrine. Cette sécrétion est d'autant plus amplifiée que le chyme est riche en protéines. La gastrine est surtout connue pour sa capacité à stimuler la sécrétion acide par les cellules pariétales stomacales ainsi que la sécrétion d'eau par le foie et de pepsine par le pancréas. Ces sécrétions acides dans l'antrum vont en retour inhiber la sécrétion de gastrine soit en agissant directement sur les cellules G soit en stimulant la libération de somatostatine par les cellules D. La gastrine augmente la motilité intestinale ainsi que l'irrigation sanguine du tube digestif. Enfin, dans un contexte de diabésité, condition pathologique alliant obésité et diabète, la gastrine a un effet trophique sur les muqueuses gastriques et intestinales et, chez la souris, sur le pancréas (Rooman *et al.* 2002, Rooman & Bouwens 2004). Des effets « incretin-like » de la gastrine (c'est-à-dire capable de stimuler la sécrétion d'insuline) ont été identifiés à la fois chez la souris mais aussi chez l'Homme (Crouch *et al.* 2012, Inci *et al.* 2013, Rehfeld & Stadil 1973, Rehfeld *et al.* 1976). Contrairement à la souris qui exprime le récepteur CCK-1 dans les îlots pancréatiques, chez

l'Homme et le cochon c'est surtout CCK-2 qui est exprimé (Reubi *et al.* 2003). Chez la souris, cet effet « incretin-like » serait dû à la capacité de la gastrine à induire une transgénèse des cellules ductales pancréatiques en cellules sécrétrices d'insuline (Rooman *et al.* 2002). De plus, la gastrine combinée à de l'EGF augmente le nombre de cellules β pancréatiques et normalise la glycémie de souris diabétiques non obèse (Suarez-Pinzon *et al.* 2005). Enfin chez l'Homme, l'utilisation d'inhibiteurs de pompe à protons diminuerait l'hémoglobine glyquée de patients diabétiques de type 2 par leur effet hypergastrinémique (Inci *et al.* 2014), cet effet corroborant des études plus anciennes où l'injection de gastrine potentialise l'effet du glucose sur la sécrétion d'insuline (Rehfeld & Stadil 1973) et où des patients atteints du syndrome d'hypergastrinémie de Zollinger-Ellison présentent une sécrétion d'insuline après un test de tolérance au glucose oral deux fois plus élevée que les sujets normaux (Rehfeld *et al.* 1976). Ces observations ainsi que celle très récente montrant une augmentation significative de la sécrétion de gastrine après chirurgie bariatrique (+25 à +50% en fonction du type de chirurgie, Sillakivi Hepato-gastroenterology 2013), font de cette hormone peptidique une nouvelle cible thérapeutique prometteuse pour le traitement du diabète de type 2.

c) Les cellules entéroendocrines de type EC sécrétrices de sérotonine

Les cellules de type EC (pour entérochromaffines de par leur capacité à fixer des sels de chrome), sécrétrices de monoamines telles que la sérotonine, sont surtout présentes dans le duodénum (Hansen Witte 2008) (**FIGURE 6**). La sérotonine intestinale (ou 5-hydroxytryptamine, 5-HT) agit comme neurotransmetteur du système entérique et du nerf vague mais aussi comme hormone paracrine sur les entérocytes avoisinants. La présence d'un chyme dans le duodénum induit un stimulus mécanique à l'origine du relargage de la sérotonine qui va induire la motilité intestinale, les sécrétions intestinales et pancréatiques et inhiber la vidange gastrique (Mawe & Hoffman 2013).

Chez la souris, la 5-HT promouvrait le développement de la stéatose hépatite non-alcoolique (Nocito *et al.* 2007), elle participerait à la régénération du foie après hépatectomie (Lesurtel *et al.* 2006) et protégerait celui-ci lors d'une cholestase en restaurant le pool d'acides biliaires *via* une adaptation des transporteurs rénaux des acides biliaires (Jang *et al.* 2012).

La 5-HT des cellules EC est aussi connue comme un facteur aggravant de l'inflammation intestinale. En effet, les souris SERT KO, déficientes pour le transporteur de la recapture de la 5-HT, présentent une aggravation de la colite induite par un agent chimique (TNBS) (Bischoff *et al.* 2009).

Enfin, la 5-HT intestinale joue aussi un rôle dans le développement osseux. Lrp5 (Low-density lipoprotein related-receptor protein 5) est une protéine qui contrôle l'expression

de Tph1, l'enzyme limitante dans la synthèse de sérotonine intestinale (Walther *et al.* 2003). En utilisant des modèles murins d'inactivation et de surexpression génique de Lrp5, Yadav et collègues ont montré que la sérotonine augmente les risques d'ostéoporose (Yadav *et al.* 2010). De plus, en utilisant une molécule inhibitrice de Tph1, ces auteurs ont aussi montré que diminuer la concentration circulante de sérotonine pouvait normaliser l'ostéoporose induite par ovariectomie chez la souris (Yadav *et al.* 2008). Toutefois, l'idée d'un rôle de Lrp5 intestinal *via* la 5-HT dans le développement de l'ostéoporose a été remis en question récemment par une étude montrant un rôle du Lrp5 ostéoblastique dans le développement de cette pathologie (Cui *et al.* 2011).

d) Les cellules entéroendocrines de type I sécrétrices de cholécystokinine

Quoique surtout présentes dans l'intestin grêle proximal, les cellules I sécrétrices de cholécystokinine (CCK) se retrouvent tout le long de l'intestin (**FIGURE 6**) et aussi dans le cerveau et sur les fibres nerveuses du plexus myentérique. La CCK est synthétisée sous forme d'un précurseur protéique, la prépro-CCK, clivée en CCK58 (cerveau), CCK39, CCK12, CCK33 (intestin), CCK22 (intestin) et CCK8 (intestin et cerveau) par les pro-hormones convertases 1 (PC1/3) et 5 (PC5) (Wang *et al.* 1998). Toutes ces isoformes possèdent un groupement amide en C-ter et sont sulfatées sur la tyrosine à proximité de cette extrémité augmentant par 100 leur activité dans le tractus gastrointestinal. La CCK agit via 2 récepteurs couplés aux protéines G, le CCK-1 (anciennement CCKA pour « alimentary »), exprimé dans le tractus gastrointestinal, les afférences du nerf vague et le plexus myentérique, et le CCK-2 (anciennement CCKB pour « brain »), récepteur exprimé en abondance dans le cerveau. Alors que CCK-1 est sélectif pour la CCK sulfatée, CCK-2 possède une affinité égale pour la CCK et pour la gastrine. Quoique les peptones et les acides aminés induisent aussi la libération de CCK par les cellules I, c'est surtout l'arrivée d'un chyme riche en lipides dans le duodénum qui entraîne la sécrétion de CCK dans la circulation sanguine. Au niveau de la vésicule biliaire, la CCK va se fixer sur les CCK-1 de la surface des cholangiocytes et induire sa contraction. La bile ainsi déversée dans le duodénum facilite la digestion des lipides alimentaires, générant ainsi plus de substrats pour une nouvelle sécrétion de CCK par les cellules I. De plus, la CCK induit la relaxation du sphincter d'Oddi et diminue la vidange gastrique respectivement *via* la fixation sur les CCK-1 des afférences du nerf vague et les CCK-1 des cellules pariétales stomacales (Hayes *et al.* 2006, Hayes & Covasa 2006). La CCK est aussi un peptide satiétogène *via* CCK-1 (Donovan *et al.* 2007) qui agit de concert avec la 5-HT (Hayes & Covasa 2005). Elle diminue également l'expression de peptides orexigéniques (Gallmann *et al.* 2005). La CCK inhibe l'action de la ghréline (Kobelt Am *et al.* 2005) et stimule la sécrétion des sucs pancréatiques.

Elle stimule également la sécrétion d'insuline chez le rat (Rushakoff *et al.* 1987) et une équipe utilise actuellement des analogues non dégradables de la CCK8 pour normaliser la glycémie de souris rendues obèses par un régime riche en graisses (Irwin *et al.* 2013, Irwin *et al.* 2013). Ces résultats sont à prendre avec précaution pour 2 raisons : 1) le CCK-1 est exprimé dans le pancréas endocrine murin mais peu dans l'îlot humain (Kuntz *et al.* 2004) et 2) chez des souris immunodéficientes injectées avec des cellules de carcinome pancréatique humain l'administration de CCK augmente la prolifération du carcinome (Smith *et al.* 2004).

e) Les cellules entéroendocrines de type S sécrétrices de sécrétine

Les cellules S se retrouvent distribuées de manière égale le long de l'intestin (**FIGURE 6**). La sécrétine fut la première hormone intestinale découverte et fut nommée ainsi pour sa capacité à induire les sécrétions du pancréas exocrine. Elle est synthétisée par les cellules de type S (Small) sous forme d'un polypeptide de 27 acides aminés, la prosécrétine. Ces cellules furent dénommées ainsi car caractérisées par des vésicules de petite taille. La sécrétine est sécrétée en réponse à des produits de la digestion protéique, en réponse aux acides biliaires et en réponse au pH acide. Sa sécrétion est inhibée par la somatostatine. Dans le sang, sa $\frac{1}{2}$ vie est de 5 minutes. Au niveau de ses actions, la sécrétine augmente la libération des sucs pancréatiques et diminue la sécrétion des sucs gastriques. Elle intervient aussi dans la libération des acides biliaires par la vésicule biliaire et dans la contraction du sphincter pylorique. Elle inhibe aussi la prise alimentaire par l'intermédiaire du système mélanocortine (Cheng *et al.* 2011). Toutefois, les souris invalidées pour le récepteur à la sécrétine sont protégées de l'obésité induite par un régime riche en graisses grâce à une diminution de la détection et de l'absorption des lipides intestinaux (Sekar & Chow 2014).

f) Les cellules entéroendocrines de type K sécrétrices de GIP

Isolé en 1973 à partir d'intestin de porc et nommé dans un premier temps Gastric Inhibitory Polypeptide pour sa capacité à inhiber la sécrétion d'acide gastrique chez le chien (Dupre *et al.* 1973), GIP est maintenant reconnu pour sa capacité insulinothrompe dépendante du glucose (Ross & Dupre 1978) et fut rebaptisé pour cela Glucose-dependent Inhibitory Polypeptide. GIP est produit par les cellules entéroendocrines de type K du duodénum et du jéjunum (**FIGURE 6**) sous forme d'un précurseur protéique de 153 acides aminés, le Pro-GIP, puis clivé par la prohormone convertase 1/3 (PC1/3). Les principaux stimuli de la sécrétion de GIP sont les acides gras et le glucose. Le galactose, le saccharose mais pas le fructose stimulent également la sécrétion de GIP (Flatt *et al.* 1989, Kuhre *et al.* 2014). Enfin, l'intensité de sécrétion de GIP dépend aussi de la taille du repas (Vilsbøll *et al.* 2003). Outre son effet sur la sécrétion de l'insuline, GIP joue aussi un rôle dans le métabolisme des acides gras par le tissu adipeux où il augmente l'incorporation stimulée par l'insuline des

acides gras dans les triglycérides, l'activité lipoprotéine lipase et la synthèse des acides gras (Yip & Wolfe 2000, Eckel *et al.* 1979, Knapper *et al.* 1995, Oben *et al.* 1991). De plus, il a été montré que GIP augmente l'expression génique et la sécrétion de l'autre incrétine GLP-1 dans le modèle de cellules L GLUTag (Gil-Lozano *et al.* 2014) mais aussi *in vivo* chez la souris où des injections de GIP dans des segments de duodénum isolés du reste du tractus intestinal par ligation induisent la sécrétion de GLP-1 (Rocca & Brubacker 1999). Parce que les cellules de type K se retrouvent de manière éparse le long de l'intestin proximal et parce que l'effet de GIP sur la sécrétion d'insuline est perdu chez les patients diabétiques de type 2, les mécanismes cellulaires et moléculaires conduisant à la sécrétion de GIP sont peu étudiés. Une fois sécrété, GIP est dégradé par l'action de l'enzyme ubiquitaire, la Dipeptidyl Peptidase 4 (DPP-4, CD26).

g) Les cellules entéroendocrines de type L sécrétrices de GLP-1

Les cellules entéroendocrines de type L représentent moins de 1% de l'ensemble des cellules épithéliales intestinales. Ces cellules furent appelées ainsi pour la taille importante de leurs vésicules de sécrétion (Large). Elles se retrouvent disséminées selon un gradient ascendant le long de l'intestin avec un maximum d'expression dans le colon puis dans le rectum (**FIGURE 6**). Au cours de ma thèse, je me suis plus principalement intéressé aux cellules entéroendocrines de type L pour leur capacité à produire l'incrétine GLP-1. Nous développerons cet aspect de manière plus approfondie lors de la partie suivante.

GLP-1 est un peptide codé par le même gène que le glucagon : le proglucagon. Ce gène de 9536 pb chez l'Homme et de 9124 pb chez la souris (source : www.genome-euro.ucsc.edu) est constitué de 6 exons et de 5 introns (White & Saunders 1986) (**FIGURE 7**). Après transcription, le pré-ARNm du proglucagon est excisé et épissé en un ARNm mature de 1294 pb chez l'Homme et de 1091 pb chez la souris. Il est ensuite traduit sous la forme d'un précurseur protéique de 160 acides aminés, le proglucagon. Cette séquence d'acides aminés est hautement conservée entre les espèces (>90% de conservation entre l'Homme et la souris) (Kieffer & Habener 1999). Alors que dans les cellules α pancréatiques l'action de la prohormone convertase 2 (PC2, *Pcsk2*) clive ce précurseur en GRPP (Glicentin-Related Pancreatic Polypeptide), MPF (Major Proglucagon Fragment) et glucagon, dans les cellules L et dans les neurones du noyau du tractus solitaire du tronc cérébral l'action de la PC1/3 (*Pcsk1*) clive ce précurseur en GRPP, oxyntomoduline, GLP-1 et GLP-2 (**FIGURE 7**). Quelque soit l'espèce de Mammifère considérée, la séquence en acides aminés de GLP-1 reste inchangée (Kieffer & Habener 1999). Le GLP-1 actif existe sous 2 formes, le GLP-1 7-37 et le GLP-1 7-36amide, ce dernier représente 80% du GLP-1 circulant chez l'Homme (Bell & Habener 1983). Une fois sécrété dans la circulation sanguine, les 2 acides aminés de l'extrémité N-Ter du GLP-1 actif sont rapidement hydrolysés par la DPP-4

pour donner GLP-1 9-37 et GLP-1 9-36amide (formes inactives). L'action de cette enzyme est telle que le GLP-1 actif a une demi-vie de seulement 2 à 3 minutes dans la circulation sanguine. On considère que seuls 30% du GLP-1 actif sécrété arrivent à ses récepteurs pancréatiques et potentialisent la sécrétion d'insuline en réponse au glucose (Baggio & Drucker 2007). Hormis la régulation de la sécrétion de GLP-1, de plus en plus d'études s'orientent vers la compréhension de la régulation de la transcription du proglucagon dans le but d'augmenter la production endogène de GLP-1 par les cellules L.

En plus de GLP-1 et des autres peptides dérivant du proglucagon, les cellules L expriment aussi le Peptide Tyrosine-Tyrosine (PYY). PYY est un peptide de 36 acides aminés sécrété en réponse à un repas. Les éléments issus des nutriments tels que les protéines semblent les meilleurs pour induire la sécrétion de PYY (Batterham *et al.* 2006). Comme la sécrétion de GLP-1, la sécrétion de PYY se fait dès 15 minutes après ingestion d'un repas, temps trop court pour que les nutriments arrivent à l'intestin distal (Gibbons *et al.* 2013). Pour cette raison, des stimuli nerveux ou hormonaux sont soupçonnés d'être à l'origine d'une partie de la sécrétion de PYY. PYY est sécrété sous la forme PYY1-36 puis est rapidement dégradé par la DPP-4, en PYY3-36. PYY3-36 se fixe et active le récepteur Y2R, un membre de la famille des récepteurs NPY, présent à la fois dans le système nerveux périphérique et central avec une préférence d'expression dans les cellules du noyau arqué de l'hypothalamus. PYY diminue la vidange gastrique et retarde le transit intestinal. De plus, PYY réduit les niveaux de la ghréline (Batterham *et al.* 2003), hormone orexigène, et la masse corporelle à la fois chez le rongeur et chez l'Homme (Batterham *et al.* 2002). Chez l'Homme obèse, l'administration pendant une semaine d'un régime riche en glucides et pauvre en graisses inhibe la capacité de l'intestin à sécréter PYY en réponse à un repas test (Essah *et al.* 2007). Enfin, l'administration d'un antagoniste du Y2R diminue la prise alimentaire (Abbott *et al.* 2005) et l'injection de PYY3-36 n'a pas d'effet sur la prise alimentaire chez les souris Y2R-KO (Batterham *et al.* 2002). De manière intéressante, les souris invalidées pour le gène codant PYY sont hyperphagiques et développent une obésité (Batterham *et al.* 2006). Contrairement à la leptine, les niveaux circulants et la sensibilité au PYY3-36 ne sont pas modifiés chez les patients obèses (Batterham *et al.* 2003). Toutefois d'autres études montrent que les niveaux de PYY à jeun et après repas sont réduits chez les patients obèses (Kim *et al.* 2005, Stock *et al.* 2005). Enfin, après chirurgie bariatrique les niveaux postprandiaux de PYY sont augmentés (Borg *et al.* 2006, Laferrère *et al.* 2010, Le Roux *et al.* 2006), laissant suggérer un rôle de PYY sur la réduction de la masse corporelle. Dans cette optique des analogues non hydrolysables de PYY sont actuellement utilisés dans des études de Phase I (ClinicalTrials.gov identifiant: NCT01515319).

h) Les autres types de cellules entéroendocrines

Les cellules entéroendocrines enterochromaffines-like (ECL) sont des cellules ressemblant de par leur morphologie aux cellules EC. Elles sont uniquement localisées dans l'estomac. Ces cellules sécrètent des monoamines de type histamine.

Les cellules de type M sont des cellules entéroendocrines surtout présentes dans le duodénum et le jéjunum. Elles co-expriment dans les mêmes vésicules de sécrétion la motiline et la ghréline, 2 peptides bioactifs qui induisent la motilité intestinale (Wierup *et al.* 2007). Ces 2 peptides partagent également une homologie de séquence de 21% et leurs récepteurs sont similaires à 44% (Chen & Tsai 2012).

Les cellules N de l'intestin doivent leur nom au peptide qu'elles sécrètent : la neurotensine. Alors que ce peptide inhibe la motilité intestinale dans l'intestin grêle, elle la stimule dans le colon. De plus, elle favorise la prolifération des cellules épithéliales intestinales (Mustain *et al.* 2011).

Les cellules de type D, sécrétrices de somatostatine, se retrouvent tout le long du tractus gastrointestinal. La somatostatine est aussi sécrétée par les cellules δ représentant 5% du pancréas endocrine.

i) Révision du dogme une cellule entéroendocrine / un peptide

Le dogme « une cellule entéroendocrine – un peptide bio-actif » a permis de classier dans un premier temps les différentes cellules endocrines de l'intestin. Toutefois cette classification cloisonnée est en cours de révision suite à différentes études menées chez la souris et montrant qu'il n'existait pas de cellules entéroendocrines « pures » mais plutôt des cellules mixtes exprimant plusieurs entérohormones (Habib *et al.* 2012, Egerod *et al.* 2012, Mulder *et al.* 1997, Portela-Gomes *et al.* 1997).

En utilisant des modèles de souris transgéniques où l'expression d'une molécule fluorescente VENUS est sous dépendance soit du promoteur du proglucagon soit du promoteur de GIP, l'équipe du Pr. Franck Reimann a montré que ces types de cellules entéroendocrines expriment, en plus de leur peptide respectif, d'autres peptides hormonaux (Habib *et al.* 2012). En effet, 50% des cellules L proximales expriment, en plus du GLP-1 et de PYY, la CCK. De plus, les cellules L purifiées expriment également les messagers de la neurotensine, de la sécrétine et à un niveau moindre GIP. Enfin, cette équipe a aussi montré que même si le peptide le plus exprimé dans les cellules L reste le proglucagon, les cellules de type L de l'intestin proximal ont un profil d'expression hormonal plus semblable à celui des cellules de type K qu'à celui des cellules de type L de l'intestin distal.

2) Différenciation des cellules entéroendocrines

En 1999, Rindi et Leiter ont supprimé toutes les cellules S grâce à un antiviral. Dans cette étude, ces auteurs ont montré que la suppression des cellules S conduisait à une

disparition des cellules L et des cellules I. De plus, ils ont aussi montré une diminution des cellules K, des cellules D et des cellules EC. Toutes ces populations cellulaires réapparaissent après arrêt du traitement (Rindi *et al.* 1999). Ces résultats suggèrent un lien développemental entre les différentes cellules entéroendocrines avec comme précurseur commun un précurseur pluripotent responsable des différents lignages des cellules entéroendocrines (**FIGURE 4**).

La neurogénine 3 (Ngn3) est un facteur de transcription clé dans la différenciation en cellules entéroendocrines. Chez l'Homme, des mutations dans le gène codant la Ngn3 furent identifiées. Les patients porteurs de ces mutations présentent des diarrhées congénitales sévères ainsi qu'une absence totale de cellules entéroendocrines sans changement dans le nombre des autres cellules épithéliales intestinales (Wang *et al.* 2006, Pinney *et al.* 2011). De même, chez la souris, l'extinction de ce gène se traduit par une quasi-disparition des cellules entéroendocrines précurseurs et matures (Jenny *et al.* 2002). Pour étudier le rôle sur l'homéostasie énergétique de la délétion de la Ngn3 dans les cellules entéroendocrines, Mellitzer et son équipe ont développé des souris où la Ngn3 était délétée spécifiquement dans l'intestin. Ces souris présentent une mortalité pré-natale de 50%. D'un point de vue métabolique, les souris survivantes ne présentent quasiment aucune cellule entéroendocrine et présentent une absorption lipidique et un métabolisme glucidique altérés (Mellitzer *et al.* 2010).

L'intestin des souris invalidées pour FoxA1 ou FoxA2 ne présente que très peu de cellules entéroendocrines de type L et de type D. De plus, ces souris présentent moins de cellules caliciformes. Aux auteurs de conclure que les facteurs de transcription FoxA1 et FoxA2 interviennent dans le développement des cellules entéroendocrines en agissant de manière plus globale sur la différenciation des cellules sécrétrices de l'intestin (Ye & Kaestner 2009).

Arx est un facteur de transcription exprimé lors du développement des cellules entéroendocrines murines et humaines. Le croisement de souris FoxA3, facteur de transcription spécifique de l'endoderme intestinal, à des souris Arx-Flox a permis de générer des souris Arx-KO dans l'endoderme intestinal. Ce modèle a permis de montrer que Arx était nécessaire à la différenciation en cellules L et I dans le duodénum, le jéjunum et l'iléon. En diminuant l'expression de Arx dans des organoïdes intestinaux dérivés de cellules souches embryonnaires humaines, ces auteurs montrent également que la déficience en Arx diminue l'expression de CCK, de sécrétine et de proglucagon chez l'Homme (Du *et al.* 2012).

Daniel J. Drucker et son équipe en utilisant un système de sur-expression de dominant négatif pour Pax6 ont identifié ce facteur de transcription comme un acteur essentiel de la différenciation des cellules L (Hill *et al.* 1999). Nous reviendrons sur ce facteur de transcription lors de l'étude de la régulation du promoteur du proglucagon.

Prises ensembles, ces données montrent l'importance de ces facteurs de transcription dans la différenciation des cellules entéroendocrines. De plus leur déficience conduit à des troubles gastro-intestinaux ou métaboliques sévères à la fois chez l'Homme et chez le rongeur (Mellitzer *et al.* 2010, Pinney *et al.* 2011, Pedersen *et al.* 2013). Finalement, ces facteurs peuvent aussi être une cible thérapeutique. En effet, Talchai et son équipe ont montré récemment que l'ablation d'un facteur de transcription de la famille des Forkhead receptor, FoxO1, conduisait chez la souris à l'expression fonctionnelle d'insuline par l'intestin (Talchai *et al.* 2012). Un brevet issu de ce travail est actuellement déposé (publication numéro WO2011143511 A3).

PARTIE II : Régulation du métabolisme énergétique *via* la sécrétion de l'incrétine GLP-1 par les cellules L

Le terme incrétine fut inventé en 1932 par le professeur La Barre, professeur de pharmacologie à l'Université Libre de Bruxelles (La Barre, Bulletin de l'Académie Royale de Médecine de Belgique, 1932). Tout comme le terme sécrétine vient de la capacité de cette protéine à induire une SECRETION du pancréas exocrine dans le duodénum, le terme incrétine vient du terme inusité aujourd'hui d'INCRETION désignant auparavant une substance sécrétée par une glande et à vocation à rester dans l'organisme (on parlerait aujourd'hui d'hormone). L'effet incrétine, observé pour la première fois chez l'Homme en 1964 (McIntyre *et al.* 1964), est défini par le fait qu'une ingestion orale de glucose induit une meilleure sécrétion d'insuline qu'une injection intraveineuse isoglycémique **FIGURE 8**. Cet effet participe pour 50 à 70% de la sécrétion d'insuline en réponse au glucose et est principalement dû aux 2 hormones intestinales GIP et GLP-1. L'effet incrétine de GIP est perdu chez le sujet diabétique de type 2 alors que celui lié à GLP-1 est conservé faisant de la voie de GLP-1 une cible utilisée actuellement avec succès pour soigner le diabète de type 2 (Nauck *et al.* 1986) **FIGURE 7**. Une meilleure compréhension des mécanismes régulant la production et/ou la sécrétion de GLP-1 par les cellules L est une approche prometteuse pour le développement d'antidiabétiques.

A) Modèles d'études

L'étude des mécanismes moléculaires de la régulation de production de GLP-1 est rendue difficile *in vivo* par la dispersion des cellules L et par la difficulté d'isoler des populations purifiées de cellules L viables. Pour passer outre ce problème, différents modèles de lignées cellulaires et de cultures primaires ont été développés.

Les FRIC, pour « Fœtal Rat Intestinal Cells », sont des cultures de cellules primaires d'intestin issues de fœtus de rat de 19 jours (Brubacker *et al.* 1988). Ce fut le premier

modèle *ex vivo* utilisé pour étudier les effets de différentes molécules (glucose, AMPc, bombésine...) sur la sécrétion et la production de GLP-1 (Jackson Huang & Brubacker 1995, Brubacker *et al.* 1991). Car elles sont issues de la totalité de l'intestin du fœtus, les FRIC sont un mix de cellules intestinales proximales et distales. Ce modèle n'étant pas spécifique des cellules L il a été abandonné au profit des IEC.

Les IEC, pour « intestinal epithelial cells », sont des cellules épithéliales intestinales isolées de souris. En isolant des cellules épithéliales du colon, partie où les cellules L sont les plus présentes, il est alors possible d'étudier à la fois l'électrophysiologie des cellules L mais aussi la production et la sécrétion de GLP-1 en réponse à différentes molécules telles que le glucose ou les acides aminés (Parker *et al.* 2012, Tolhurst *et al.* 2011). Récemment, il a été possible de remettre en culture des IEC humaines, répondant à différents sécrétagogues tels que la forskolin/IBMX mais aussi à des agonistes de TGR5 ou de GPR119 (Habib *et al.* 2013).

Les NCI-H716 sont une lignée de cellules L entéroendocrines humaines dérivant d'un colocolcarinome. Ces cellules poussent en suspension et se différencient pleinement en cellules L une fois fixées sur une matrice protéique. En termes de sécrétion de GLP-1, ces cellules répondent à différents stimuli dérivés de l'alimentation. Toutefois, l'expression génique du proglucagon n'est pas régulée « normalement » (Cao *et al.* 2003). En effet, sa transcription n'est pas augmentée après activation de la voie AMPc et le promoteur du proglucagon transfecté dans ces cellules est inactif. Cette lignée est donc à utiliser en priorité pour l'étude de la sécrétion de GLP-1 plutôt que l'étude de la régulation de sa production.

La lignée STC-1 est une lignée de cellules L entéroendocrines d'intestin proximal de souris obtenue après remplacement d'une partie de l'antigène petit T du virus simien 40 (SV40) par le promoteur de l'insuline de rat (Grant *et al.* 1991). Ces souris développent des tumeurs neuroendocrines de l'intestin. Les STC-1 sont surtout utilisées comme modèle d'étude pour la sécrétion de la CCK. Cependant, l'isolement et la caractérisation de ces cellules ont montré qu'elles sécrétaient également GLP-1, GIP, la gastrine, la sécrétine et la neurotensine. Elles commencent donc à être utilisées comme modèle d'étude de la sécrétion de GLP-1.

Les GLUTag sont un modèle murin de cellules L entéroendocrines de colon isolées d'une tumeur de l'intestin produisant du glucagon. Une majorité des mécanismes intracellulaires de production et de sécrétion de GLP-1 furent identifiés grâce à cette lignée. Les études menées sur les cellules L purifiées de souris GLU-VENUS ont permis de montrer que les GLUTag répondaient au glucose selon un EC_{50} similaire à celui observé dans les cellules L primaires. A l'exception de GLUT2, les GLUTag expriment les mêmes récepteurs et transporteurs de glucose que les cellules L isolées. Toutefois, il est à noter que les

réponses à des inhibiteurs des transporteurs au glucose sont différentes que l'on soit dans les GLUTag ou dans des cellules intestinales épithéliales (Parker *et al.* 2012). Cette limite prise en compte, les GLUTag restent un modèle largement utilisé pour étudier les mécanismes de sécrétion de GLP-1 en réponse à différents sécrétagogues et notamment en réponse au glucose.

L'équipe du Professeur Fiona Gribble à Cambridge a réussi, en utilisant des cellules entéroendocrines isolées par FACS grâce à une molécule fluorescente VENUS dont l'expression est sous dépendance du promoteur du Proglucagon (modèle de souris GLU-VENUS), à isoler et à purifier des cellules L. Quoique ces cellules ne sont pas viables une fois isolées, leur caractérisation a permis de montrer que les cellules exprimant le proglucagon (ou cellule L+) expriment d'autres peptides intestinaux. De plus, cette étude a mis en lumière que les cellules L+ proximales ont un profil d'expression hormonal plus proche de cellules K+ que celui des cellules L+ de l'intestin distal (Habib *et al.* 2012).

Bien que les IEC et les FRIC conservent une certaine fonctionnalité lorsqu'elles sont remises en culture, ces modèles de cellules isolées ne prennent pas en compte l'impact que peut avoir l'environnement des cellules L dans leur réponse aux sécrétagogues. Pour mieux appréhender ce problème, un modèle d'intestin de rat perfusé a été développé. Après anesthésie, le rat est déposé sur une table à 37°C. L'intestin est sorti de la cavité abdominale et ouvert au niveau du 1/3 proximal de l'intestin grêle ainsi qu'à la fin du colon. L'intestin est alors rincé avec de l'eau physiologique et un cathéter est placé dans la veine porte. Différents sécrétagogues contenus dans un milieu Krebs-Ringer sont alors administrés au niveau de l'intestin proximal et le sang portal est récupéré. Les mesures de GLP-1 sont ensuite réalisées. Parce que le rat est toujours vivant, ce système est celui qui reflète le mieux, après les mesures de sécrétion *in vivo*, la physiologie de l'animal (Kuhre *et al.* 2014).

Ces différents modèles ont permis l'étude des mécanismes moléculaires de régulation de la transcription du proglucagon dans la cellule L.

B) Régulation de la transcription du proglucagon par le glucose

Certains facteurs tels que l'AMPc, la forskoline, la toxine cholérique et le glucose régulent à la fois la sécrétion de GLP-1, que nous aborderons ultérieurement, mais aussi la transcription du gène du proglucagon (Drucker & Brubaker 1989, Drucker *et al.* 1991, Daoudi *et al.* 2011). La régulation de cette transcription possède des similarités que l'on soit dans la cellule α du pancréas endocrine ou que l'on soit dans la cellule L intestinale mais aussi des spécificités dépendantes de l'organe. Toutefois, quelque soit l'organe considéré, cette régulation fait intervenir 2 types d'acteurs : les protéines à homéodomains (HD) et l'AMPc (Knepel *et al.* 1990). Un troisième acteur, la voie Wnt, est quant à elle spécifique de la régulation intestinale du proglucagon (Ni *et al.* 2003, Yi *et al.* 2005).

1) Structure du promoteur du proglucagon

Cinq séquences de 20 à 40 pb, cruciales dans le contrôle de l'expression du gène du proglucagon, furent mises en évidence dans les 2,5 kb en amont du +1 du gène du proglucagon. Ces 5 séquences furent dénommées G1, G2, G3, G4 et G5. En plus de ces enhanceurs, le promoteur du proglucagon contient une séquence CRE (pour élément de réponse à l'AMPC) (Jin & Drucker 1995, Cordier-Bussat *et al.* 1995, Herzig *et al.* 2000, Yi *et al.* 2005) (**FIGURE 7**).

2) Régulation de l'activité du promoteur du proglucagon dans le pancréas et dans l'intestin

Au niveau du G1, la fixation de Pax-6, facteur de transcription essentiel pour la différenciation terminale en cellule entéroendocrine de type L (Hill *Mol Endocrinol* 1999) et pour le développement des îlots pancréatiques (Hart *et al.* 2013), augmente l'expression du gène du proglucagon (Hill *et al.* 1999, Grigoryan *et al.* 2012) (**FIGURE 7**). Un autre membre de la famille des protéines à homéodomains, Pax-4, régule négativement l'expression du proglucagon soit par une fixation directe au G1 soit en inhibant l'action positive de Pax-6 dans la cellule α pancréatique (Ritz-Laser *et al.* 2002) (**FIGURE 7**). Isl-1 est connu pour réguler positivement l'expression du proglucagon dans les cellules α pancréatiques (Wang & Drucker 1995) (**FIGURE 7**). De plus, ce facteur de transcription est exprimé dans des sous-populations de cellules entéroendocrines (Das & May 2011). Bien que cela n'a pas été prouvé, on peut supposer qu'Isl-1 régule également l'expression du proglucagon dans les cellules L. Les expressions de Pax-6 et d'Isl-1 sont toutes les 2 régulées positivement par les facteurs de transcription FoxA1/FoxA2 (Ye & Kaestner 2009) (**FIGURE 7**).

C'est au niveau du G2 que l'on retrouve des éléments de régulation tissu-spécifiques de l'expression du proglucagon. Dans l'intestin, l'expression tissu-spécifique du facteur de transcription Tcf4 rend les cellules L sensibles à la voie Wnt (Philippe & Rochat 1991 et pour revue Jin 2008). Dans le noyau, la β -caténine, un acteur majeur de la voie Wnt, se fixe au Tcf4 présent sur le G2 du promoteur du proglucagon (**FIGURE 7**). Ce complexe une fois formé induit l'expression du gène du proglucagon (Yi *et al.* 2008, Ni *et al.* 2003, Yi *et al.* 2005). Cette spécificité tissulaire d'expression de la voie Wnt permet d'expliquer comment ont lieu les régulations d'expression du proglucagon en réponse à différents signaux métaboliques. Par exemple, il a été montré au laboratoire que l'activation du récepteur nucléaire PPAR β/δ , récepteur nucléaire sensible aux acides gras et aux dérivés d'acides gras, induisait l'expression du proglucagon dans l'intestin mais pas dans les îlots pancréatiques (Daoudi *et al.* 2011). Par des expérimentations de transfections transitoires de siRNA Tcf4 et de transduction de plasmides d'expression de Tcf4, les auteurs ont pu montrer

que l'activation de PPAR β/δ augmentait l'expression du proglucagon dans les GLUTag siRNA contrôle mais pas dans les GLUTag siRNA Tcf4. Les GLUTag transduites avec un plasmide Tcf4 répondent mieux à l'activation de PPAR β/δ (Daoudi *et al.* 2011).

Une dichotomie de réponse à l'insuline des cellules L et des cellules α peut aussi s'expliquer par la voie Wnt/ β -caténine/Tcf4. En effet, dans le pancréas, l'insuline inhibe l'expression du proglucagon par un mécanisme faisant intervenir Akt (PKB) (Schrader *et al.* 2009, Schinner *et al.* 2009), cette inhibition est due à une régulation négative de l'activité du G3 (Philippe & Rochat 1991). Par contre, dans l'intestin, l'insuline stimule l'expression du gène du proglucagon en augmentant la translocation nucléaire de la β -caténine et la formation du complexe β -caténine/TCF4, augmentant ainsi l'activité du G2 du promoteur du proglucagon (Yi *et al.* 2008) (**FIGURE 7**).

L'AMPc est un second messenger intracellulaire essentiel à la réponse au GLP-1 des cellules béta et à la réponse aux acides biliaires des cellules L. Dans la cellule L, les acides biliaires en se fixant au récepteur membranaire couplé aux protéines G TGR5, augmente la concentration intracellulaire d'AMPc. Hormis la régulation de la sécrétion, l'AMPc intervient également dans la régulation de la transcription du proglucagon (**FIGURE 7 et FIGURE 12**). En effet, l'AMPc se fixe sur les sous-unités régulatrices de la protéine kinase A (PKA) ce qui libère les sous-unités catalytique de la PKA. Ces sous-unités à activité Ser/Thr kinase vont phosphoryler la protéine de fixation aux éléments de réponse de l'AMPc (CREBP) sur les résidus Ser-133 (Gonzalez *et al.* 1989). Une fois phosphorylée, cette protéine se fixe aux séquences CRE, des éléments de réponse à l'AMPc, et induit la transcription des gènes cibles. Les détails sur la production d'AMPc par la cellule L seront décrits plus loin.

3) Régulation de la transcription du proglucagon par le glucose

Récemment au laboratoire, il a été montré que le glucose augmentait la transcription et la traduction du proglucagon (Daoudi *et al.* 2011) (**FIGURE 7**). Alors que les mécanismes moléculaires de sécrétion de GLP-1 en réponse au glucose, quoique controversés, commencent à être mieux connus (voir partie suivante), les mécanismes de régulation transcriptionnelle du proglucagon par le glucose ne le sont pas du tout. Récemment, un facteur de transcription sensible aux métabolites du glucose, le facteur de transcription Carbohydre Responsive Element Binding Protein (ChREBP) a été identifié dans les cellules L murines (Habib *et al.* 2013). Les métabolites du glucose sont générés après internalisation cellulaire du glucose. Il est alors phosphorylé en Glc-6-P (glucose-6-phosphate) par la glucokinase (exprimée dans l'hépatocyte, la cellule béta mais aussi dans la cellule L (Reimann *et al.* 2008, Parker *et al.* 2012)) ou par des hexokinases. Le Glc-6-P peut alors entrer dans la voie des pentoses phosphate, générant entre autre du Xyl-5-P (xylulose-5-P), ou dans la voie de la glycolyse générant entre autre du Fru-2,6-biP (Fructose-

2,6-bisphosphate). Au niveau moléculaire, l'activation de ChREBP par le Fru-2,6-biP et le Xyl-6-P (Xylulose-6-P) permet sa translocation nucléaire. Dans le noyau, ChREBP se fixe à des éléments de réponse aux carbohydrates (ChORE) et régule l'expression des gènes des enzymes de la glycolyse et de la lipogénèse (Filhaud *et al.* 2013). Au laboratoire, ChREBP a été identifié comme interagissant avec FXR dans les hépatocytes humaines (Caron *et al.* 2013).

J'ai étudié ce mécanisme moléculaire dans les cellules L durant ma thèse.

C) Le glucose est un sécrétagogue de GLP-1

1) Les sécrétagogues de GLP-1

Beaucoup de nutriments ou de molécules libérées au cours de l'ingestion d'un repas sont capables d'induire la sécrétion de GLP-1. Cette sécrétion se fait lors de l'interaction de ces molécules avec des récepteurs membranaires présents au pôle apical des cellules L. La majorité de ces récepteurs sont des récepteurs à 7 séquences transmembranaires couplés aux protéines G (pour revue Blad *et al.* 2012). Les acides α -linoléique, palmitique et docosahexaénoïque (acides gras monoinsaturés à longue chaîne) *via* une signalisation GPR120/PKCzeta et GPR40/G α q (Hirasawa *et al.* 2005, Iakoubov *et al.* 2007) et l'oleoyléthanolamine *via* une signalisation GPR119/PLCA2 (Lauffer *et al.* 2009) sont autant de dérivés lipidiques qui induisent la sécrétion de GLP-1. La glutamine, la glycine et les dipeptides (Reimann *et al.* 2004, Samocha-Bonet *et al.* 2011, Gameiro *et al.* 2005) sont des produits du catabolisme protéique connus pour être également des sécrétagogues de GLP-1. Les fibres résistantes à la digestion, *via* leur capacité à induire une production de butyrate par le microbiote intestinal, induisent aussi une sécrétion de GLP-1 par une signalisation impliquant les récepteurs aux acides gras à chaînes courtes GPR41 (FFAR3) et GPR43 (FFAR2) (Zhou *et al.* 2008).

Durant ma thèse, je me suis plus particulièrement intéressé à la réponse au glucose des cellules L.

2) Sécrétion de GLP-1 en réponse au glucose

a) Récepteurs au goût sucré et sécrétion de GLP-1 en réponse au glucose

Détecté dans un premier temps comme un senseur du goût sucré sur la langue, l'hétérodimère Tas1R2/Tas1R3 est exprimé dans les cellules intestinales et plus précisément dans les cellules L entéroendocrines (Reimann *et al.* 2008, Steinert *et al.* 2011). Dans les

NCI-H716 et les GLUTag, l'activation de cet hétérodimère par différentes substances sucrées induit la sécrétion de GLP-1 *via* une signalisation intracellulaire impliquant la protéine G α -gustducine (Jang *et al.* 2007, Margolskee *et al.* 2007). Des études effectuées chez des souris invalidées pour l' α -gustducine et chez des souris invalidées pour la sous-unité Tas1R3 ont montré que ces souris présentaient une sécrétion de GLP-1 et d'insuline en réponse au glucose perturbée (Jang *et al.* 2007, Kokrashvili *et al.* 2009). Toutefois, l'administration de sucralose à des sujets sains n'induit pas la sécrétion de GLP-1 (Ford *et al.* 2011). De plus, l'administration de sucres non calorigènes à des patients diabétiques ou dans des iléon perfusés de rats n'induit pas de sécrétion de GLP-1 (Gregersen *et al.* 2004, Fujita *et al.* 2009, Kuhre *et al.* 2014), remettant en cause la capacité des récepteurs au goût sucré à induire la sécrétion de GLP-1 *in vivo*. Toutefois, les mécanismes les plus étudiés de sécrétion de GLP-1 en réponse au glucose font intervenir le transport de glucose.

Il existe de 2 types de mécanisme reliant le transport de glucose à la sécrétion de GLP-1 : un mécanisme dépendant d'un potentiel électrogénique mais indépendant du métabolisme du glucose, et un autre type de mécanisme lié à la métabolisation du glucose et à la fermeture des canaux potassiques dépendants de l'ATP. La part relative de l'un ou l'autre des mécanismes conduisant à la sécrétion de GLP-1 en réponse au glucose sera détaillée par la suite. Ces mécanismes impliquent différents enzymes, canaux, transporteurs et récepteurs.

b) Transport de glucose et sécrétion de GLP-1

i. Entrée du glucose dans une cellule intestinale polarisée

La bicouche lipidique de la membrane est un environnement hautement hydrophobe et la molécule de glucose est hydrophile. L'entrée du glucose dans la cellule L se fait principalement par transport actif dépendant des SGLTs et par un transport facilité assuré par des canaux, les GLUTs. L'entrée concomitante de 2 ions sodium et d'une molécule de glucose par le transporteur SGLT1 (Sodium-Glucose Transporter 1) induit un potentiel électrogénique que nous aborderons par la suite. GLUT2 est un canal qui permet l'efflux basolatéral du glucose entérocytaire. Des études chez les rongeurs montrent que ce transporteur de glucose est capable de transloquer transitoirement au niveau apical en réponse à un bolus de glucose (Gouyon *et al.* 2003, Kellett *et al.* 2008). De plus, dans des conditions physiopathologiques d'obésité, l'intestin s'adapte en exprimant de façon permanente GLUT2 au pôle apical (Ait-Omar *et al.* 2011). Ce mécanisme permet l'internalisation du glucose dans la cellule épithéliale mais aussi dans la cellule L (Mace *et al.* 2012, Gouyon *et al.* 2003, Le gall *et al.* 2007, Zheng & Sarr 2012, Kuhre *et al.* 2014). Le glucose est alors soit métabolisé par la voie de la glycolyse, soit transporté vers le pôle basolatéral (**FIGURE 9**).

ii. Potentiel électrogénique et sécrétion de GLP-1 en réponse au glucose

Parmi les transporteurs de glucose, on retrouve des membres de la famille des SGLTs (Sodium-coupled Glucose Transporters). Dans les GLUTag et les cellules intestinales épithéliales, SGLT-3 et à un moindre niveau SGLT-1 sont exprimés (Reimann *et al.* 2008). Ces transporteurs couplent le transport de sodium (selon son gradient de concentration) à un transport de glucose. L'augmentation de sodium intracellulaire va entraîner l'activation de la pompe Na⁺/K⁺ ATPase des membranes basolatérales, entraînant l'efflux de 3 ions sodium hors des cellules intestinales et l'entrée de 2 ions potassium. Cette diminution de la concentration intracellulaire de sodium par la Na⁺/K⁺ ATPase permet alors de maintenir le gradient sodique lumen-intracellulaire ainsi que la capacité de dépolarisation des membranes des cellules L. Dans les GLUTag et les cellules L isolées, le potentiel électrogénique généré par les 2 ions sodium entrant par SGLT1 est suffisant pour induire une dépolarisation membranaire à l'origine de la libération des vésicules de GLP-1 (Parker *et al.* 2012, Reimann *et al.* 2008). Parce que les analogues non métabolisables de glucose mais substrats de SGLT1 augmentent la sécrétion de GLP-1 par les cellules L (Parker *et al.* 2012, Reimann *et al.* 2008, Ritzel *et al.* 1997), des efforts furent entrepris pour identifier la part relative de cette voie. L'utilisation de la phlorézine, inhibiteur pharmacologique de SGLTs, *in vitro* dans les GLUTag et *in vivo* chez la souris réduit la sécrétion de GLP-1 induite par le glucose (Gribble *et al.* 2003, Moriya *et al.* 2009) (**FIGURE 9**).

iii. Production d'ATP et sécrétion de GLP-1 en réponse au glucose

Alors que, dans des intestins perfusés de rat, l'inhibition des SGLT avec la phlorézine ne diminue que de 45% la sécrétion de GLP-1 en réponse au glucose, l'administration d'un inhibiteur des GLUTs inhibe totalement la réponse au glucose de la cellule L (Mace *et al.* 2012). Les GLUTs sont des canaux membranaires qui assurent un transport de glucose selon son gradient de concentration. Alors que les GLUTag expriment principalement les transporteurs au glucose GLUT-1 et GLUT-5, les cellules épithéliales intestinales expriment en plus le transporteur GLUT-2 (Reimann *et al.* Cell metab 2008). *In vitro*, la majorité du glucose entre dans la cellule L par les GLUTs. En effet, la fluorescence d'une sonde sensible à la quantité intracellulaire de glucose est complètement inhibée lorsque l'ajout de glucose se fait en présence de phlorétine, un inhibiteur des GLUTs (Parker *et al.* 2012).

Une fois dans la cellule L, le glucose est rapidement phosphorylé par la glucokinase (Reimann *et al.* 2008, Parker *et al.* 2012). Le glucose-6-phosphate généré ne peut plus quitter la cellule et est métabolisé notamment par la voie de la glycolyse. Alors qu'un

activateur pharmacologique de la glucokinase induit la sécrétion de GLP-1 dans les GLUTag, ce phénomène n'est pas présent dans les cellules épithéliales intestinales (Parker *et al.* 2012). Cela peut être dû à la difficulté de complètement dépriver ces cellules en glucose ou à une perte de la structure intestinale. Après action des différents enzymes de la glycolyse, le glucose produit du pyruvate et 7 ATP. Ce pyruvate entre dans la mitochondrie où il permet la production *via* le cycle de l'acide citrique (cycle de Krebs) de 25 ATP supplémentaires (Reimann *et al.* 2004). Il est maintenant admis qu'une partie de la sécrétion de GLP-1 en réponse au glucose nécessite la fermeture des canaux potassiques ATP-dépendants (Gribble *et al.* 2003, Kuhre *et al.* 2014). Ces canaux sont composés d'un hétérodimère Kir6.2/Sur1. L'utilisation de sulfonylurées inhibitrices de Sur1 telles que le glibenclamide, le glicazide ou le tolbutamide a permis de montrer à la fois *in vitro* et *in vivo* que la fermeture de ces canaux induisait la sécrétion de GLP-1 (Kuhre *et al.* 2014, Parker *et al.* 2012, Gribble *et al.* 2003). La dépolarisation de la membrane qui suit la fermeture des canaux potassiques ATP-dépendants conduit à l'ouverture de canaux calciques dépendants du voltage et à l'augmentation de calcium intracellulaire (Lan *et al.* 2012, Reimann *et al.* 2008). Ce phénomène conduit au relargage des vésicules à GLP-1. Alors que ce mécanisme est clé dans la sécrétion de GLP-1 en réponse au glucose dans les GLUTag, ce mécanisme semble coopérer avec des mécanismes indépendants du métabolisme du glucose dans les IEC ou dans un mélange de cellules intestinales enrichies en cellules L (Ritzel *et al.* 1996, Reimann *et al.* 2012, Parker *et al.* 2012) (**FIGURE 9**).

3) Vers un compromis ?

Les souris invalidées pour SGLT-1 (Gorboulev *et al.* 2012) présentent une réduction de la sécrétion de GLP-1 en réponse au glucose. De plus, l'inhibition par la phlorézine des SGLTs inhibe totalement la sécrétion de GLP-1 à la fois dans les GLUTag mais aussi dans les IEC (Parker *et al.* 2012). Dans les IEC, le potentiel électrogénique généré par les ions Na⁺ lors de l'entrée du glucose par les SGLTs est suffisant pour induire la sécrétion de GLP-1 par un mécanisme indépendant du métabolisme du glucose (Parker *et al.* 2012). Dans des intestins perfusés de rat, il a été montré que le sodium était nécessaire à la réponse au glucose des cellules L allant dans le sens d'un rôle clé des SGLTs (Mace *et al.* 2012, Kuhre *et al.* 2014). Toutefois, dans ces intestins perfusés, l'inhibition des SGLTs ne diminue que de 45% la sécrétion de GLP-1 en réponse au glucose et l'inhibition des GLUTs par la phlorétine inhibe totalement la réponse des cellules L au glucose (Mace *et al.* 2012). Pour mieux comprendre cette dichotomie entre réponses au glucose dépendant ou non du métabolisme du glucose, une étude récente a utilisé, dans des intestins perfusés de rat, des activateurs/inhibiteurs des différentes voies (Kuhre *et al.* 2014) (**FIGURE 9**). L'administration d'un sucre non métabolisable mais ligand des récepteurs au goût sucré Tas1R2/Tas1R3

n'induit pas la sécrétion de GLP-1. Administré dans la veine porte, le glucose est incapable d'induire la sécrétion de GLP-1, éliminant ainsi l'hypothèse d'un rôle des transporteurs au glucose du pôle basolatéral dans la sécrétion de GLP-1. Les cellules L perdent leur capacité à sécréter GLP-1 lorsque les SGLTs sont inhibés par la phlorézine. De plus, les cellules L sécrètent beaucoup moins de GLP-1 en réponse au glucose lorsque les GLUTs sont inhibés par la phlorétine. Cette sécrétion est dépendante de l'ATP car l'inhibition de la phosphorylation oxydative mitochondriale par le 2,4-dinitrophénol empêche les cellules L de répondre au glucose. Dans ce modèle, la sécrétion de GLP-1 est induite par une sulphonylurée et inhibée par le diazoxide montrant, *in vivo* chez le rat, des canaux potassiques fonctionnels dans les cellules L.

Pris dans leur ensemble, ces résultats permettent 3 conclusions : 1) les récepteurs au goût sucré et les transporteurs de glucose basolatéraux ne sont pas impliqués dans la réponse au glucose des cellules L, 2) les SGLTs sont impliqués dans l'initiation de la sécrétion de GLP-1 par le glucose et 3) les GLUTs sont nécessaires pour une réponse au glucose pleine et entière de la cellule L en terme de sécrétion de GLP-1 (**FIGURE 9**). Au final, SGLT-1 serait un senseur de glucose qui induirait la translocation au pôle apical de GLUT2 des cellules L permettant ainsi une sécrétion pleine et entière de GLP-1 en réponse au glucose. Cela expliquerait à la fois pourquoi le glucose n'induit pas de sécrétion de GLP-1 après inhibition de SGLT-1 car pas d'initiation de la translocation apicale des GLUTs mais aussi pourquoi l'inhibition des GLUTs n'induit pas de sécrétion de GLP-1 car pas d'amorçage de la sécrétion. La dichotomie entre IEC et intestins perfusées pourrait aussi s'expliquer par une perte de l'externalisation de GLUT2. Des travaux tels que l'inhibition de GLUT2 spécifiquement dans la cellule L ou le suivi d'une forme fluorescente de GLUT2 dans la cellule L après un bolus de glucose permettrait de répondre à une telle hypothèse.

D) Rôles physiologiques de GLP-1

1) Le récepteur au GLP-1

Les rôles métaboliques de GLP-1 résultent de la fixation de GLP-1 à un récepteur à 7 séquences transmembranaires couplé aux protéines G : le GLP-1R. Chez l'Homme, ce récepteur de 463 acides aminés est exprimé dans les cellules β des îlots pancréatiques, dans les cellules acineuses du pancréas, les cellules musculaires lisses des vaisseaux (notamment dans la veine porte), les myocytes du nœud sinusal de l'atrium droit cardiaque, les glandes de Brunner de la sous-muqueuse duodénale, dans le plexus myentérique intestinal ainsi que dans les artérioles rénales (Pyke *et al.* 2014). L'étude du rôle de l'invalidation du GLP-1R chez la souris (souris *Glp-1r*^{-/-}) a permis de mieux appréhender la contribution de GLP-1 sur la régulation du métabolisme énergétique. Alors que ces souris

présentent un comportement alimentaire et une masse équivalente aux souris sauvages (WT), elles sont hyperglycémiques à jeun et leur tolérance au glucose (administré par voie orale ou intrapéritonéale) est anormale. Elles présentent aussi une hausse de la production et de la sécrétion de GIP et une sécrétion de lipoprotéines intestinales anormales. De plus, la signalisation de l'adénylate cyclase (AC) et du calcium est perturbée dans les îlots de ces souris ; îlots présentant également une taille et une topographie anormales. Enfin et de manière surprenante, ces souris présentent une sensibilité à l'insuline améliorée.

2) Effets pléiotropes de GLP-1⁽¹⁾

Une fois sécrété dans la veine porte, GLP-1 exerce ses effets bénéfiques sur la régulation de l'homéostasie énergétique *via* différents organes (**FIGURE 10**). Le rôle le plus décrit est la capacité de GLP-1 à potentialiser la sécrétion d'insuline par les cellules β pancréatiques en réponse au glucose, c'est l'effet incrétine (**FIGURE 7**). Dans la veine porte, GLP-1 peut se fixer au GLP-1R des afférences du nerf vague et exercer ses effets *via* le système nerveux central (SNC). D'autres mécanismes *via* une activation directe du GLP-1R de l'organe en question ou en coopération avec une signalisation nerveuse centrale ont aussi été identifiés. Je donnerai quelques exemples de l'implication de GLP-1 sur la physiologie (**FIGURE 10**).

a) Effets pancréatiques de GLP-1

Le rôle majeur de GLP-1 sur la régulation de l'homéostasie glucidique semble essentiellement être un rôle pancréatique. En effet, la restauration de l'expression du GLP-1R spécifiquement dans le pancréas de souris *Glp-1r^{-/-}* est suffisant pour rétablir une normoglycémie (Lamont *et al.* JCI 2012). Dans les cellules β de l'îlot de Langerhans, l'activation de GLP-1R par le GLP-1 conduit à l'activation de la sous-unité Gas de la protéine G hétérotrimérique. Cette sous-unité active l'AC qui va alors produire de l'AMPc à partir d'ATP. Cette hausse de la concentration intracellulaire d'AMPc induit la synthèse d'insuline *via* une signalisation dépendante ou non de la PKA et la sécrétion d'insuline *via* une signalisation dépendante de l'isoforme 2 de la protéine d'échange directement activée par l'AMPc (EPAC2 pour Exchange Protein Directly Activated by cAMP 2) et de la PKA.

i. Effets de GLP-1 sur la production et la sécrétion d'insuline

⁽¹⁾ sources : Pharmacology, Physiology and Mechanisms of Incretin Hormone, www.glucagon.com, Biology of the incretins GIP and GLP-1.

Concernant l'augmentation de la synthèse d'insuline par GLP-1, deux mécanismes indépendants et un mécanisme dépendant de la PKA ont été identifiés. L'AMPc augmente les niveaux d'expression du gène de l'insuline et stabilise son ARN messager (Wang *et al.* 1995, Lupi *et al.* 2010). En effet, la fixation de l'AMPc aux 2 sous-unités régulatrices de la PKA va permettre la dissociation de celles-ci des 2 sous-unités catalytiques. Ces sous-unités vont phosphoryler et activer les protéines de fixation des éléments de réponses à l'AMPc (CREBP). CREBP phosphorylé va alors dans le noyau se fixer à ses éléments de réponse (CRE) situés dans le promoteur de gènes cibles tels que l'insuline (Drucker *et al.* 1987). La voie de stimulation par GLP-1 de la transcription de l'insuline indépendante de la PKA implique à la fois un facteur de transcription de la famille de CREBP non sensible à la PKA (Skoglund *et al.* 2000) mais aussi la voie p38 MAPK qui, une fois stimulée, augmente l'activité du promoteur de l'insuline (Kemp & Habener 2001).

De plus, en phosphorylant une protéine du complexe SNARE, la snapin, et en collaboration avec une augmentation de la concentration intracellulaire de Ca²⁺, la PKA est aussi capable d'induire l'exocytose des vésicules à insuline (Song *et al.* 2011) ainsi que la phosphorylation stabilisatrice des canaux Kir6.2/Sur1. L'induction de la sécrétion d'insuline en réponse au GLP-1 est abolie lorsqu'EPAC2 est inhibée ou lorsque les cellules sont transfectées par une isoforme mutée d'EPAC2 insensible à l'AMPc (Ozaki *et al.* 2000). De plus, l'activation d'EPAC2 par un analogue de l'AMPc sélectif pour EPAC2 dans des lignées cellulaires ou dans des îlots isolés améliore la réponse au glucose de la cellule β (Kang *et al.* 2003, Eliasson *et al.* 2003). EPAC2 exerce ses effets sur la sécrétion d'insuline en interagissant avec Rim2, une protéine d'ancrage des vésicules à insuline à la membrane plasmique des cellules β (Ozaki *et al.* 2000, Kashima *et al.* 2001, Fujimoto *et al.* 2002) et par Rab3a, une GTP-ase associée aux vésicules d'insuline lorsqu'elle lie le GTP (Park *et al.* 2011). De plus, EPAC2 interagit avec Sur1 (Bos 2006, Li *et al.* 2010, Eliasson *et al.* 2003) et inhibe les canaux Sur1/Kir6.2 (Kang *et al.* 2006). Finalement, EPAC2 agit sur la sécrétion d'insuline potentialisée par GLP-1 en amplifiant l'augmentation de la concentration intracellulaire de calcium par le glucose. En effet, le glucose induit la sécrétion d'insuline par fermeture des canaux potassiques ATP-dépendants, fermeture qui se traduit par une dépolarisation membranaire et une ouverture des canaux calciques voltage-dépendants. De manière concomitante, la fixation de GLP-1 à son récepteur active EPAC2. EPAC2 ouvre alors les canaux calciques sensibles à la ryanodine (RyR) du réticulum endoplasmique ce qui accroît encore la concentration intracellulaire de calcium. Ces hausses de calcium intracellulaires amplifient alors la sécrétion d'insuline en réponse au GLP-1 (Flamez *et al.* 1999, Kang *et al.* 2001, Kang *et al.* 2003).

ii. Effets de GLP-1 sur la masse des cellules β

GLP-1 est capable d'augmenter la masse des cellules β pancréatiques en inhibant leur apoptose (Kwon *et al.* 2009, Kwon *et al.* 2004, Ranta *et al.* 2006, Natalicchio *et al.* 2010). L'activation du GLP-1R diminue la lipotoxicité des acides gras sur la cellule β par une signalisation AMPc/EPAC2 (Kwon *et al.* 2004). L'activation du GLP-1R protège également les îlots de souris et les cellules INS1 d'une mortalité induite par la dexaméthasone par une signalisation dépendante de l'AMPc et de la PKA mais indépendante d'EPAC2 (Ranta *et al.* 2006). L'exendine-4 prévient également de l'apoptose induite par des éléments pro-inflammatoires tels que le TNF α en inhibant, grâce à la PKA, la phosphorylation de JNK (Natalicchio *et al.* 2010).

iii. Effets de GLP-1 sur la sécrétion du glucagon

GLP-1 est capable d'inhiber la sécrétion du glucagon (De Marinis Cell Metab 2010). Cette inhibition passerait par l'induction de la sécrétion d'insuline ou de somatostatine, molécules inhibitrices de glucagon (Le marchand JBC 2010, Ravier Diabetes 2005). De plus, les récepteurs au GLP-1 des cellules α pancréatiques ne représentent que 0.2% des GLP-1R des cellules β (De Marinis *et al.* 2010). Toutefois, à une concentration de glucose de 1mM, concentration trop faible pour induire une sécrétion d'insuline, GLP-1 diminue la sécrétion de glucagon dans les îlots de souris (De Marinis *et al.* 2010). De plus, on observe toujours la diminution de la sécrétion de glucagon par GLP-1 après inhibition du récepteur à la somatostatine. Cet effet direct de GLP-1 sur la sécrétion de glucagon se fait par une diminution AMPc- et PKA-dépendante de l'activité du canal calcique dépendant du voltage Cav_{2.2} (De Marinis *et al.* 2010).

b) Effets de GLP-1 *via* le système nerveux central (SNC)

i. Effets de GLP-1 sur la vidange gastrique et le péristaltisme intestinal

Le fait qu'une corrélation inverse existe entre la vidange gastrique et la concentration plasmatique de GLP-1 (Wishart *et al.* 1998) a permis à certains auteurs d'émettre l'hypothèse que les effets de GLP-1 sur la vidange gastrique étaient aussi importants voire plus importants que l'effet incrétine (Little *et al.* 2006, Meier *et al.* 2005). En effet, l'administration de GLP-1 ralentit de manière dose-dépendante la vidange gastrique. Chez le patient diabétique de type 2, cette diminution en réponse à une faible dose de GLP-1, dose trop faible pour induire une sécrétion d'insuline, diminue l'apparition du glucose sanguin après bolus (Meier *et al.* 2003). De plus, l'administration d'une haute concentration d'un inhibiteur de DPP-4 supprime totalement la vidange gastrique (Waget *et al.* 2011). D'un point de vue mécanistique, l'effet de GLP-1 sur la vidange gastrique semble être sous contrôle du système nerveux central (SNC). Une vagotomie empêche l'action inhibitrice de GLP-1 sur la

vidange gastrique (Wettergren *et al.* 1997, Waget *et al.* 2011). Des résultats similaires ont été observés chez le rat (Imeryüz *et al.* 1997). Chez le porc et chez l'Homme, cette signalisation vagale de GLP-1 intervient également dans le ralentissement du péristaltisme intestinal (Wettergren *et al.* 1998, Schirra *et al.* 2000, Schirra *et al.* 2002).

ii. GLP-1, SNC, satiété et prise alimentaire

GLP-1 joue un rôle clé dans le phénomène de satiété. Le GLP-1 des cellules L intestinales peut traverser la barrière hématoencéphalique. De plus, une fois sécrété dans la veine porte, GLP-1 se fixe sur les afférences du nerf vague (nerf crânien X). Les prolongements du nerf vague dans le noyau du tractus solitaire du tronc cérébral vont communiquer avec le noyau paraventriculaire de l'hypothalamus ce qui va induire une hausse de la sécrétion des peptides anorexigènes POMC et CART. Les GLP-1R sont exprimés tant au niveau génique que protéique dans le ganglion plexiforme de rat, plexus nerveux connu pour réguler le métabolisme énergétique *via* notamment une régulation de la prise alimentaire (Vahl *et al.* 2007). De plus, GLP-1 est aussi produit dans le noyau caudal du NTS (Noyau du tractus solitaire) et sa production est augmentée chez des rats obèses diabétiques (Goldstone *et al.* 2000, Vrang *et al.* 2008).

GLP-1 est aussi impliqué dans la prise alimentaire. En effet, des études menées chez le rongeur montrent que l'administration périphérique ou cérébrale d'agonistes de GLP-1 diminue la prise alimentaire (Turton *et al.* 1996, Tang-Christensen *et al.* 1996, Meeran *et al.* 1999, Szayna *et al.* 2000, Suzuki *et al.* 2012). Chez la souris, l'administration en i.p. d'un agoniste de GLP-1R trop volumineux pour passer la barrière hématoencéphalique diminue toujours la prise alimentaire (Baggio *et al.* 2004). De plus, ces effets sont perdus chez les rats vagotomisés (Abbott *et al.* 2005). Ces résultats montrent que GLP-1 joue un rôle crucial dans la prise alimentaire par son interaction avec les afférences du nerf vague. De plus, des résultats récents montrent également une inhibition de la prise alimentaire et de la réponse cérébrale à des stimuli visuels par l'Exendin-4 chez des patients diabétiques de type 2 et chez des patients obèses (van Bloemendaal *et al.* 2014).

iii. GLP-1, SNC et utilisation du glucose

GLP-1 régule également l'homéostasie glucidique de manière indépendante du GLP-1R pancréatique mais dépendante du GLP-1R des afférences du nerf vague. L'administration intragastrique d'une faible dose de glucose, dose insuffisante pour augmenter la glycémie systémique, induit la glyco-génèse dans le muscle (Knauf *et al.* 2008). De plus, le glucose injecté dans la veine porte est mieux utilisé par les tissus périphériques que lorsqu'il est administré dans la veine fémorale (Burcelin *et al.* 2001). Cette amélioration de l'utilisation du glucose est atténuée lorsque la signalisation du GLP-1R est inhibée par

l'Exendine-9 (Burcelin *et al.* 2001). L'Exendine-4 injectée dans la veine porte améliore la disparition du glucose portal, cet effet n'est pas observé dans les souris *Glp-1r/-* (Waget *et al.* 2011). Les auteurs montrent également que cette amélioration de l'utilisation du glucose par les tissus périphériques par la voie GLP-1 est due à une communication GLP-1R des afférences du nerf vague intestinal liée à une hausse d'insuline. De plus, des injections intracérébroventriculaires (i.c.v.) d'Exendin-4 augmente la sécrétion d'insuline pendant un clamp hyperglycémique dans des souris WT. Cet effet est aboli dans des souris *Glp-1r -/-* (Knauf *et al.* 2005). Cette étude met en lumière le rôle de la communication intestin/cerveau/pancréas dans le métabolisme du glucose (Waget *et al.* 2011). D'un point de vue mécanistique, l'administration intragastrique d'une faible dose de glucose augmente l'expression de c-Fos dans le cerveau (Knauf *et al.* 2008). Cette activation de c-Fos par le glucose dans le SNC est diminuée chez les souris insulino-résistantes.

c) Effets de GLP-1 sur la sensibilité à l'insuline

Même si les récepteurs au GLP-1 ne sont pas connus pour être exprimés dans tous les tissus périphériques sensibles à l'insuline (tissus adipeux, foie ou muscles squelettiques), différentes études montrent qu'un traitement chronique avec des agonistes du récepteur au GLP-1 est associé à une meilleure insulino-sensibilité. Chez des patients obèses diabétiques de type 2, l'administration chronique pendant 6 semaines (Zander *et al.* 2002) ou 12 semaines (Meneilly *et al.* 2003) de GLP-1 augmente la sensibilité à l'insuline (mesurée par des clamps euglycémiques hyperinsulinémiques). Une étude réalisée chez des patients obèses non diabétiques montre que GLP-1 augmente l'assimilation du glucose dépendante de l'insuline (Egan *et al.* 2002). Cette dépendance à l'insuline fut confirmée car absente chez des patients diabétiques de type 1 traités par un agoniste de GLP-1R (Meneilly *et al.* 2003). Chez le chien ayant subi une pancréatectomie, GLP-1 augmente l'utilisation du glucose que lorsqu'il est co-administré à de l'insuline (Sandhu *et al.* 1999). Il est clair au vue de ces études que GLP-1 améliore l'utilisation du glucose par les tissus périphériques tels que le foie, les tissus adipeux et les muscles *via* une signalisation vagale.

d) Effets du GLP-1 sur le système cardiovasculaire

i. GLP-1, vaisseaux sanguins et pression sanguine

Le récepteur au GLP-1 est exprimé spécifiquement dans l'oreillette droite cardiaque. De plus, il est exprimé au niveau cérébral dans le noyau du tractus solitaire et dans l'*area postrema*, 2 régions régulatrices de la fonction cardiaque. Administré pendant 3 mois à des patients obèses non diabétiques, l'exendin-4 n'a pas d'effets sur la fonction microvasculaire endothéliale, l'inflammation et le stress oxydatif (Kelly *et al.* 2012). Deux méta-analyses et une étude de cohorte réalisées sur des patients diabétiques de type 2 présentant une

hypertension artérielle modérée ont montré que l'administration d'agonistes du récepteur au GLP-1 diminuait la pression sanguine (Okerson *et al.* 2009, Blonde & Russell-Jones 2009, Ferdinand *et al.* 2014). Administrée dans le cerveau pendant 3 heures lors d'un clamp hyperinsulinémique-hyperglycémique, l'exendine-4 diminue la pression sanguine (Cabou *et al.* 2008). Cette diminution de la pression sanguine est associée à une diminution des espèces réactives de l'oxygène (ROS) dans l'hypothalamus et à une augmentation de l'activité vagale (Cabou *et al.* 2008). Chez la souris, ces effets des agonistes de GLP-1 sur la pression sanguine se font *via* la sécrétion du facteur natriurétique auriculaire (ANF), une hormone sécrétée par l'oreillette droite du cœur aux propriétés myorelaxante qui favorise l'élimination rénale de sodium (Kim *et al.* 2013). De plus, l'administration d'un antagoniste du GLP-1R au niveau central bloque l'action bénéfique des agonistes du GLP-1R supposant que cet effet de GLP-1 est dépendant d'une signalisation nerveuse centrale (Barragán *et al.* 1999). Ce dernier résultat a été conforté par une étude récente montrant que les effets cardioprotecteurs de GLP-1 étaient toujours présents chez des souris invalidées pour le GLP-1R spécifiquement dans le cardiomyocyte (Ussher *et al.* 2014). Ces études, et d'autres (Ban *et al.* 2008, Bose *et al.* 2005 et pour revue Ravassa *et al.* 2012), montrent que le GLP-1, le Liraglutide et l'Exenatide ont des effets cardioprotecteurs notamment en diminuant l'hypertension artérielle.

ii. GLP-1 et athérosclérose

Administré pendant 4 semaines chez des souris ApoE^{-/-} GLP-1 prévient l'apparition des lésions athérosclérotiques en inhibant le développement de la néointima (Goto *et al.* 2011). Il réduit également la taille des plaques et l'infiltration des macrophages dans l'aorte (Nagashima *et al.* 2011). De plus, l'activation chronique du GLP-1R diminue l'infiltration des monocytes dans les aortes des souris ApoE^{-/-} (Arakawa *et al.* 2010). Une étude de cohorte de patients traités ou non avec un inhibiteur de DPP-4 est en cours pour déterminer si la voie GLP-1 peut être une cible pour traiter l'athérosclérose (Katakami *et al.* 2013).

E) Importance thérapeutique de la voie de GLP-1⁽¹⁾

Chez les patients diabétiques de type 2 l'effet incrétine est réduit (Nauck *et al.* 1986). De plus et contrairement à GIP, GLP-1 est toujours capable de potentialiser la sécrétion d'insuline en réponse au glucose, et cela sans induire d'hypoglycémies (Nauck *et al.* 1993, Vilsbøll *et al.* 2002). Une perfusion de GLP-1 est capable de restaurer la sécrétion d'insuline

⁽¹⁾ les données sur la posologie sont disponibles sur le site : www.base-donnees-publique.medicaments.gouv.fr

en réponse au glucose chez les patients DT2 (Kjems *et al.* 2003, Vilsbøll *et al.* 2002). Enfin, l'administration intraveineuse d'une dose supra-physiologique de GLP-1 est capable de restaurer la glycémie à jeun (Nauck *et al.* 1997, Toft-Nielsen *et al.* 2001). Ces observations ont mené les industries pharmaceutiques à développer des analogues de GLP-1 non hydrolysables par la DPP-4, et des inhibiteurs de DPP-4 augmentant la demi-vie de GLP-1 ; 2 stratégies actuellement utilisée en combinaison avec la Metformine ou avec l'insuline recombinante pour soigner les patients diabétiques de type 2.

1) Les analogues de GLP-1

Administrés par voie sous cutanée à des patients diabétiques de type 2 (5 à 10 µg, 2 fois par jour), les analogues de GLP-1 sont des peptides conçus pour se fixer et activer le récepteur au GLP-1. Il existe aujourd'hui 2 principaux analogues de GLP-1, l'Exénatide et le Liraglutide. L'Exénatide (ou Exendine 4, Byetta®) est un peptide isolé de la glande salivaire et de la salive d'un lézard, le monstre de Gila (*Heloderma suspectum*) (Eng *et al.* 1992). Sa séquence protéique est similaire à 53% à celle du GLP-1 7-36amide humain. En utilisant un analogue de GLP-1 radiomarqué par l'iode-125 de GLP-1, des études ont montré que l'Exendine-4 fixe le GLP-1R présent à la surface d'îlots pancréatiques de rat et humains (Goke *et al.* 1993, Thorens *et al.* 1993) et stimule la production intracellulaire d'AMPc ainsi que la sécrétion d'insuline en réponse au glucose (Goke *et al.* 1993). Huit acides aminés en aval de la position NH₂ terminale, l'Exendine-4 possède une glycine à la place d'une alanine, rendant ce peptide insensible à la DPP-4 ; sa demi-vie est de 26 minutes chez l'Homme (Edwards *et al.* 2001). En plus d'être un outil thérapeutique clé dans l'arsenal de lutte contre le diabète, cette molécule ainsi que sa forme tronquée, l'Exendine-9 (antagoniste du GLP-1R), sont des outils de recherche permettant de mieux appréhender *in vivo* les actions potentielles de GLP-1. Le Liraglutide est un analogue de GLP-1 où la molécule de GLP-1 est liée de manière covalente à l'albumine conférant au GLP-1 la stabilité de cette grosse molécule tout en conservant l'activité insulinothèque du GLP-1. Un nouvel agoniste du GLP-1R, le Lixisenatide, présente la capacité supplémentaire de freiner la vidange gastrique et de diminuer l'excursion dans le plasma du glucose en période postprandiale (Christensen *et al.* 2014). Ces agonistes présentent l'inconvénient d'être administrés par voie sous-cutanée. Après 2 injections de 5 à 10 µg/j, les analogues de GLP-1 diminuent d'environ 1% l'hémoglobine glycosylée (HbA1C) (Amori *et al.* 2007). Toutefois, le risque d'hypoglycémie (25% des cas) et l'apparition de nausées (36 à 57% des cas) chez les patients soignés avec ces analogues sont conséquents (Kendall *et al.* 2005, Heine *et al.* 2005). De nouveaux analogues stables pendant une semaine voire un mois sont en cours de développement pour diminuer le nombre d'injections aux patients ainsi que le nombre d'événements hypoglycémiques.

2) Les inhibiteurs de DPP-4

Les inhibiteurs de DPP-4 de la classe des gliptines sont des petites molécules de familles chimiques différentes. Comme leur nom l'indique, ils inhibent sélectivement et totalement la DPP-4, augmentant ainsi de 4 à 6 fois la concentration circulante de GLP-1 endogène actif (Drucker 2007). Contrairement aux analogues de GLP-1, ces molécules présentent l'avantage d'être administrées par voie orale (posologie : 1 comprimé de 100 mg par jour). Ces inhibiteurs augmentent la sécrétion d'insuline, diminuent la sécrétion de glucagon et freinent la production hépatique de glucose sans risque d'hypoglycémie (Richter *et al.* 2008). Les effets bénéfiques de ces inhibiteurs semblent dus, chez la souris, à une inhibition de DPP-4 au niveau intestinal (Waget *et al.* 2011). En effet, administrés *per os* mais pas en *i.p.*, les iDPP-4 augmentent la concentration portale de GLP-1 et d'insuline et diminuent la glycémie des souris diabétiques par un mécanisme faisant intervenir les GLP-1R des afférences du nerf vague (Waget *et al.* 2011). Ces effets des iDPP-4 sont perdus chez les souris *Glp-1r-/-*. De plus, chez l'animal, ces inhibiteurs ont tendance à augmenter la masse des cellules β en inhibant leur apoptose et en stimulant la néogénèse pancréatique (Amori *et al.* 2007). Ces résultats sont confirmés récemment chez la souris *db/db* où le traitement pendant 6 semaines avec un inhibiteur de DPP-4 améliore la glycémie de ces souris en diminuant l'apoptose des cellules β pancréatiques, phénomène expliqué par une diminution de l'activité de la caspase 3 et de l'expression des gènes du stress du réticulum (Wu *et al.* 2015). Chez des patients diabétiques de type 2 présentant des facteurs de risques cardiovasculaires, la Saxagliptine (Onglyza®) est un iDPP-4 bien toléré qui induit une diminution de 0.7% de l'HbA1C, de 16 mg/dL de la glycémie à jeun et de 36 à 47 mg/dL de la glycémie 120 minutes après un repas test (Toth 2015). Les chefs de liste de ces molécules sont la Vidagliptine (Galvus®) et la Sitagliptine (Januvia®). L'efficacité des inhibiteurs de DPP-4 en terme de diminution de l'hémoglobine glycosylée est similaire à celle des analogues de GLP-1.

3) Quelques molécules prometteuses...

D'autres molécules ciblant spécifiquement la capacité de la cellule L à augmenter la sécrétion endogène de GLP-1 sont des candidats pharmacologiques pour améliorer la glycémie des patients diabétiques de type 2.

a) Les inhibiteurs de SGLT1

De manière étonnante au vue de l'importance de SGLT-1 sur la sécrétion de GLP-1 chez la souris, la déficience en *Sglt1* améliore la glycémie (Gorboulev *et al.* 2012). Dans différents modèles de souris hyperglycémiques, l'administration d'un inhibiteur de SGLT1 améliore également le métabolisme du glucose (Powell *et al.* 2013, Zambrowicz *et al.* 2012).

Toutefois, cela semble être la résultante d'un défaut d'absorption intestinal de glucose et d'une présence de glucose dans l'intestin distal, ce glucose permettant de faire sécréter plus de GLP-1.

b) Les inhibiteurs d' α -glucosidases

Seuls les oses sous forme de monosaccharide peuvent passer la barrière intestinale. La digestion des polymères d'oses commence dans la salive par l'action des amylases salivaires et se poursuit dans le duodénum par l'action des sucs pancréatiques générant ainsi saccharose, lactose et maltose. Les α -glucosidases (saccharase, maltase et isomaltase) sont des enzymes entérocytaires de la bordure en brosse surtout présentes dans l'intestin grêle proximal qui hydrolysent les liaisons α 1-4 des disaccharides produisant ainsi des monosaccharides facilement absorbables (Dinneen *et al.* 1992). Actuellement utilisés comme antidiabétiques ne générant que peu d'effets secondaires graves (flatulence, diarrhées ou inconfort abdominal), l'acarbose (*Glucor®*) et le miglitol (*Diastabol®*) sont, de par leur structure proche des oses, 2 inhibiteurs compétitifs d' α -glucosidase. Une fois ingérés avant chaque repas (posologie : 50 à 100 mg, 3 fois par jour), ils retardent l'absorption intestinale de glucose améliorant ainsi l'hyperglycémie post-prandiale des patients diabétiques (Lee *et al.* 2002). Ils diminuent l'HbA1c de 0.5% et leurs effets sont cumulatifs à ceux des inhibiteurs de DPP-4 (Imai *et al.* 2014). Récemment, il a été montré que le miglitol administré en aigu une fois par jour à des sujets sains n'entraînait la sécrétion de GLP-1 que lorsqu'il était administré avant un repas (Aoki *et al.* 2010). Cet effet se retrouve aussi chez des patients obèses où l'administration de miglitol diminue la glycémie postprandiale, augmente la sécrétion de GLP-1 (Arakawa *et al.* 2008). Administré de manière chronique à des patients diabétiques, le miglitol améliore la glycémie en augmentant la sécrétion de GLP-1 et en diminuant la vidange gastrique. De plus, un suivi sur 6 mois de patients obèses diabétiques montre une diminution de masse corporelle de 2,3 kg (Lee *et al.* 2002 ; Narita *et al.* 2009). Chez la souris, le miglitol induit la sécrétion de GLP-1 induite par le maltose par un mécanisme dépendant de SGLT3 (Lee *et al.* 2015), un transporteur au glucose exprimé dans les cellules L (Gribble *et al.* 2003). De plus, dans un modèle de souris diabétiques, une étude a montré que le miglitol par lui-même n'était pas un sécrétagogue de GLP-1 mais qu'il potentialisait la sécrétion de GLP-1 après un repas (Hamada *et al.* 2013).

PARTIE III : Les acides biliaires sont des molécules régulatrices de l'homéostasie énergétique *via* le récepteur membranaire TGR5

A) Synthèse et recyclage des acides biliaires

1) Synthèse des acides biliaires

Les acides biliaires sont des molécules solubles amphipatiques synthétisées dans les hépatocytes périverneux à partir du cholestérol (**FIGURE 11**) (Twisk *et al.* 1995). La propriété amphipatique des acides biliaires est due à une face apolaire constituée du noyau stérol et à des groupements hydroxyles hautement polaires. Dans le foie, au moins 17 réactions enzymatiques interviennent dans la modification du noyau du cholestérol. La réaction limitante dans la production des acides biliaires est l'hydroxylation en α du carbone 7 du cholestérol par l'enzyme réticulaire, la cholestérol-7- α -hydroxylase (Cyp7a1) pour donner le 5-cholestérol-3 β ,7 α -diol. Toutefois, en 1996 puis confirmées en 2001 et en 2006, des études ont montré que les souris déficientes pour le gène codant la Cyp7a1 présentaient toujours, quoique réduite de 75%, une production d'acides biliaires (Schwarz *et al.* 1998, Ishibashi *et al.* 1996). Ces résultats ont mené à l'identification de la voie alternative (ou voie acide) de production des acides biliaires, dépendante de l'hydroxylation du cholestérol en positions 25 ou 27 respectivement par l'enzyme réticulaire cholestérol 25-hydroxylase (CH25H) ou l'enzyme mitochondriale stérol 27-hydroxylase (Cyp27A1) suivie de l'hydroxylation du 27-hydroxycholestérol en position 7 par la 25-hydroxycholestérol 7- α -hydroxylase (Cyp7B1). Le 5-cholestérol-3 β ,7 α -diol subit différentes réactions enzymatiques qui mènent à la production chez l'Homme des acides choliques (CA) et chénodéoxycholiques (CDCA) (Pour revue, Lefebvre *et al.* 2009). Chez la souris, le CDCA est majoritairement converti en acide muricholique (MCA). Ces acides biliaires produits dans le foie forment la classe des acides biliaires primaires et sont conjugués à la taurine (conjugaison majoritaire chez la souris) et à la glycine (conjugaison majoritaire chez l'Homme). Ces conjugaisons favorisent le stockage des acides biliaires dans la vésicule biliaire en empêchant leur reflux dans le foie. De plus, de nombreux transporteurs permettent l'export des acides biliaires en dehors du foie ou empêchent leur ré-absorption (Pour revue, Lefebvre *et al.* 2009). Au niveau de l'iléon mais surtout dans le colon, les acides biliaires sont déconjugués et déhydroxylés par des enzymes du microbiote intestinal. Le microbiote intestinal est l'ensemble des microorganismes (Archées, Protistes et Bactéries) qui peuple l'intestin. Ce microbiote est composé de 10^5 milliards de cellules (10 fois plus important que le nombre de cellules dans le corps humain). Chez l'Homme, les bactéries du microbiote intestinal se retrouvent majoritairement dans l'iléon (10^6 à 10^8 bactéries par mL) et dans le caecum et le colon (10^{11} bactéries par g de fécès). Parmi les bactéries du microbiote intestinal, certaines jouent un rôle clé de par leur

capacité à déconjuguer et à déshydroxyler les acides biliaires primaires (CA et CDCA) en acides biliaires secondaires (lithocholate (LCA) et déoxycholate (DCA)). La déconjugaison des acides biliaires consiste en l'hydrolyse enzymatique de la liaison amide liant les acides biliaires à leur acide aminé. Cette hydrolyse fait intervenir des enzymes bactériennes, les hydrolases des sels biliaires (BSHs), enzymes exprimées par différents espèces bactériennes. L'activité des BSHs diffère selon la taille des sous-unités exprimées, selon leur spécificité de substrat, selon leur propriété cinétique mais aussi selon leur pH optimal d'action. La déshydroxylation de la fonction hydroxy en position 7- α des acides biliaires fait intervenir des enzymes du microbiote intestinal appartenant au genre *Clostridium* (Wells *et al.* 2003, Kitahara *et al.* 2000, Kitahara *et al.* 2001). Cette déshydroxylation facilite la réabsorption par les colonocytes des acides biliaires. Chez la souris, l'importance des bactéries du microbiote sur le métabolisme des acides biliaires fut étudiée chez des souris dépourvues de microbiote (souris Germ-Free (GF)) (Sayin *et al.* 2013). Comme attendu, les souris GF ne présentent pas d'acides biliaires secondaires. De plus, cette étude a pu identifier pour la première fois que les dérivé tauro-conjugués du β muricholate (T β MCA) et de l' α muricholate (T α MCA) étaient les acides biliaires majoritaires chez la souris (Sayin *et al.* 2013). Nous reviendrons sur cette étude dans la partie FXR.

2) Recyclage des acides biliaires *via* la circulation entérohépatique

Une fois synthétisés, les acides biliaires sont sécrétés dans les canalicules biliaires hépatiques puis stockés dans la vésicule biliaire (**FIGURE 11**). Dans la vésicule biliaire, les acides biliaires, mélangés à des ions sodium ou potassium forment les sels biliaires. Après la prise d'un repas, le chyme arrive dans le duodénum intestinal où il entraîne la sécrétion de CCK. Cette sécrétion de CCK est d'autant plus importante que le chyme est riche en lipides. Une fois sécrétée, la CCK se fixe aux récepteurs CCK-1 de la membrane des cholangiocytes et induit la contraction de la vésicule biliaire. La bile est alors déversée dans le duodénum où les acides biliaires exercent leur rôle de détergent des lipides alimentaires, générant d'autant plus de sécrétagogues pour la CCK. Les acides biliaires continuent le long du tractus gastrointestinal et sont réabsorbés au niveau des entérocytes de l'iléon (**FIGURE 11**). En fonction de leur polarité, 95% des acides biliaires vont pénétrer dans ces cellules par diffusion ou par l'intermédiaire de ASBT (Apical Sodium-dependent Bile acid Transporter, SLC10A2), un co-transporteur acides biliaires/sodium situé du côté luminal de l'épithélium intestinal. Une fois dans l'entérocyte, les acides biliaires sont pris en charge par un transporteur intracellulaire des acides biliaires, IBABP (Ileal Bile Acid Binding protein, FABP6). Du côté basolatéral, l'hétérodimère Osta α /Ost β permet l'efflux dans la circulation portale des acides biliaires et leur retour au foie (**FIGURE 11**). Dans le foie, ils sont recyclés pour retourner dans la circulation entérohépatique. La somme des quantités d'acides biliaires

contenus dans les composants de la circulation entérohépatique (foie, vésicule biliaire, intestin et circulation portale) définit le pool d'acides biliaires.

Hormis leur rôle de détergent des graisses alimentaires, les acides biliaires sont maintenant reconnus comme molécules de signalisation *via* leur fixation et l'activation du récepteur membranaire TGR5 et des récepteurs nucléaires PXR, VDR, CAR et FXR. Les acides biliaires *via* PXR et VDR interviennent dans les processus de détoxification hépatique aux acides biliaires et aux xénobiotiques (Staudinger *et al.* 2001, Xie *et al.* 2001). A l'heure actuelle, le pouvoir régulateur homéostatique des acides biliaires est surtout relié à TGR5 et FXR.

B) Le récepteur membranaire des acides biliaires TGR5

1) Expression tissulaire et fonctions de TGR5

TGR5 (GpBAR1, GPR131, M-BAR, BG37) est une protéine à 7 séquences de traversée couplé aux protéines G de type Gas. Identifié dans un premier temps comme permettant de réguler la production de cytokines par une lignée de monocyte humain (Kawamata *et al.* 2003), ce récepteur aux acides biliaires est aussi exprimé dans les cellules de Küpffer où son activation diminue le niveau circulant de cytokines pro-inflammatoires (Keitel *et al.* 2008, Högenauer *et al.* 2014), dans les cholangiocytes et les cellules ductales où il intervient dans le remplissage de la vésicule biliaire (Keitel *et al.* 2009, Vassileva *et al.* 2006, Li *et al.* 2011) et dans le tissu adipeux brun et le muscle où son activation augmente la dépense énergétique dans un contexte d'obésité chez la souris (Maruyama *et al.* 2006, Watanabe *et al.* 2006). TGR5 est aussi exprimé dans l'intestin où son expression suit celle des cellules L, à savoir un gradient ascendant le long de l'intestin et un maximum d'expression dans le colon. Il régule la production et la sécrétion de GLP-1 par les cellules L (Thomas *et al.* 2008, Harach *et al.* 2012, Potthoff *et al.* 2012, Bala *et al.* 2014).

2) Mécanismes d'action de TGR5 sur la production de GLP-1 par la cellule L

Les acides biliaires secondaires ont une meilleure affinité pour TGR5 que les acides biliaires primaires (affinité pour TGR5 : LCA>DCA>>CDCA=CA) (pour revue : Prawitt *et al.* 2014). La fixation d'un acide biliaire à TGR5 active la protéine G α s qui, selon une signalisation intracellulaire Adénylate cyclase / PKA / CREBP / CRE, induit l'expression du proglucagon (Vallim & Edwards 2009, Harach *et al.* 2012, Thomas *et al.* 2008) (**FIGURE 12**).

Hormis la régulation de la transcription du proglucagon, l'AMPc produit après fixation d'un acide biliaire à TGR5 induit la sécrétion de GLP-1 (Thomas *et al.* 2008, Harach *et al.* 2012, Potthoff *et al.* 2012, Bala *et al.* 2014). Récemment, les mécanismes de sécrétion de GLP-1 après activation de TGR5 furent identifiés dans la lignée STC-1 (Bala *et al.* 2014)

(FIGURE 12). L'activation de TGR5 induit toujours la sécrétion de GLP-1 lorsque les cellules sont incubées avec un inhibiteur de la PKA. En plus de la cellule bêta, la protéine EPAC2 fut aussi identifiée dans les cellules L (De Rooij *et al.* 1998, Kawasaki *et al.* 1998). Alors que l'activation de TGR5 induit la sécrétion de GLP-1 dans la lignée STC-1 transfectée avec un siRNA contrôle, elle n'induit plus la sécrétion de GLP-1 dans des cellules transfectées par un siRNA EPAC2 (Bala *et al.* 2014). De plus, l'incubation avec un agoniste sélectif de EPAC2 est suffisante pour stimuler la sécrétion de GLP-1. EPAC2 active alors la PLC epsilon qui hydrolyse le PIP2 (Phosphatidylinositol-4,5-diphosphate) en DAG (Diacylglycérol) et IP3 (Inositol-tri-phosphate). L'IP3 se fixe sur ses récepteurs au niveau réticulaire, induit la libération de calcium réticulaire entraînant ainsi une sécrétion de GLP-1 par la cellule L **(FIGURE 12).**

3) TGR5 et régulation homéostatique

a) TGR5 et métabolisme des acides biliaires

Comme cité préalablement, TGR5 est exprimé dans des tissus clés dans la synthèse et le recyclage des acides biliaires tels le foie, l'intestin et la vésicule biliaire (Keitel *et al.* 2010, Keitel *et al.* 2009, Vassileva *et al.* 2006). Des études assez récentes montrent que les souris *Tgr5*^{-/-} ont une taille du pool d'acides biliaires réduite comparativement aux souris *Tgr5*^{+/+}, sans augmentation d'excrétion fécale d'acides biliaires (Maruyama *et al.* 2006, Li *et al.* 2011). De plus, l'activation de TGR5 augmente le volume de la vésicule biliaire en relaxant les cellules musculaires lisses de cette vésicule (Li *et al.* 2011, Lavoie *et al.* 2010).

b) TGR5 et dépense énergétique

L'activation de TGR5 est importante dans la régulation du métabolisme énergétique *via* sa capacité à induire la dépense énergétique du tissu adipeux brun et des muscles (Watanabe *et al.* 2006). La fixation d'un acide biliaire à TGR5 induit l'expression de l'enzyme déiodinase 2 (Dio2), enzyme qui catalyse la libération d'un atome d'iode de la prohormone thyroxine (T4) pour produire la 3,5,3'-tri-iodothyronine active (T3) (Bianco *et al.* 2005). L'activation de Dio2 en réponse à TGR5 est due à une élévation de la concentration intracellulaire d'AMPc. La T3 produite se fixe au récepteur nucléaire TR, qui, en synergie avec la concentration intracellulaire d'AMPc, va induire l'expression de gènes tels qu'*Ucp-1* et *Dio2*, favorisant la lipolyse du tissu adipeux brun et augmentant la thermogénèse (Watanabe *et al.* 2006).

c) TGR5 et régulation du métabolisme lipidique

Lorsqu'elles sont nourries par un régime standard, les souris déficientes pour TGR5 présentent une masse corporelle et une prise alimentaire comparables aux souris WT

(Maruyama *et al.* 2006). Toutefois, les souris femelles *Tgr5*^{-/-} nourries par un régime riche en graisses présentent une masse corporelle et une masse des tissus adipeux supérieures aux souris *Tgr5*^{+/+} (Maruyama *et al.* 2006). De plus, l'inactivation de TGR5 augmente le contenu en lipides du foie après un régime riche en graisse (Vassileva *et al.* 2010). Chez la souris, l'activation de TGR5 diminue la stéatose hépatique et prévient de la fibrose (Thomas *et al.* 2009, Potthoff *et al.* 2012).

PARTIE IV : Le récepteur nucléaire FXR

A) Généralités sur les récepteurs nucléaires

Chez les Eucaryotes, les récepteurs nucléaires constituent la plus grande famille de facteurs de transcription se liant à l'ADN. Ils sont tous apparentés d'un point de vue évolutif. Leur activité est régulée pour la plupart par des ligands hydrophobes de faible masse moléculaire (Sladek 2011). Le récepteur aux œstrogènes fut le premier récepteur nucléaire identifié en 1962 par des méthodes biochimiques (Jensen 1966). Le développement des techniques de clonage de l'ADN a permis par la suite d'identifier les autres membres de cette famille. On décompte aujourd'hui 49 récepteurs nucléaires classés en fonction soit de critères d'interaction avec l'ADN (Mangelsdorf *et al.* 1995), de critères phylogéniques ou encore en fonction de critères physiologiques (McKenna *Mol Endocrinol* 2009). Ces différents récepteurs nucléaires partagent une structure assez similaire et interviennent dans des processus tels que le développement, la croissance ou encore dans le maintien de l'homéostasie énergétique.

1) Structure des récepteurs nucléaires

Les récepteurs nucléaires sont pour la plupart constitués de 6 domaines fonctionnels appelés domaines A, B, C, D, E et F. L'extrémité N-ter des récepteurs nucléaires constitue le site d'activation de la transcription indépendante du ligand (domaines A/B) appelé AF-1 pour Activation Function-1. Le DNA Binding Domain (DBD ou domaine C) est un site de liaison à l'ADN qui est très conservé entre les différents récepteurs nucléaires. Le domaine D est une région charnière séparant les domaines C et E. Le domaine E, représentant l'extrémité C-ter, est le domaine de liaison au ligand (ou LBD pour Ligand Binding Domain). Ce domaine est assez conservé entre les différents récepteurs nucléaires. Sur l'extrémité C-ter, on retrouve également un site AF-2 qui est critique pour l'activité transcriptionnelle des récepteurs nucléaires (**FIGURE 14**). Enfin le domaine F, dont la présence et la séquence sont variables d'un récepteur nucléaire à un autre, n'a à l'heure actuelle aucune fonction clairement définies. Différents sites d'initiation de la transcription au sein des promoteurs des récepteurs nucléaires permettent à un même récepteur nucléaire d'avoir différents isoformes. La

conservation plus ou moins variable de la séquence des DBD et LBD est à la base de la classification phylogénétique des récepteurs nucléaires.

2) Classification des récepteurs nucléaires

a) Classification phylogénétique

Au vu du nombre et de l'intérêt croissant porté aux récepteurs nucléaires dans la physiologie et la physiopathologie, le Comité de Nomenclature des Récepteurs Nucléaires a décidé de normaliser la classification des récepteurs nucléaires en 6 sous-familles en fonction des variations lors de l'évolution des séquences géniques des domaines de fixation à l'ADN et des domaines de fixation au ligand (Nuclear Receptors Nomenclature Committee 1999, Robinson-Rechavi *et al.* 2003). Ils furent alors nommés sous la forme NRxyz où x représente la sous-famille, y représente le groupe et z le gène d'un récepteur nucléaire donné. Les membres d'un même groupe (même y) présentent une identité de séquence de 80 à 90% au niveau de leur DBD et de 40 à 60% au niveau de leur LBD. Une 7^{ème} sous-famille, ne contenant qu'un DBD ou qu'un LBD et n'entrant dans aucune des 6 autres sous-familles, fut nommée NR0yz. Cette classification unifie la nomenclature des récepteurs nucléaires et est actuellement reconnue comme la nomenclature officielle (**FIGURE 13**). Toutefois, l'utilisation dans la littérature des noms usuels des récepteurs nucléaires est toujours d'actualité. La recommandation officielle veut que lorsque l'on cite pour la première fois un récepteur nucléaire dans le texte, on cite également entre parenthèses le nom officiel (p.e. FXR (NR1H4)).

b) Classification de Mangelsdorf

Une autre classification a permis de classer les récepteurs nucléaires en 4 classes (Mangelsdorf *et al.* 1995). En plus de l'alignement des séquences du LBD et du DBD, cette classification prend en plus en compte les propriétés de dimérisation des récepteurs nucléaires.

La classe I est typiquement la classe des récepteurs aux stéroïdes capables de s'homodimériser et dont le chef de file est le récepteur aux glucocorticoïdes (GR). On y retrouve également les récepteurs au minéralocorticoïde (MR), à la progestérone (PR), aux androgènes (AR) et à l'œstrogène (ER).

La classe II est caractérisée par la capacité des récepteurs nucléaires à se fixer sous forme hétérodimérique avec le récepteur aux acides rétinoïques (RXR). On retrouve entre autres dans cette classe le récepteur aux vitamines D (VDR), aux acides trans-rétinoïques (RARs), aux proliférateurs des peroxyosomes (PPARs) et au farnésoloïde (FXR).

La troisième classe se compose des récepteurs nucléaires orphelins (dont les ligands ne sont pas encore connus) s'associant en homodimères (p.e. RXR, COUP, HNF4 et TR2).

Enfin, la classe IV se compose des récepteurs orphelins ou des récepteurs récemment dé-orphanisés se fixant à l'ADN sous forme monomérique (p.e. Rev-erb, NGFI-B, SF-1 et ROR).

Cette classification, historiquement la première à classer les récepteurs nucléaires, est devenue obsolète au profit de la classification phylogénétique. Toutefois, ces 2 classifications ne se basent que sur les séquences et/ou les propriétés de dimérisation des récepteurs nucléaires et ne reflètent que peu l'implication majeure des récepteurs nucléaires dans la physiologie et la physiopathologie.

c) Classification physiologique

Récemment, une autre classification a proposé de classer les récepteurs nucléaires en fonction de leur rôle dans l'organisme (Bookout *et al.* 2006, McKenna *et al.* 2009). Cette classification relie les expressions tissulaires des récepteurs nucléaires à des fonctions dans l'organisme. Elle a pour avantage, par rapport à la classification phylogénétique, de donner une vision moins artificielle et plus intégrée de la diversité des récepteurs nucléaires. En utilisant des approches de transcriptomique des 49 récepteurs nucléaires dans 39 tissus différents de souris C57BL6, Bookout *et al.* ont réussi à classer en 2 clusters différents les récepteurs nucléaires selon leur rôle dans l'organisme ; chaque cluster étant constitué de 3 sous-clusters.

Le cluster I correspond aux récepteurs nucléaires impliqués dans les processus de stéroïdogénèse (sous-cluster IA, p.e. DAX-1, SF-1, FXR β), de reproduction et de développement (sous-cluster IB ; p.e. ERs, RARs, COUP-TF β , AR, PR) et les processus liés à la fois au système nerveux central, à l'horloge biologique et aux fonctions métaboliques basales (sous-cluster IC ; p.e. LXR β , NOR-1, NGF1-B, ERR β , REV-ERB α et β , NURR1...). Il correspond surtout aux récepteurs nucléaires exprimés dans les tissus nerveux et reproducteurs.

Contrairement au cluster I, le cluster II est exprimé préférentiellement dans les tissus de l'axe gastroentérohépatique et dans les tissus métaboliques tels que le muscle et le tissu adipeux (Bookout *et al.* 2006). Le cluster II regroupe tous les récepteurs nucléaires intervenant dans la régulation des différents métabolismes. Les récepteurs nucléaires du sous-cluster IIA constituent une famille de récepteurs nucléaires clés dans la régulation transcriptionnelle de l'assimilation des nutriments. En effet, dans ce sous-cluster on retrouve les récepteurs nucléaires régulateurs du métabolisme des acides biliaires et des xénobiotiques (McKenna *et al.* 2009). Ils interviennent également dans le maintien d'une barrière efficace des organes du tractus entérohépatique exposés aux nutriments (Bookout *et al.* 2006). On retrouve dans le sous-cluster IIA des récepteurs nucléaires tels que CAR, PXR, HNF4 α et γ , SHP, ROR γ , LRH-1, VDR et FXR α . Les récepteurs nucléaires du sous-

cluster IIB fonctionnent comme des régulateurs de l'utilisation de l'énergie apportée par les lipides alimentaires mais aussi comme régulateur de la dépense énergétique. On retrouve entre autres dans cette famille les récepteurs COUP-TF γ , ERR α , RXR α , PPAR α et δ . Enfin le troisième sous-cluster (sous-cluster IIC), constitué de seulement PPAR γ , LXR α et GR, est le sous-cluster des récepteurs nucléaires régulateurs d'aspects spécifiques de l'utilisation énergétique tels que le stockage lipidique, le métabolisme du cholestérol et le métabolisme du glucose (Bookout *et al.* 2006).

3) Mode de fonctionnement des récepteurs nucléaires

De par leur rôle de facteur de transcription, les récepteurs nucléaires ont la capacité de moduler positivement *via* des mécanismes de transactivation ou négativement *via* des mécanismes de transrépression l'expression de gènes cibles. Nous détaillerons ici de manière générale ces mécanismes (pour revue : Pawlak *et al.* 2012).

a) Transactivation

Au moins 3 mécanismes permettent l'activation de la transcription induite par les récepteurs nucléaires : une transactivation simple, une transactivation composée et une transactivation par ancrage. La transactivation simple se fait *via* une fixation directe du récepteur nucléaire sous forme de monomère, de dimère ou d'hétérodimère avec RXR au niveau de séquence consensus spécifiques du récepteur nucléaire, les éléments de réponse. La fixation d'un agoniste au LBD d'un récepteur nucléaire entraîne un changement de la conformation du LBD qui, après une cascade d'évènements tels que le relargage de co-répresseurs et le recrutement de co-activateurs sur la chromatine ou encore l'hétérodimérisation avec RXR, active la transcription de gènes cibles. La transactivation composée est une transactivation simple qui nécessite la fixation d'autres récepteurs nucléaires et/ou de facteurs de transcription à proximité du gène cible pour permettre l'induction de son expression. Enfin, la transactivation par ancrage consiste en l'ancrage d'un récepteur nucléaire, activé ou non par son ligand, à une protéine fixée à l'ADN. FXR semble fonctionner en hétérodimère avec RXR (Plass *et al.* 2002), en monomère pour la régulation de l'expression d'UGT2B4 et de GLUT4 (Barbier *et al.* 2003, Shen *et al.* 2008) ou en synergie avec LXR1 (Chong *et al.* 2010, Chong *et al.* 2012) et HNF4 α (Thomas *et al.* 2013)

b) Transrépression

Certains récepteurs nucléaires peuvent réprimer la transcription de gènes cibles sans fixation de ligand à leur LBD. Ce processus est dû au recrutement de complexes co-répresseurs tels que NCoR (Nuclear receptor Co-Repressor), SMRT (Silencing Mediator for Retinoid and Thyroid hormone receptors), HDAC3 (Histone Deacetylase 3), TBL1

(transducin- α -like 1), TBL1R (TBL-1-like related protein) et GPS2 (G-protein-pathway suppressor 2) au niveau des gènes cibles (Zhang *et al.* 2002, Yoon *et al.* 2003). Les mécanismes par lesquels fonctionnent ces co-répresseurs font intervenir des modifications covalentes des histones et de l'ADN (désacétylation des histones, méthylation de l'ADN, ...) conduisant à la compaction des brins d'ADN rendant moins accessible l'information génique. Un autre processus de transrépression de l'expression de gènes par les récepteurs nucléaires, appelé régulation négative, nécessite la fixation d'un ligand au LBD. Cette fixation va induire le recrutement du récepteur nucléaire à ses éléments de réponses inversés. Il existe ici au moins 2 mécanismes : le récepteur nucléaire est suffisant *per se* pour diminuer l'expression des gènes cibles. L'autre mécanisme est un recrutement des complexes co-répresseurs NCoR et SMRT une fois le récepteur nucléaire fixé. Le dernier processus de transrépression est une transrépression par ancrage. Ce mécanisme fait intervenir des interactions entre les récepteurs nucléaires activés par leurs ligands et d'autres facteurs de transcription tels que NF κ B (Nuclear Factor Kappa B) et AP-1 (Activator Protein-1).

B) Le récepteur nucléaire des acides biliaires FXR

Le récepteur Farnesoid X Receptor (FXR) fut identifié pour la première fois en 1995 chez la souris (Seol *et al.* 1995) et chez le rat (Forman *et al.* 1995) où son activité est régulée par un dérivé du mévalonate, le farnésol. Par la suite il fut mieux caractérisé comme un récepteur aux acides biliaires mais il a conservé le nom FXR.

1) Expression tissulaire et isoformes de FXR

Deux gènes codent pour FXR : FXR β (NR1H5) qui est un pseudogène chez l'Homme mais qui est un récepteur au lanostérol chez les rongeurs et FXR α (NR1H4), dénommé par la suite FXR. Il existe 4 isoformes de FXR α : FXR α 1, α 2, α 3 et FXR α 4. Les isoformes FXR α 1 et α 3 diffèrent des isoformes FXR α 2 et α 4 par l'insertion dans leur région charnière d'une séquence codant pour 4 acides aminés Met-Tyr-Thr-Gly (Huber *et al.* 2002) (**FIGURE 14**). FXR est un récepteur aux acides biliaires exprimé surtout dans le foie, les glandes surrénales, les reins et l'intestin. Il est exprimé à un niveau moindre dans le tissu adipeux (Cariou 2006, Ma 2006) et le pancréas (Popescu *et al.* 2010, Renga *et al.* 2010). Chez l'Homme, les isoformes FXR α 1-2 sont plus exprimées dans le foie que dans l'intestin alors que les isoformes FXR α 3-4 sont plutôt exprimées dans l'intestin.

La fixation d'agonistes de FXR à son LBD conduit alors à la fixation de FXR à ses éléments de réponse ou FXRE. La majorité des FXRE sont constitués de séquences répétées inversées ou IR1 (Inverse Repeat 1) et de DR (Direct Repeat). FXR se fixe seul sous forme monomérique ou sous forme hétérodimérique avec le récepteur nucléaire RXR

(Retinoic X Receptor). Ces fixations modulent positivement ou négativement l'expression de gènes cibles de FXR.

2) Ligands et fonctionnement de FXR

a) Les ligands naturels de FXR

i. Les acides biliaires agonistes de FXR

L'affinité des différents acides biliaires pour FXR (CDCA>DCA=T-LCA>CA) diffère de celle de TGR5 (LCA>DCA>>CDCA=CA) (pour revue : Prawitt *et al.* 2014). De plus, des études de transfection de plasmides contenant des séquences codantes de FXRE ont permis de montrer que CDCA est le meilleur agoniste de FXR (FXRE murin : EC₅₀ = 50 µM, FXRE humain : EC₅₀ = 10 µM) et que les DCA et LCA sont aussi à un niveau moindre des agonistes de FXR (Makishima *et al.* 1999). De plus, une étude montre que le LCA peut aussi avoir des activités antagonistes de FXR *in vitro* (Yu *et al.* 2002).

ii. Les acides biliaires antagonistes de FXR

Pendant longtemps les acides biliaires furent considérés uniquement comme des agonistes de FXR. Toutefois, de plus en plus d'études montrent que certaines espèces d'acides biliaires sont des antagonistes de FXR. Hormis le LCA, d'autres acides biliaires récemment identifiés comme des acides biliaires primaires chez la souris, les acides tauro-α muricholiques (T-αMCA), tauro-β muricholiques (T-βMCA) et l'acide ursodéoxycholique, diminuent l'expression de gènes cibles de FXR tels que IBABP, FGF15, SHP et Ostβ (Hu *et al.* 2014, Campana *et al.* 2005, Sayin *et al.* 2013). Toutefois seul l'UDCA est retrouvé chez l'Homme où le CA est rapidement métabolisé en CDCA au lieu de MCA. L'UDCA, récemment identifié comme antagonistes de FXR (Mueller *et al.* 2015), est chez l'Homme utilisé pour soigner les maladies du foie gras non alcooliques (NAFLD).

iii. Les substances naturelles antagonistes de FXR

La guggulstérone est un extrait naturel de la résine de l'arbre guggul initialement identifié comme un antagoniste de FXR (Urizar *et al.* 2002). Toutefois, des études ultérieures ont montré que le guggulstérone était plutôt un agoniste partiel de FXR (Cui *et al.* 2002). Il est aussi connu pour activer les récepteurs nucléaires PXR, PR et SR dans les cellules HepG2 (Owsley & Chiang 2003). C'est également un antagoniste des récepteurs à l'androgène, aux glucocorticoïdes et au minéralocorticoïdes (Burriss *et al.* 2005).

b) Les ligands synthétiques de FXR

L'étude du rôle de FXR a été rendu possible par le développement d'agonistes de FXR hautement affins et sélectifs pour FXR. L'INT-747 (acide 6α-éthyl-chénodéoxycholique

ou acide obéticholique) est un ligand semi-synthétique de FXR produit à partir du CDCA (Pelliccari *et al.* 2002). Son EC_{50} est de 99 nM. La fexaramine ($EC_{50} = 38$ nM) et la fexarine ($EC_{50} = 36$ nM) sont également utilisées comme molécules hautement sélectives pour FXR (Downes *et al.* 2003). La fexaramine présente l'avantage d'avoir un tropisme intestinal lorsqu'elle est administrée oralement, rendant l'étude de FXR dans l'intestin plus facile (Fiang *et al.* 2015). Le GW4064 [3-(2,6-dichlorophenyl)-4-(3'carboxy-2-chloro-stilben-4-yl)-oxymethyl-8-isopropyl-isoxazole] est l'agoniste de FXR le plus utilisé. Il a un EC_{50} de 90 nM (Maloney *et al.* 2000). A l'heure actuelle, une seule étude rapporte une sélectivité autre que FXR pour cette molécule (Dwivedi *et al.* 2011). Cette molécule présente aussi l'avantage d'avoir un tropisme intestinal lorsqu'elle est administrée oralement.

3) Rôle de FXR dans la régulation de l'homéostasie énergétique

FXR joue un rôle primordial dans le maintien de l'homéostasie énergétique. En période post-prandiale, FXR protège le foie de l'afflux massif d'acides biliaires en induisant l'inhibition de leur synthèse hépatique et en augmentant leur sécrétion dans la bile (Cariou and Staels 2007 ; Kuipers *et al.*, 2007 ; Lefebvre *et al.*, 2009). De plus, les souris déficientes en FXR (FXR-KO) présentent une augmentation des concentrations plasmatiques en triglycérides et en cholestérol, illustrant aussi un rôle de FXR dans le métabolisme lipidique (Sinal *et al.*, 2000 ; Lambert *et al.*, 2003 ; Kast *et al.*, 2001 ; Claudel *et al.*, 2002 ; Mak *et al.*, 2002 ; Claudel *et al.*, 2003). Enfin, l'activation de FXR dans le foie de modèles murins de diabésité semble bénéfique (Duran-Sandoval *et al.*, 2004, Zhang *et al.*, 2006).

a) FXR et régulation du métabolisme des acides biliaires

i. Régulation du transport des acides biliaires

A partir d'une concentration de 100 μ M, les acides biliaires sont toxiques pour l'organisme (Rolo *et al.* 2004, Perez & Briz 2009, Morgan *et al.* 2008). Pour prévenir cela, l'organisme régule en permanence les flux d'acides biliaires dans des organes tels que l'intestin et le foie, organes exposés à de hautes concentrations de sels biliaires. Après un repas, l'afflux massif d'acides biliaires au niveau intestinal va activer FXR dans l'entérocyte. Cette activation diminue l'expression du transporteur apical d'acides biliaires ASBT, augmente l'expression d'IBABP et celle de l'hétérodimère Osta/Ost β favorisant ainsi l'efflux basolatéral des acides biliaires des entérocytes tout en empêchant leur absorption luminale (Kim *et al.* 2007). Au niveau hépatique, l'activation de FXR par les acides biliaires augmente l'expression de BSEP (Bile Salt Export pump, ABCB11) (Ananthanarayanan *et al.* 2001), transporteur permettant l'efflux des acides biliaires des hépatocytes vers les canalicules biliaires, et augmente l'expression des transporteurs hépatobiliaires d'anions divalents, MDR3 (ABCB4) et MRP2 (ABCC2). De plus, FXR inhibe l'expression de NTCP

(sodium/taurocholate cotransporting polypeptide, SLC10A1) et d'OATP (Organic Anion Transporter Polypeptide-Related Protein), transporteurs majoritaires dans la recapture des acides biliaires arrivant de la veine porte. Ces différents phénomènes permettent au foie de vidanger son contenu en acides biliaires dans la période critique qu'est la prise d'un repas.

ii. Régulation de la synthèse des acides biliaires

En parallèle de la régulation des transports entérohépatobiliaires, l'activation de FXR joue aussi un grand rôle dans la régulation de la synthèse des acides biliaires (**FIGURE 11**). Les souris déficientes en FXR ont un pool d'acides biliaires augmenté (Sinal *et al.* 2000). Le rétrocontrôle négatif de FXR sur la production des acides biliaires dans le foie est réalisé *via* un mécanisme hépatique et un mécanisme intestinal.

Au niveau du foie, l'activation de FXR diminue l'expression de la *Cyp7a1* selon un mécanisme faisant intervenir SHP et un autre faisant intervenir le facteur de transcription MAFG (v-Maf Avian Musculoaponeurotic Fibrosarcoma Oncogene Homolog G) (Vallim *et al.* 2015) (**FIGURE 11**). SHP déstabilise la fixation du facteur de transcription LRH-1 du promoteur de la CYP7A1. Le relargage de LRH-1, facteur de transcription essentiel à la synthèse des acides biliaires, diminue alors la production *de novo* des acides biliaires. L'autre mécanisme impliquant la protéine MAFG fut mis en évidence très récemment (Vallim *et al.* 2015). MAFG est un facteur de transcription récemment identifié comme gène cible de FXR. MAFG, en se fixant à ses éléments de réponse MARE (Maf Recognition Element) sur le promoteur de la *Cyp7a1*, diminue le pool d'acides biliaires (Vallim *et al.* 2015) (**FIGURE 11**).

Un autre mécanisme de régulation, intestinal cette fois, fait intervenir un gène cible direct de FXR dans l'entérocyte, FGF15/19 (Fibroblast Growth Factor 15 et son orthologue humain FGF19) (**FIGURE 11**). En effet, FXR promeut la production de FGF15/19, qui, une fois sécrété dans la circulation portale, se fixe aux récepteurs FGFR4 à la surface des hépatocytes. Différents mécanismes interviennent alors : l'activation de FGFR4 va activer la protéine cytosolique β Klotho qui à son tour active la voie de signalisation intracellulaire Jnk kinase. Le déclenchement de cette voie a pour effet d'inhiber l'expression de *Cyp7a1* (Holt *et al.* 2003). Un autre mécanisme, identifié récemment, fait intervenir la phosphatase cytoplasmique SHP2 qui une fois activée va déphosphoryler et activer la PKC et la kinase Erk. Ces 2 kinases vont activer FXR qui en retour va diminuer l'expression de la *Cyp7a1* et le pool des acides biliaires (Shuangwei *et al.* 2014) (**FIGURE 11**).

Ainsi, *via* FXR, les acides biliaires régulent à la fois leur transport mais aussi leur production.

b) FXR et régulation du métabolisme lipidique

Le cholestérol peut être synthétisé *de novo* par le foie ou provient de l'alimentation. Il intervient dans différents processus tels que la stabilité et la perméabilité des membranes cellulaires, la synthèse des hormones sexuelles. Comme dit précédemment, c'est aussi le substrat pour la synthèse hépatique des acides biliaires. Dans les tissus périphériques, les pré-HDL (High Density Lipoprotein), captent le cholestérol puis l'enzyme LCAT (Lecithine/Cholesterol Acyl Transferase) l'estérifie pour donner des esters de cholestérol. Ce HDL-Cholestérol peut soit être directement capté par SR-BI (Scavenger Receptor- Type B Class I) hépatique soit être transféré des HDL vers les LDL (Low Density Lipoprotein), les VLD (Very low Density Lipoprotein) et les IDL (Intermediate Density Lipoprotein) grâce à l'action des protéines de transfert CETP (Cholesterol-Ester Transfer protein) et PLTP (PhosphoLipid Transfer protein).

FXR est impliqué à différents niveaux dans la régulation du transport et de l'estérification du cholestérol. En effet, les souris déficientes en FXR présentent des concentrations élevées de cholestérol dans le plasma et le foie (Sinal *et al.* 2000). Cette augmentation est liée à une fraction HDL-cholestérol plus importante chez les souris *Fxr*^{-/-} et à une induction du gène de l'ApoB, de SR-BI et de l'ApoAI, principale composante des HDL (Lambert *et al.* 2003, Sinal *et al.* 2000, Zhang *et al.* 2010). L'expression hépatique du LDLR ne varie pas mais la production des lipoprotéines riches en ApoB et en triglycérides est augmentée de manière concomitante à une hausse de l'absorption intestinale de cholestérol (Lambert *et al.* 2003). De plus, le traitement de souris WT par le GW4064 diminue le niveau plasmatique de HDL-Cholestérol (Cariou *et al.* 2006, Zhang *et al.* 2006) ainsi que l'absorption intestinale de cholestérol par 50% (Zhang *et al.* 2010). L'activation de FXR par le CDCA dans des lignées d'hépatocytes humains augmente l'expression (Nakahara JBC 2002) et l'activité des LDLR en inhibant l'expression de la Pcsk9 (Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin type 9), une protéine inhibitrice des LDLR (Taniguchi *et al.* 1994, Langhi *et al.* 2008). Ces résultats suggèrent que FXR pourrait diminuer les niveaux de LDL-cholestérol chez l'Homme. Quoique vraie dans un premier temps (Bateson *et al.* 1978, Leiss & von Bergmann 1982), cette hypothèse fut revue plus récemment (Wang *et al.* 2006). En effet, l'administration de CDCA et de DCA ne change pas l'absorption du cholestérol par le foie (Wang *et al.* 2006). Cette différence peut être due à une diminution de la demande de cholestérol par le foie due à l'inhibition de la synthèse d'acides biliaires après activation de FXR (Wang *et al.* 2006, Porez *et al.* 2012).

En plus de l'élévation du cholestérol plasmatique, les souris *Fxr*^{-/-} obèses (Prawitt *et al.* 2011) et non obèses (Lambert *et al.* 2003, Sinal *et al.* 2000) présentent également une augmentation du niveau des triglycérides circulants. Chez les sujets sains et les patients hypertriglycéridémiques, l'administration d'un séquestrant des acides biliaires, connu pour dé-activer FXR, augmente les triglycérides plasmatiques en augmentant la production des

VLDL (Beil *et al.* 1982) et l'activation de FXR *in vitro* diminue la sécrétion de VLDL dans une lignée hépatocytaire humaine (Hirokane *et al.* 2004, Porez *et al.* 2012).

c) FXR et régulation du métabolisme du glucose

De façon plus récente, des études ont montré l'implication de FXR dans le contrôle du métabolisme du glucose. L'expression de FXR dans le foie diminue dans des modèles animaux de diabète de type 1 et 2 et elle est régulée *in vitro* par l'insuline et le glucose (*et al. et al.*, 2004). Chez des souris diabétiques (*db/db* : modèle de déficience pour le récepteur de la leptine), le traitement par le GW4064 améliore l'hyperglycémie et augmente l'insulino-sensibilité en diminuant la néoglucogénèse hépatique. L'expression d'une forme constitutivement active de FXR améliore significativement l'hyperglycémie chez des souris diabétiques et diminue le glucose plasmatique chez des souris non diabétiques (Zhang *et al.*, 2006). Très récemment, il a été montré par notre laboratoire que l'activation de FXR dans 2 lignées de cellules hépatocytaires humaines (HepaRG et IHH) diminuait l'expression de presque tous les gènes de la glycolyse en interférant, en présence de glucose, avec la fixation de ChREBP sur leur promoteur (Caron *et al.* 2012).

En fonction du tissu considéré, FXR semble jouer un rôle différent dans le contrôle de l'homéostasie énergétique et notamment dans le contrôle du métabolisme glucidique. Les souris invalidées pour FXR dans le corps entier sont protégées contre l'obésité induite par la diète mais aussi contre l'obésité induite génétiquement par invalidation du gène codant la leptine (Prawitt *et al.* 2010, Bjursell *et al.* 2013, Seeley *et al.* 2014, Fang *et al.* 2015). De plus, comparativement aux souris WT, ces souris présentent une amélioration du profil glycémique. Les souris invalidées pour FXR spécifiquement dans l'hépatocyte perdent cet effet bénéfique de l'invalidation de FXR : les effets protecteurs de l'invalidation de FXR ne semblent pas être une conséquence de FXR hépatique. Récemment, des souris invalidées pour FXR spécifiquement dans les cellules épithéliales intestinales ont été générées par croisement de souris FXR-flox avec des souris dont l'expression de la recombinaison est sous dépendance du promoteur de la villine, les souris Villin-Cre. Des études menées sur ces souris *iFxr*^{-/-} (pour invalidées pour FXR dans l'intestin) ont permis de montrer que les souris *iFxr*^{-/-} sont toujours protégées de l'obésité induite par un régime et qu'elles ont un profil glycémique amélioré (Li *et al.* 2013) soulignant l'importance de FXR dans l'intestin dans le développement et/ou le maintien de l'obésité induite à un régime riche en graisses. Enfin, les souris FXR KO présentent une apparition plus lente dans le plasma du glucose ingéré par voie orale évoquant un rôle modulateur de FXR intestinal dans l'absorption du glucose par la muqueuse (van Dijk *et al.*, 2009). Très récemment, il a été montré chez le rat que la diversion biliaire, opération consistant à faire arriver la bile au niveau de l'intestin distal, diminuait à la fois l'expression de FXR mais aussi de ses gènes cibles intestinaux. Ces

diminutions s'accompagnent d'une amélioration à la fois de la prise alimentaire, une augmentation de l'insulinémie mais aussi une glycémie améliorée (Goncalves *et al.* 2015). Nous reviendrons plus longuement sur cette étude dans la partie perspective.

Selon la voie d'administration, l'activation de FXR a des effets négatifs ou positifs sur la glycémie de souris dans un contexte physiopathologique d'obésité. En effet, l'administration intrapéritonéale de GW4064 améliore l'hyperglycémie, augmente la sensibilité à l'insuline des tissus périphériques de souris *db/db* (Duran-Sandoval *et al.* 2004) et diminue l'obésité induite par un régime (Ma *et al.* 2013). Toutefois, lorsqu'il est administré *per os*, le GW4064 exacerbe l'obésité et l'hyperglycémie induites par un régime riche en graisses en diminuant le pool d'acides biliaires, diminution qui a pour conséquence de diminuer la dépense énergétique (Watanabe *et al.* 2011). De plus, les résultats d'une étude clinique récemment publiée, l'étude FLINT (FXR Ligand Obeticholic Acid in NASH Treatment Trial), montrent que l'administration d'INT-747 à des patients atteints de NASH (stéatose hépatique non alcoolique) n'a pas d'effet sur la glycémie à jeun et diminue la sensibilité à l'insuline de ses patients (mesuré par l'index HOMA) montrant que l'activation de FXR dans le foie peut être néfaste (Neuschwander-Tetri *et al.* 2014).

Une autre étude montre que l'activation de FXR par une administration *per os* d'un agoniste à tropisme intestinal, la fexaramine, améliore les profils glycémiques et diminue la masse corporelle de souris WT (Fiang *et al.* 2015). Cependant dans cette étude les auteurs utilisent en données supplémentaires des souris FXR KO nourries par un régime riche en graisses pour montrer la dépendance de FXR de ce mécanisme. Lorsque l'on compare les masses corporelles et les niveaux de glycémies de ces souris, on peut voir que même si effectivement l'activation de FXR améliore les paramètres biologiques des souris WT, les souris FXR KO présentent un métabolisme énergétique (masse corporelle et glycémie après test de tolérance au glucose) meilleur que les souris WT traitées (Fiang *et al.* 2015).

C) Comment la modulation de la voie des acides biliaires dans l'intestin peut être une cible thérapeutique pour soigner le diabète de type 2

Chez des patients diabétiques de type 2, le profil des acides biliaires plasmatiques est perturbé. Différentes molécules sont actuellement testées avec plus ou moins de succès pour moduler la voie des acides biliaires et ainsi soigner le diabète de type 2. Nous détaillerons ici certaines de ces molécules.

1) Les résines séquestrantes des acides biliaires⁽¹⁾

⁽¹⁾ Pour revue : Prawitt Trends Endocrinol Metab 2014

Les séquestrants des acides biliaires sont des résines anioniques qui se fixent aux parties hydrophiles des acides biliaires empêchant leur absorption intestinale. Les résines séquestrantes, en amplifiant l'élimination des acides biliaires et en empêchant le cycle entérohépatique, entraînent une surproduction hépatique des acides biliaires hydroxylés en position α sur le carbone 12 (Herrema *et al.* 2010, Brufau *et al.* 2010) entraînant une diminution du cholestérol plasmatique. Ces résines ont ainsi prouvé leur efficacité pour traiter l'hypercholestérolémie. En effet, elles augmentent de 3 à 5% la concentration circulante d'HDL cholestérol et diminuent de 15 à 30% les niveaux plasmatiques de LDL cholestérol chez l'Homme. Aux Etats-Unis, la Food and Drug Administration (FDA) autorise l'utilisation des séquestrants des acides biliaires pour soigner les patients diabétiques. Il a été montré que l'administration pendant 5 jours d'une résine séquestrante, le Cholestyramide, diminue la concentration de glucose plasmatique de 20 mg/dL par rapport au placebo et diminue de 40 g par jour la glycosurie (Garg & Grundy, 1994). Les mécanismes par lesquels les séquestrants des acides biliaires diminuent la glycémie sont multiples et pas encore complètement élucidés. Toutefois, 2 hypothèses se dégagent pour expliquer cette amélioration. L'hypothèse classique fait intervenir une augmentation de sécrétion de GLP-1 alors que l'autre hypothèse incrimine une augmentation de l'utilisation du glucose splanchnique par le foie (Staels & Kuipers, 2007 ; Prawitt & Staels, 2010).

L'augmentation de la sécrétion de GLP-1 en réponse au glucose, premier mécanisme identifié pour expliquer les effets bénéfiques des séquestrants, fut mis en évidence dans 2 modèles de rat (Chen *et al.* 2010, Shang *et al.* 2010). Il a été montré récemment que les acides biliaires complexés aux séquestrants gardaient leur capacité à activer le récepteur membranaire TGR5 (Harach *et al.* 2012, Potthoff *et al.* 2013). Potthoff et son équipe ont montré qu'incuber des complexes AB/séquestrants pouvait activer l'activité luciférase d'un plasmide TGR5 transduit dans des cellules CHO. *In vivo*, dans des souris nourries par un régime riche en graisses, ces complexes augmentent à la fois l'expression du Proglucagon mais aussi la sécrétion de GLP-1 en réponse à un repas test par un mécanisme dépendant de TGR5 (Potthoff *et al.* 2013, Harach *et al.* 2012). Cette augmentation de la sécrétion de GLP-1 induit une amélioration de la glycémie par une inhibition hépatique de la glycogénolyse (Potthoff *et al.* 2013). Les séquestrants des acides biliaires complexés aux acides biliaires achemineraient les acides biliaires au niveau du colon où ils activeraient TGR5 des nombreuses cellules entéroendocrines de type L.

L'utilisation du glucose portal par le foie ainsi que sa métabolisation hépatique définissent l'utilisation splanchnique du glucose. Cette communication veine porte / foie est le reflet de l'absorption intestinale de glucose ainsi que de la sensibilité hépatique à l'insuline. En séquestrant les acides biliaires, les résines dé-activent FXR dans l'intestin (Pour revue : Prawitt *et al.* 2014). Or l'invalidation de FXR retarde l'apparition du glucose

dans la veine porte (Van Dijck *et al.* 2009) pouvant en partie expliquer la diminution de la glycémie après administration de résines. De plus, les complexes résines / acides biliaires sont toujours capables d'activer TGR5 (Potthoff *et al.* 2013). Or l'activation de TGR5 ralentit la motilité intestinale pouvant également expliquer la diminution d'apparition du glucose dans la veine porte (Alemi *et al.* 2013). Dans le foie, FXR réprime l'expression des gènes des enzymes de la glycolyse et de la lipogénèse (Duran-Sandoval *et al.* 2005, Caron *et al.* 2012). Les séquestrants des acides biliaires peuvent, en levant ces répressions, augmenter l'utilisation du glucose par le foie. Cette hypothèse fut confirmée chez des patients diabétiques de type 2 où l'administration de résine augmente la clairance du glucose plasmatique à jeun et améliore l'élimination du glucose par la glycolyse (« glycolytic disposal » en anglais ; mesurée en administrant un analogue du glucose où les atomes d'hydrogènes sur le carbone 6 sont remplacés par du deutérium, ces atomes disparaissent après action des gluco/hexokinases) des tissus périphériques dont le foie (Beysen *et al.* 2012). Ces résultats montrent que l'inhibition de FXR par les résines est bénéfique sur la glycémie en augmentant l'utilisation splanchnique du glucose.

Toutefois, la part relative de l'inactivation de FXR dans l'intestin sur l'amélioration de la glycémie par GLP-1 dans ce modèle n'a pas été testée.

2) Modulation des acides biliaires par un prébiotique

Les prébiotiques sont des molécules, généralement des oligo- ou des polysaccharides à courte chaîne, qui échappent à la digestion dans l'intestin grêle. Dans le colon, ils promeuvent le développement d'une espèce bactérienne ou d'un ensemble d'espèces bactériennes en leur apportant des substrats nécessaires à la fermentation.

De plus en plus d'études montrent que changer le ratio acides biliaires agonistes / acides biliaires antagonistes au profit des acides biliaires antagonistes serait bénéfique sur la glycémie des souris obèses diabétiques.

Récemment, il a été montré que l'administration pendant 5 jours de tempol, entraînait un shift du microbiote intestinal conduisant à plus d'acides biliaires antagonistes de FXR. Administré pendant 3 semaines, ce prébiotique améliore la glycémie de souris obèses par un mécanisme dépendant de FXR dans l'intestin. En effet, alors que le tempol améliore la glycémie des souris *iFxr+/+* il n'améliore pas plus cette glycémie dans les souris *iFxr-/-*, souris présentant *per se* une amélioration glycémique. Les auteurs suggèrent que cette amélioration de la glycémie se fait en grande partie par une diminution de la masse grasse des souris traitées (Li *et al.* 2013). **Toutefois, la part relative de GLP-1 sur l'amélioration de la glycémie dans ce modèle n'a pas été testée.**

3) D'autres molécules ciblant la voie des acides biliaires

a) Les inhibiteurs de ASBT

L'administration chronique d'un inhibiteur de ASBT, connu pour inhiber le transport actif des acides biliaires par le pôle apical des cellules épithéliales intestinales, améliore l'hyperglycémie chez des rats diabétiques (Chen *et al.* 2012). Cette amélioration s'explique par une augmentation de la sécrétion de GLP-1. **Toutefois, la part relative d'une inactivation de FXR dans l'intestin dans ce modèle n'a pas été testée.**

b) Les inhibiteurs d' α -glucosidase

Comme cité au préalable, les inhibiteurs d' α -glucosidase retardent l'absorption du glucose en inhibant l'hydrolyse des disaccharides, conduisant à plus de glucose dans les parties distales de l'intestin et à une augmentation de la sécrétion de GLP-1. Cette hausse de sécrétion de GLP-1 après administration de miglitol est due à une hausse de la sécrétion des acides biliaires (Hamada *et al.* 2013). Dans leur modèle, les auteurs ne voient qu'une tendance à l'augmentation de l'expression de Dio2, gène cible connu pour refléter l'activation de TGR5 dans le tissu adipeux brun. **Les auteurs n'ayant pas dosé les différentes espèces d'acides biliaires, on ne sait pas si ces acides biliaires sont plutôt agonistes ou antagonistes de FXR.**

OBJECTIFS

OBJECTIFS

Comme cité ci-dessus, l'activation de FXR dans le foie semble améliorer la glycémie de souris diabétiques de type 2 alors que l'inactivation de FXR dans l'intestin semble bénéfique sur la glycémie de souris hyperglycémiques. Lors de mon arrivée, une étude du laboratoire montrait que l'inactivation de FXR protégeait les souris *ob/ob* de l'obésité et améliorait l'hyperglycémie de ces souris (**Figure O1A et O1B**). Toutefois, dans ces souris *ob/ob Fxr-/-*, l'amélioration de la glycémie n'est pas dépendante d'un rôle de FXR dans le foie (Figure O1).

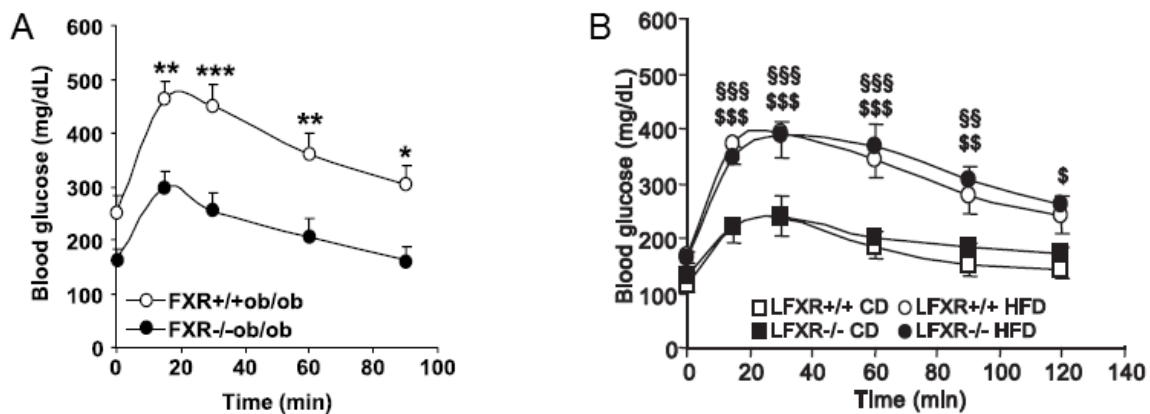


Figure O1: L'inactivation de FXR est bénéfique pour la glycémie des souris obèses (D'après Prawitt et al., Diabetes 2011). A. Profil glycémique des souris *ob/ob Fxr+/+* et *ob/ob Fxr-/-* après une injection péritonéale de 2g/kg de glucose. B. Profil glycémique des souris invalidées (*LFxr-/-*) ou non (*LFxr+/+*) pour FXR dans le foie et nourries par un régime normal (CD) ou riche en graisse (HFD).

De plus, dans les souris *ob/ob*, le traitement par le Colesevelam, une résine séquestrante des acides biliaires, améliore la glycémie après injection intrapéritonéale de glucose par un mécanisme dépendant de FXR. Mon projet de thèse, qui s'inscrit dans le cadre de l'ANR FXREn, fut initié à partir de l'observation que l'expression du proglucagon augmentait dans les intestins des souris *ob/ob Fxr-/-* comparativement aux souris *ob/ob Fxr+/+*. De plus, administré mélangé au régime, le Colesevelam augmentait également l'expression du proglucagon des souris *ob/ob Fxr+/+*. Toutefois, rien n'était connu quant à l'expression ni le rôle de FXR dans la cellule L. Dans les GLUTag, des résultats préliminaires montraient que le traitement de GLUTag avec des acides biliaires diminuait l'expression du Proglucagon. J'ai d'abord cherché à déterminer si cette diminution était un reflet de l'activation de FXR. Pour cela, j'ai montré lors de mon stage de Master 2 que cette lignée cellulaire exprimait FXR tant au niveau génique que protéique. De plus, en utilisant une approche de traitement pharmacologique des GLUTag avec un agoniste sélectif de FXR, j'ai pu mettre au point les conditions nécessaires à la diminution d'expression du Proglucagon après activation de FXR dans les GLUTag.

Voici les questions auxquelles j'ai voulu répondre durant ma thèse :

A) FXR est-il exprimé dans les cellules L primaires murines et chez l'Homme ?

B) FXR régule-t-il la synthèse du proglucagon et de GLP-1 ? Par quel mécanisme ?

C) FXR régule-t-il la capacité de la cellule L à sécréter GLP-1 en réponse au glucose ?

D) La voie FXR/GLP-1 peut-elle être une cible thérapeutique pour soigner le diabète de type 2 ?

RESULTATS

RESULTATS

Farnesoid X Receptor Inhibits Glucagon-Like Peptide-1 Production by Enteroendocrine L-cells

Short title:

FXR inhibits GLP-1 production

Authors:

Mohamed-Sami TRABELSI ^{1,2,3,4}, Mehdi DAOUDI ^{1,2,3,4}, Janne PRAWITT ^{1,2,3,4}, Grégory BAUD ^{1,2,5}, Sama I. SAYIN ^{6,7}, Cheryl A. BRIGHTON ⁸, Yasmine SEBTI ^{1,2,3,4}, Jérôme KLUZA ^{2,9}, Olivier BRIAND ^{1,2,3,4}, Hélène DEHONDT ^{1,2,3,4}, Véronique TOUCHE ^{1,2,3,4}, Nathalie HENNUYER ^{1,2,3,4}, Sandrine CARON ^{1,2,3,4}, Robert CAIAZZO ^{1,2,5}, Frank REIMANN ⁸, Philippe MARCHETTI ^{2,9,10}, Philippe LEFEBVRE ^{1,2,3,4}, Fredrik BÄCKHED ^{6,7,11}, Fiona M. GRIBBLE ⁸, François PATTOU ^{1,2,5}, Anne TAILLEUX ^{1,2,3,4}, Bart STAELS ^{1,2,3,4,5} & Sophie LESTAVEL ^{1,2,3,4}.

¹ European Genomic Institute for Diabetes (EGID), FR 3508, F-59000 Lille, France; ² Université Lille 2, F-59000 Lille, France; ³ INSERM UMR 1011, F-59000 Lille, France ; ⁴ Institut Pasteur de Lille, F-59000 Lille, France; ⁵ INSERM UMR 859, F-59000 Lille, France; ⁶ Wallenberg Laboratory/Sahlgrenska Center for Cardiovascular and Metabolic Research, Sahlgrenska University Hospital, Gothenburg 413445, Sweden; ⁷ Department of Molecular and Clinical Medicine, University of Gothenburg, Gothenburg 41345, Sweden; ⁸ Cambridge Institute for Medical Research and Institute of Metabolic Sciences, Addenbrooke's Hospital, Hills Road, Cambridge CB2 0XY, UK; ⁹ INSERM U 837, F- 59045 Lille Cedex, France; ¹⁰ Centre de Bio-Pathologie, Plate-forme de Biothérapie, Banque de Tissus, CHRU Lille, France; ¹¹ Section for Metabolic Receptology and Enteroendocrinology, Novo Nordisk

Foundation Center for Basic Metabolic Research, Faculty of Health Sciences, University of Copenhagen, Copenhagen 2200, Denmark.

§ Correspondence:

Pr. Bart Staels

Institut Pasteur de Lille, 1 rue du Pr Calmette, 59019 Lille; France.

e-mail address: bart.staels@pasteur-lille.fr

phone number: (+0033)3.20.87.78.25, fax number: (+0033)3.20.87.73.60

Abstract:

Bile acids (BA) are signalling molecules which activate the transmembrane receptor TGR5 and the nuclear receptor FXR. The anti-diabetic BA sequestrants (BAS) complex BA in the intestinal lumen and decrease FXR activity in enterocytes. BAS-BA complex binding to TGR5 on L-cells induces the production of Glucagon-Like Peptide-1 (GLP-1) which potentiates glucose-induced insulin secretion by pancreatic β -cells. Whether FXR is expressed and controls GLP-1 production in L-cells is unknown. Here we show that FXR is expressed in human and murine L-cells. Moreover, FXR-deficiency increases GLP-1 production and secretion. FXR activation decreases proglucagon gene expression by interfering with the glucose-responsive transcription factor ChREBP. Activation of FXR also decreases the glycolytic pathway and intracellular ATP levels, resulting in a decrease of GLP-1 secretion. Finally, treatment with the BAS colesevelam increases intestinal proglucagon gene expression. These findings identify an unexpected role for FXR in the regulation of L-cell GLP-1 production and secretion.

Keywords:

bile acids; glucose; glycolysis; intestine; pharmacology

Introduction

Bile acids (BA) are amphipathic molecules derived from cholesterol, synthesized and conjugated in the liver, stored in the gallbladder, delivered in the intestinal lumen after meal ingestion and further metabolized by the gut microbiota into secondary BA. Initially considered to be dietary lipid detergents, BA are now recognized as signalling molecules which, through binding and activation of the membrane receptor TGR5, the nuclear receptors Vitamin D Receptor (VDR), Pregnane X Receptor (PXR) and Farnesoid X Receptor (FXR, *NR1H4*), play key roles in the control of energy homeostasis ⁴.

TGR5, a G protein-coupled receptor, first described as a regulator of cytokine production in a human monocyte cell line ³, was recently shown to promote Glucagon-Like Peptide-1 (GLP-1) secretion in response to BA by intestinal enteroendocrine L-cells ⁴. Although representing <1% of the intestinal epithelial cells, enteroendocrine cells play key roles in the regulation of energy metabolism through their capacity to secrete various bio-active peptides. After food ingestion, GLP-1 and Glucose-dependent Insulinotropic Polypeptide (GIP), another incretin peptide, are secreted by L and K cells respectively and subsequently potentiate postprandial insulin secretion by pancreatic β cells in response to glucose, the so-called incretin effect ⁴. Even though the insulinotropic property of GLP-1 is maintained, its secretion in response to a meal is decreased in type 2 diabetic patients ⁵⁵. This observation has led to the development of DPP-IV inhibitors which increase GLP-1 half-life and GLP-1 mimetics which improve glucose homeostasis with less risk for hypoglycaemia ⁶.

Together with TGR5, FXR controls BA-induced signalling pathways. FXR, predominantly expressed in the liver and intestine, was first identified as a regulator of hepatic BA metabolism through the induction of Small Heterodimer Partner (SHP) in the liver and Fibroblast Growth Factor 15 (FGF15) in the intestine, resulting in the subsequent inhibition of the rate-limiting enzyme in hepatic BA synthesis, cholesterol 7 α -hydroxylase (CYP7A1), and the regulation of BA transporters (for review ⁹⁷). FXR in the liver also plays a

modulatory role in the regulation of lipid and glucose homeostasis. FXR activation with the synthetic agonist GW4064 decreases hepatic gluconeogenic gene expression and increases glycogenesis¹¹ thus improving glucose homeostasis in diabetic mice. We have shown that FXR activation in hepatocytes also inhibits the induction of glycolytic gene expression by glucose in the liver through negative interference with the carbohydrate response element binding protein ChREBP (also known as MlxIPL)⁸¹³. Recent studies have highlighted a metabolic role of non-hepatic and specifically intestinal FXR in mice under pathophysiological conditions such as obesity⁹101410912. Indeed, treatment of high-fat diet fed mice with the synthetic FXR agonist GW4064 promotes hyperglycaemia and obesity⁹, an opposite effect than upon intraperitoneal injection of the drug¹³. Second, in two different models of obesity, whole-body FXR-deficient mice displayed improved metabolic parameters, improvements not observed in hepatocyte-specific FXR-deficient animals¹⁰. Moreover, intestinal specific FXR-deficient mice are protected against diet-induced obesity¹⁶. This study also identified a crucial role of the intestinal microbiota in BA signalling by controlling the balance of BA FXR agonists:antagonists. Indeed, levels of the primary BA tauro beta-Muricholic acid (T β MCA) are elevated in Germ-Free (GF) mice due to a lack of conversion into secondary BA and acts as a FXR antagonist¹¹¹² to improve glucose metabolism via intestinal FXR¹¹. Finally, BA pool and composition are modulated by BA sequestrants (BAS). BAS, such as colestevlam, are anionic resins that trap BA in the intestinal lumen. Initially used for their cholesterol-lowering effects, they have more recently been shown to act as antidiabetic drugs¹⁶. In diabetic *db/db* mice, BAS administration de-activates intestinal FXR and increases glucose clearance in peripheral tissues¹³. Among the proposed action mechanisms of BAS is a TGR5-mediated increase of GLP-1 secretion in diet-induced obese mice¹⁷. In addition to their acute effects on GLP-1 secretion, BAS-bound BA enhance proglucagon gene expression through TGR5, another mechanism via which this transmembrane receptor regulates GLP-1 production¹⁴.

However, whether FXR is expressed and plays a role in L-cells has not been reported yet. Using the murine GLUTag L cell line, human intestinal biopsies and different mouse models, we demonstrate that FXR is expressed and functional in enteroendocrine L-cells. In mice, FXR-deficiency increases proglucagon mRNA levels and glucose-induced GLP-1 secretion. *In vitro*, FXR activation decreases both proglucagon mRNA and protein levels and intracellular ATP, leading to decreased GLP-1 secretion levels. In mice and *ex vivo* in human intestinal biopsies, activated FXR down-regulates proglucagon mRNA levels. Finally, studies with colesevelam in *ob/ob Fxr+/+* and *ob/ob Fxr-/-* mice demonstrate that BAS exert their beneficial effect on glycemia at least in part by a FXR-dependent increase of proglucagon mRNA levels.

Results

Fxr-/- mice exhibit higher proglucagon mRNA and GLP-1 levels

Figure-1 (Staels)

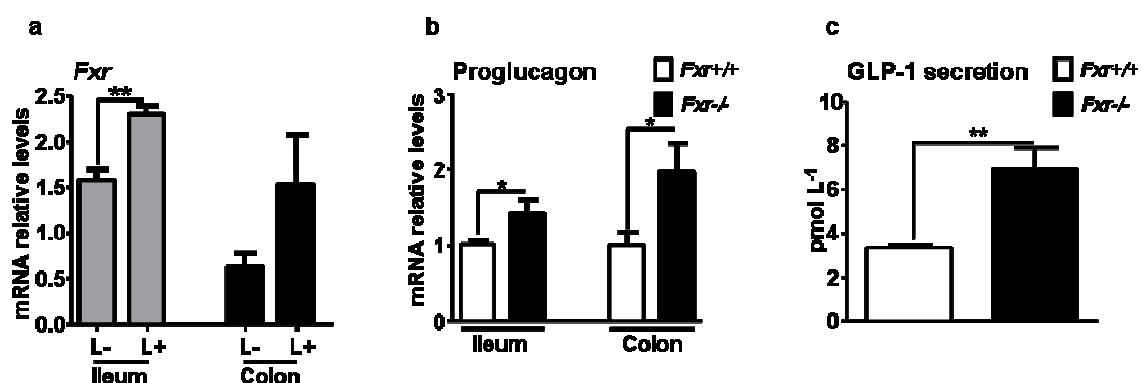


Figure 1. *Fxr*^{-/-} mice exhibit higher proglucagon mRNA and GLP-1 levels. (a) *Fxr* expression by qPCR in FACS-sorted proglucagon-negative and proglucagon-positive cells from the ileum (ileum L-; ileum L+) and colon (colon L-; colon L+) of GLU-VENUS mice. (b) Proglucagon qPCR on cDNA from ileum and colon of 8 week-old *Fxr*^{+/+} or *Fxr*^{-/-} mice. (c) GLP-1 secretion by 8 week-old *Fxr*^{+/+} or *Fxr*^{-/-} mice 15min after an oral challenge with glucose 3 g per kg. n=5-6 per group. Student t test, *P<0.05 & **P<0.01. Data are represented as mean +/- SEM.

Previous studies have reported high expression of FXR in intestinal epithelial cells¹⁹. However its expression in enteroendocrine L-cells has not yet been assessed. We analysed

Fxr expression in L-cells sorted by FACS from transgenic proglucagon-VENUS mice ¹⁵¹⁶. As expected, *Fxr* gene is more abundantly expressed in ileal non-L-cells (ileum L-) than in colonic non-L-cells (colon L-) ¹⁷²¹ (Fig. 1a). Surprisingly, *Fxr* is expressed in L-cells in distal intestine being significantly higher in L-cells from the ileum (ileum L+) compared to non-L-cells. Because intestinal FXR-deficient mice are protected from high-fat diet-induced obesity ¹⁰¹⁰⁹¹¹ we measured proglucagon mRNA levels and GLP-1 secretion after an oral glucose test in FXR-deficient mice. Compared to *Fxr*^{+/+} mice, *Fxr*^{-/-} mice display increased proglucagon mRNA levels in the ileum and colon (Fig. 1b). Moreover, FXR-deficient mice exhibit a greater incretin secretion in plasma 15 min after oral glucose administration (Fig. 1c).

FXR is expressed and functional in GLUTag L-cells

Figure-2 (Staels)

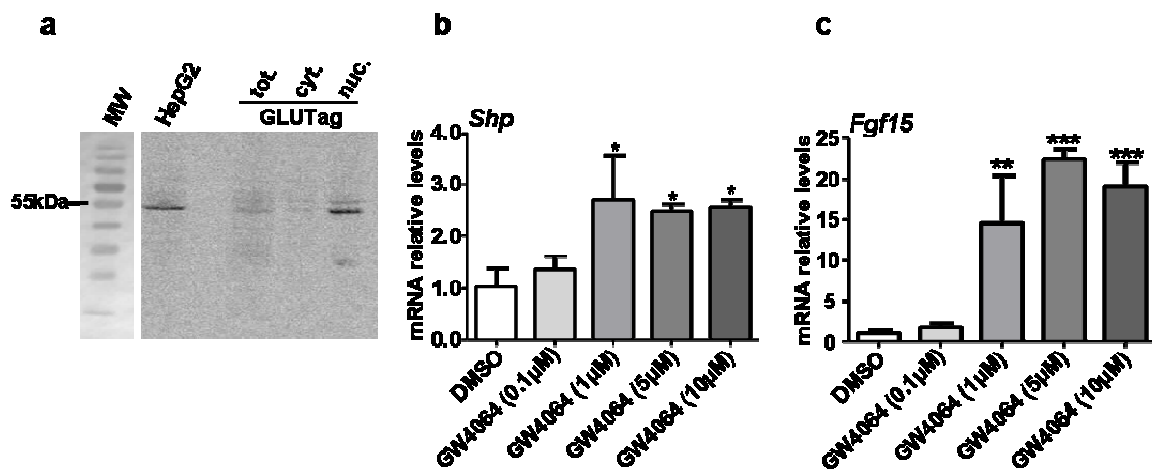


Figure 2. FXR is expressed and functional in GLUTag L cells. (a) FXR western-blot analysis on fractionated protein extracts from GLUTag cells. Total proteins from HepG2 are used as control. *Shp* (b) and *Fgf15* (c) qPCRs on cDNA from GLUTag cells treated for 24h with GW4064 (0.1, 1, 5 and 10 μ mol L⁻¹). Student *t* test, **P*≤0.05, ***P*≤0.01 & ****P*≤0.001. Data are represented as mean +/- SD.

Because L-cells represent <1% of total intestinal epithelial cells ⁴ and because culture of isolated L-cells is not yet possible, we used the well-defined murine L-cell model GLUTag to study the regulation of GLP-1 by FXR ¹⁸²⁶. FXR is expressed at mRNA (*Fxr* Ct=28 for cyclophilin Ct=22) and protein levels being enriched in the nuclear fraction (Fig. 2a).

Furthermore, incubation of GLUTag cells with the FXR agonist GW4064 results in the induction of the enterocytic FXR target genes *Fgf15* (Fig. 2b) and *Shp* (Fig. 2c) indicating the presence of functional FXR in these cells.

FXR activation decreases proglucagon in GLUTag cells
Figure-3 (Staels)

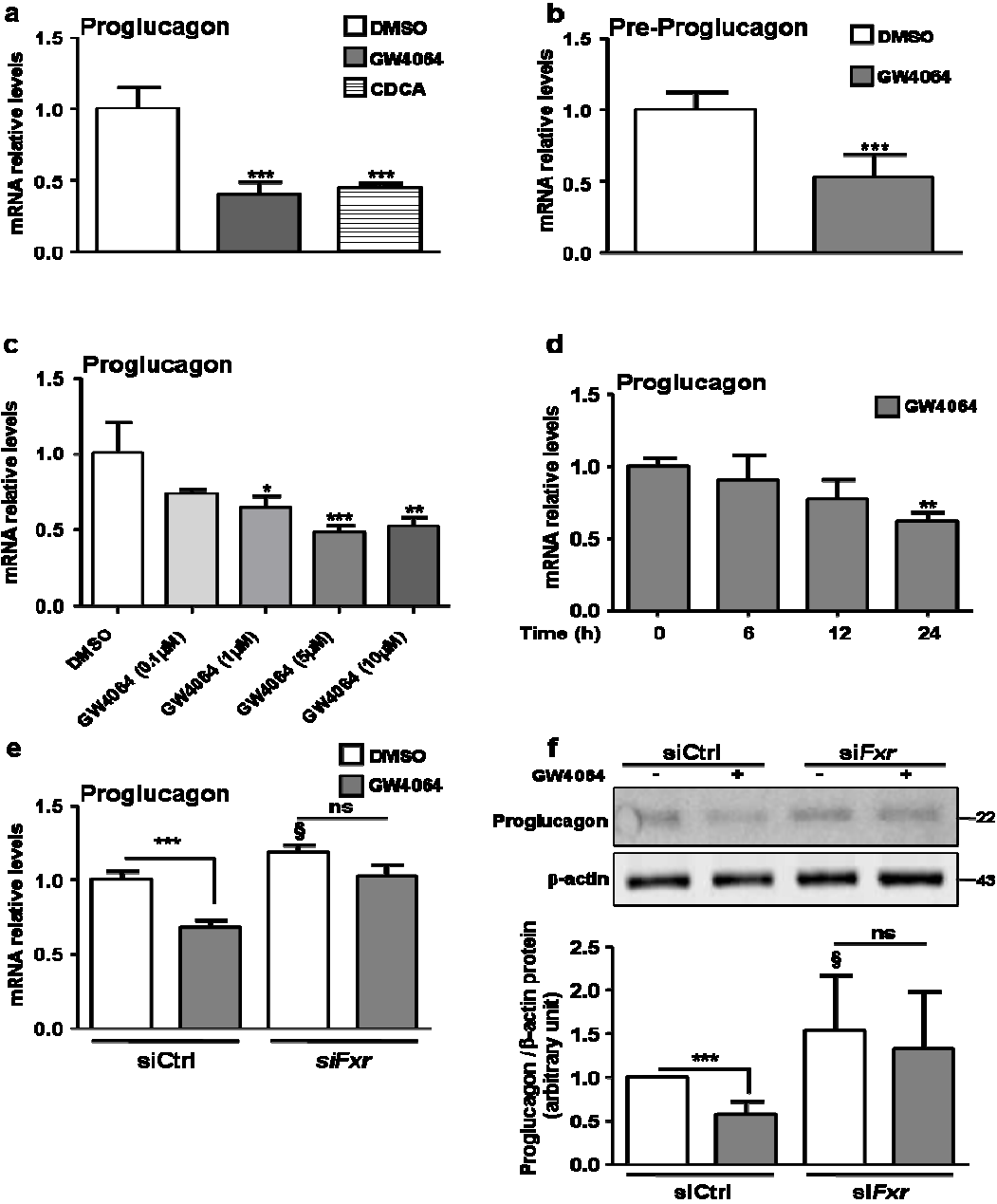
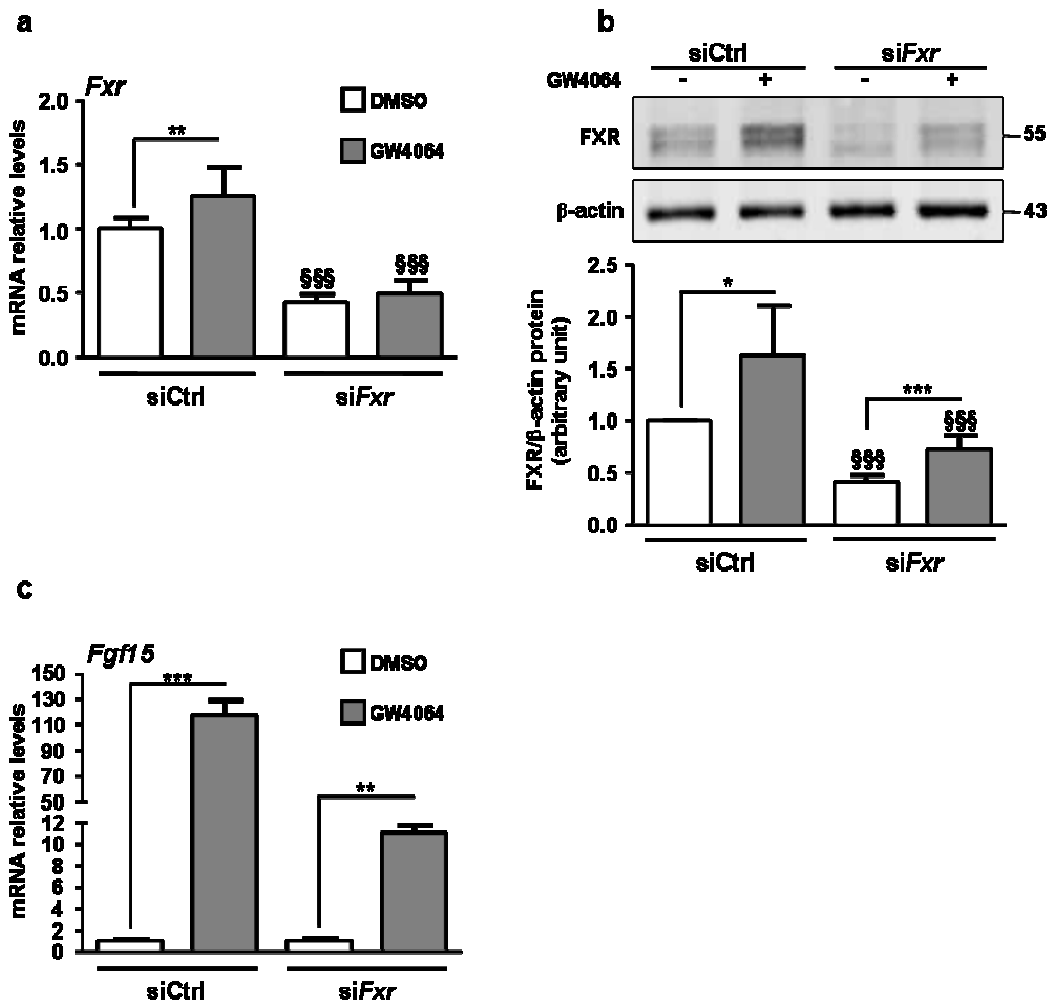


Figure 3. FXR activation decreases proglucagon mRNA in GLUTag cells. (a) Proglucagon qPCR on cDNA from GLUTag cells treated for 24h with GW4064 (10 μmol L⁻¹) or CDCA (100 μmol L⁻¹). (b) Proglucagon pre-mRNA quantification on cDNA from GLUTag cells treated for 24h with GW4064 (5 μmol L⁻¹). (c) Proglucagon qPCR on cDNA from GLUTag cells treated for 24h with GW4064 (0.1, 1, 5 or 10 μmol L⁻¹). (d) Proglucagon qPCR

on cDNA from GLUTag cells treated for 0, 6, 12 or 24h with GW4064 ($5 \mu\text{mol L}^{-1}$). Student *t* test, $*P \leq 0.05$, $**P \leq 0.01$ & $***P \leq 0.001$ vs. DMSO condition. (e) Proglucagon qPCR on cDNA from GLUTag cells electroporated with siCtrl or siFxr and treated for 24h with GW4064 ($5 \mu\text{mol L}^{-1}$). (f) Representative western-blot of protein extracts from GLUTag cells electroporated with a siCtrl or with a siFxr and treated for 24h with GW4064 ($5 \mu\text{mol L}^{-1}$) (upper panel) and quantification (lower panel) of proglucagon from 4 western-blot. Student *t* test, $***P \leq 0.001$ vs. DMSO of transfection-matched condition and $^{\S}P \leq 0.05$ vs. siCtrl of treatment-matched condition. Data are represented as mean \pm SD.

Supplementary figure 1



Supplementary figure 1. (a) *Fxr* qPCR on cDNA from GLUTag cells electroporated with a siFxr or with a siCtrl and treated for 24h with GW4064 ($5 \mu\text{mol L}^{-1}$). (b) Representative (Upper panel) and quantifications (Lower panel) of FXR western-blot on protein extracts from GLUTag cells electroporated with a siCtrl or with a siFxr and treated for 24h with GW4064 ($5 \mu\text{mol L}^{-1}$). (c) *Fgf15* qPCR on cDNA from GLUTag cells electroporated with a siFxr or with a siCtrl and treated for 24h with GW4064 ($5 \mu\text{mol L}^{-1}$). Student *t* test, $*P \leq 0.05$, $**P \leq 0.01$ & $***P \leq 0.001$ vs. DMSO of transfection-matched condition and $^{\S\S\S}P \leq 0.001$ vs. siCtrl of treatment-matched condition. Data are represented as mean \pm SD.

To study whether FXR regulates the production of GLP-1, the major bio-active peptide produced by L-cells, GLUTag cells were incubated for 24h with GW4064 ($10 \mu\text{mol L}^{-1}$) or chenodeoxycholic acid (CDCA, $100 \mu\text{mol L}^{-1}$), synthetic and natural FXR ligands respectively. FXR activation with either GW4064 or CDCA, in standard culture glucose concentrations (5.6 mmol L^{-1}), decreases proglucagon mRNA levels (Fig. 3a). Using primer combinations covering exon 2 to intron 2 of the proglucagon gene, a similar decrease of proglucagon pre-mRNA levels is observed, suggesting that FXR negatively regulates proglucagon gene transcription (Fig. 3b). This decrease upon GW4064 treatment occurs in a dose- and time-dependent manner with a maximum effect at $5 \mu\text{mol L}^{-1}$ (Fig. 3c), a concentration often used to study FXR activation¹⁹, after 24h of treatment (Fig. 3d). To investigate whether the effect of GW4064 is FXR-dependent, FXR expression was knocked-down (KD) in GLUTag cells using specific siRNA and cells were subsequently incubated with or without GW4064 ($5 \mu\text{mol L}^{-1}$). SiRNA KD decreases >50% FXR mRNA (Supplementary Fig. 1a) and protein levels (Supplementary Fig. 1b), resulting in a significantly lower induction of *Fgf15* mRNA levels by GW4064 (Supplementary Fig. 1c). As previously observed in human and murine hepatocytes, GW4064 treatment increases FXR protein expression⁸¹⁹, but KD of FXR is still observed (Supplementary Fig. 1b). FXR KD slightly increases proglucagon mRNA (Fig. 3e) and protein levels (Fig. 3f). Whereas GW4064 incubation decreases proglucagon mRNA and protein levels in siCtrl cells, such a decrease is not observed in si*Fxr* cells, indicating that FXR expression is required for the decrease of proglucagon gene expression.

FXR inhibits the glucose-induced proglucagon increase

Figure-4 (Staels)

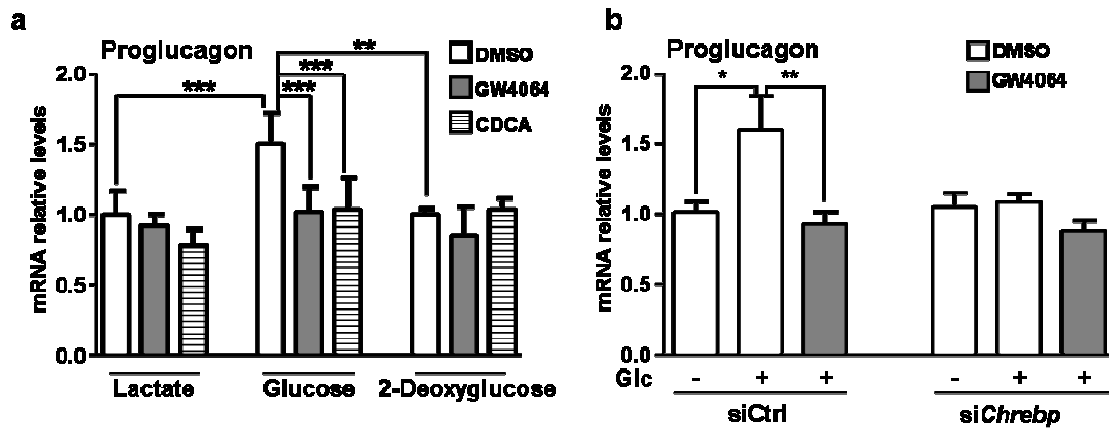
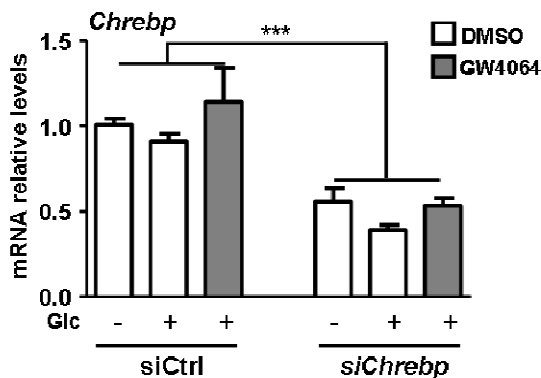


Figure 4. Glucose-induced proglucagon gene expression is mediated by ChREBP and is inhibited by FXR activation. (a) Proglucagon qPCR on cDNA from GLUTag cells starved for 12h with lactate (10 mmol L^{-1}) and then incubated for 24h in lactate (10 mmol L^{-1}), glucose (5.6 mmol L^{-1}) or 2-deoxyglucose (5.6 mmol L^{-1}) media supplemented with DMSO, GW4064 ($5 \mu\text{mol L}^{-1}$) or CDCA ($100 \mu\text{mol L}^{-1}$). (b) Proglucagon qPCR on cDNA from GLUTag cells electroporated with a siCtrl or siChrebp, starved for 12h with lactate (10 mmol L^{-1}) and then incubated for 24h in lactate 10 mmol L^{-1} (Glc -) or glucose 5.6 mmol L^{-1} (Glc +) media supplemented with DMSO or GW4064 ($5 \mu\text{mol L}^{-1}$). Student *t* test, * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$ & *** $P \leq 0.001$. Data are represented as mean \pm SD.

Supplementary figure 2



Supplementary figure 2. ChREBP qPCR on cDNA from siCtrl and siChREBP electroporated GLUTag cells incubated or not with GW4064 ($5 \mu\text{mol L}^{-1}$) in a medium containing lactate (10 mM) or glucose (5.6 mM). OneWay ANOVA followed by Tukey Posthoc test, *** $P \leq .001$.

It has previously been shown that glucose induces proglucagon gene expression in GLUTag L-cells¹⁹. Moreover, in hepatocytes, FXR activation inhibits the induction of glycolytic and lipogenic genes by glucose²⁰. To determine whether FXR activation also acts on the glucose-induced response in L-cells, GLUTag cells were cultured during 12h in

glucose-free medium and subsequently incubated in medium containing lactate (10 mmol L⁻¹), glucose (5.6 mmol L⁻¹) or 2-deoxyglucose (5.6 mmol L⁻¹) (Fig. 4a). As expected²¹, glucose increases proglucagon gene expression (Fig. 4a). 2-deoxyglucose incubation, a non-metabolised glucose analogue, does not increase proglucagon mRNA levels, highlighting that glucose metabolism through glycolysis is necessary for the glucose-induced proglucagon gene expression. Moreover, FXR activation for 24h with either GW4064 or CDCA inhibits proglucagon gene expression only in L-cells incubated in standard (5.6 mmol L⁻¹), but not in low glucose concentrations (Fig. 4a).

Because ChREBP is a glucose sensitive transcription factor activated by glucose metabolites²² and since FXR activation interferes with the ChREBP-mediated induction of glycolytic enzyme gene expression by glucose in hepatocytes²⁰, we next assessed whether this regulatory mechanism is operational also in L-cells. ChREBP siRNA KD, resulting in ≥50% decrease of *Chrebp* mRNA levels (Supplementary Fig. 2), prevents the increase in proglucagon mRNA levels by glucose (Fig. 4b). Whereas in siCtrl transfected cells FXR activation inhibits the increase of proglucagon mRNA levels by glucose, this effect is not observed in ChREBP KD cells.

Taken together, these data demonstrate that glucose metabolism is necessary for the glucose-dependent ChREBP-mediated increase of proglucagon gene expression which is inhibited upon FXR activation.

FXR decreases glycolysis and inhibits GLP-1 secretion

Figure-5 (Staels)

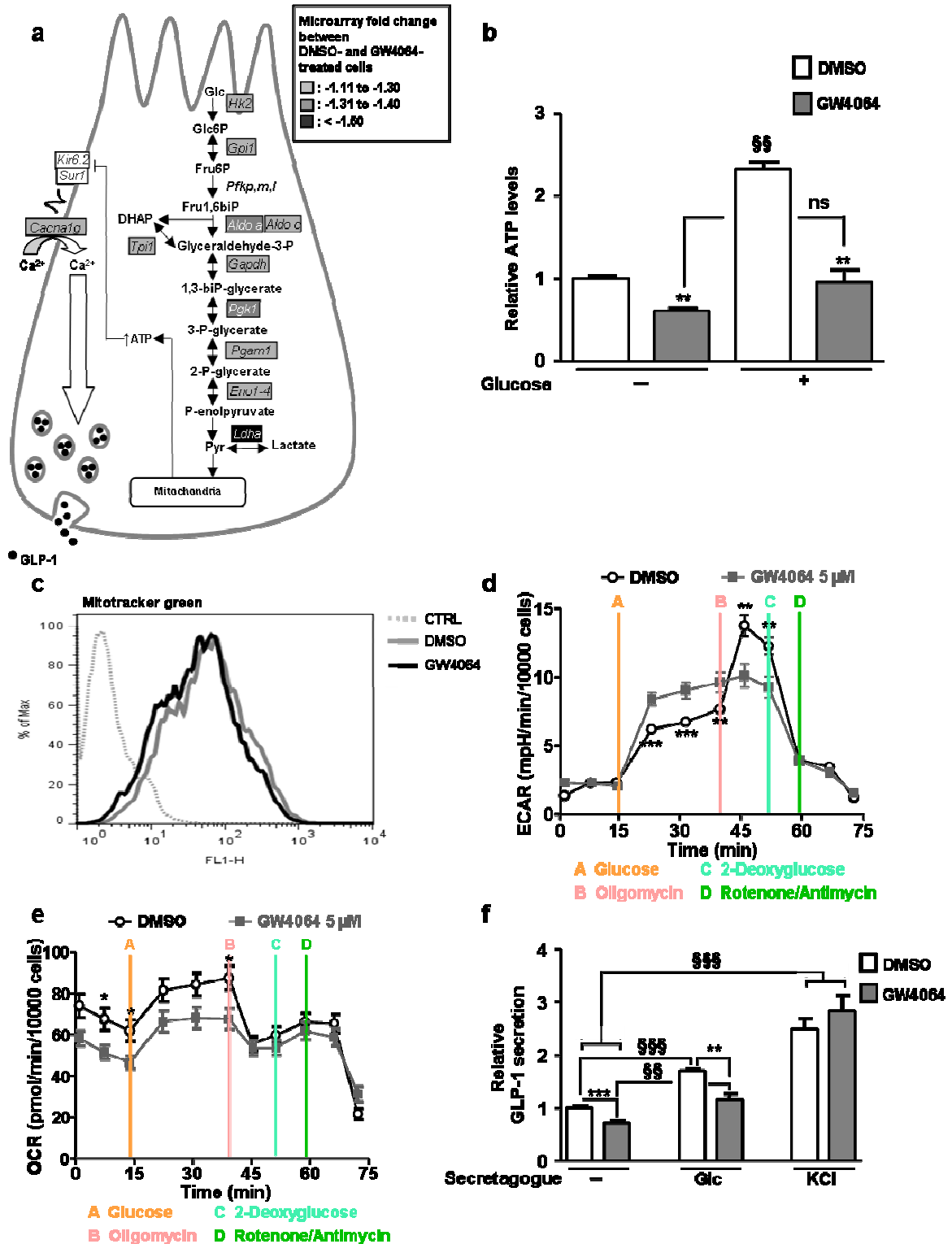


Figure 5. FXR inhibits GLP-1 secretion by decreasing glycolysis. (a) DNA microarrays on 24h DMSO- and GW4064 (5 $\mu\text{mol L}^{-1}$)-treated GLUTag cells were performed using Agilent Technology and genes which expression is down-regulated by 10%, by 10%- 30% and up to 50% after GW4064 treatment were written with black italic letters in rectangles filled in grey, with white italic letters in rectangles filled in grey and with white italic

letters in black filled rectangles respectively. *P* value of the glycolysis biological process: $P=4.33 \times 10^{-6}$. (b) ATP measurements on GLUTag cells treated for 24h with GW4064 ($5 \mu\text{mol L}^{-1}$), starved for 30 min in glucose-free Krebs buffer and then stimulated or not for 1h with glucose (5.6 mmol L^{-1}). Student *t* test, $**P \leq 0.01$ vs. DMSO condition; $^{\$ \$}P \leq 0.01$ vs. no secretagogues. (c) Fluorescence measurements by Mitotracker Green in GLUTag cells incubated with DMSO or GW4064. (d) Extracellular acidification rate (ECAR) after successive injection of glucose (10 mmol L^{-1}), oligomycin ($1 \mu\text{mol L}^{-1}$), 2-deoxyglucose (100 mmol L^{-1}) and rotenone ($1 \mu\text{mol L}^{-1}$) / antimycin A ($1 \mu\text{mol L}^{-1}$) on GLUTag cells incubated 24h with DMSO or GW4064. (e) Oxygen consumption rate (OCR) after successive injection of glucose (10 mmol L^{-1}), oligomycin ($1 \mu\text{mol L}^{-1}$), 2-deoxyglucose (100 mmol L^{-1}) and rotenone ($1 \mu\text{mol L}^{-1}$) / antimycin A ($1 \mu\text{mol L}^{-1}$) on GLUTag cells incubated 24h with DMSO or GW4064. Student *t* test, $*P \leq 0.05$, $**P \leq 0.01$ & $***P \leq 0.001$. Data are represented as mean \pm SEM. (f) GLP-1 measurements on supernatants of GLUTag cells treated for 24h with GW4064 ($5 \mu\text{mol L}^{-1}$), starved 30 min in glucose-free Krebs buffer and then stimulated or not for 1h with glucose- (5.6 mmol L^{-1}) or KCl- (30 mmol L^{-1}) containing buffers. Student *t* test, $**P \leq 0.01$ & $***P \leq 0.001$ vs. DMSO condition; $^{\$ \$}P \leq 0.01$ & $^{\$ \$ \$}P \leq 0.001$ vs. no secretagogue. Data are represented as mean \pm SD.

GLP-1 secretion in response to glucose occurs, at least in part, through glucose metabolism by glycolysis²³. DNA microarray followed by Gene Ontology (GO) analysis was performed on GW4064-treated GLUTag cells. Interestingly, GW4064 treatment down-regulates the expression of several glycolytic genes leading to a significant decrease of this pathway ($P=4.33 \times 10^{-6}$) (Fig. 5a). This decrease is translated into decreased basal and glucose-enhanced intracellular ATP levels (Fig. 5b). GW4064 treatment does not decrease mitochondrial mass as assessed by the Mitotracker Green assay (Fig. 5c). However, glycolytic capacity, as assessed by extracellular acidification rate (ECAR) measurements after oligomycin treatment, is lower in GW4064 pre-treated cells (Fig. 5d). In parallel, FXR activated cells display decreased basal- and ATP-dependent oxygen consumption rates (OCR) (Fig. 5e) likely reflecting the decrease in activity of the global glycolysis pathway as also observed in the microarray experiment. Finally, FXR activation results in lower basal and glucose-induced GLP-1 secretion (Fig. 5f). However, GW4064 does not influence GLP-1 secretion after KCl incubation (Fig. 5f), indicating an activity upstream of the membrane depolarisation.

FXR decreases proglucagon mRNA levels in human biopsies

Figure-6 (Staels)

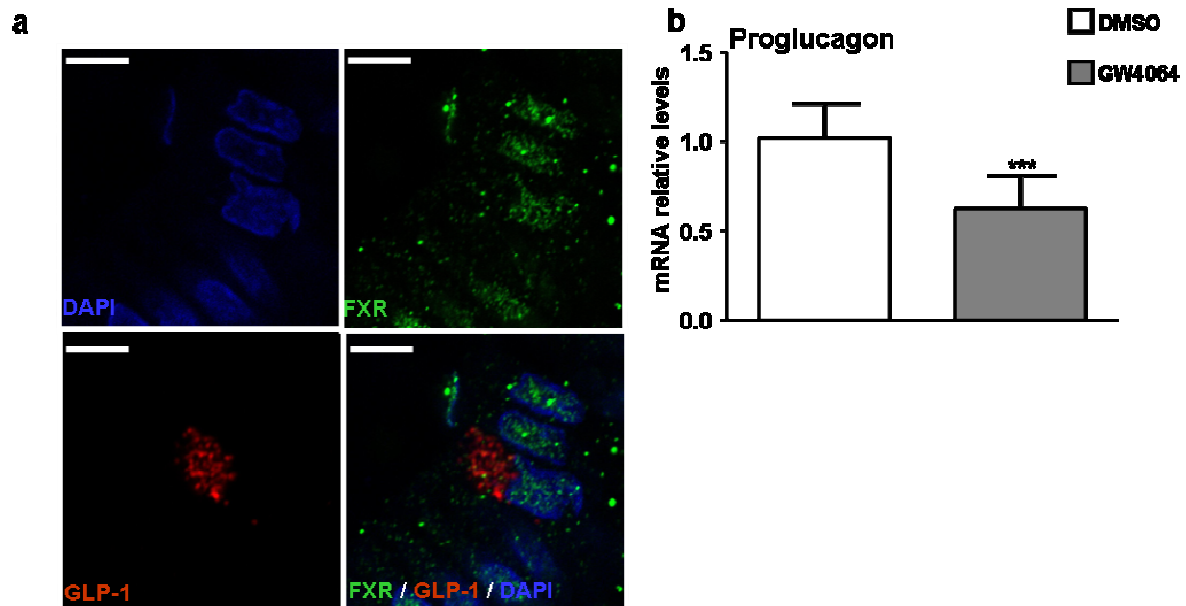
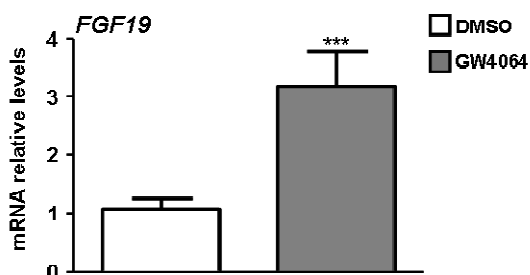


Figure 6. FXR is expressed in human L-cells and decreases proglucagon mRNA. (a) Twelve μm -thick slices from human jejunal biopsies were incubated with antibodies against FXR (in green) and GLP-1 (in red). Co-expression was assessed on a confocal microscope. Scale bar represents 2 μm . (b) Proglucagon qPCR on cDNA of human jejunal biopsies from normoglycemic patients treated for 16h with GW4064 ($5 \mu\text{mol L}^{-1}$). Student *t* test, *** $P \leq 0.001$. Data are represented as mean \pm SD.

Supplementary figure 3



Supplementary figure 3. FGF19 qPCR on cDNA of human jejunal biopsies from normoglycemic patients treated for 16h with GW4064 ($5 \mu\text{mol L}^{-1}$). Student *t* test, *** $P \leq 0.001$. Data are represented as mean \pm SD.

Because FXR is also expressed in human intestinal epithelial cells²⁴ and to test whether proglucagon expression is also regulated by FXR in humans, FXR expression in human L-cells was assessed. Confocal microscopy analysis on human intestinal biopsies revealed that FXR is expressed in human enteroendocrine L-cells, with positive staining in

the nucleus of both GLP-1 positive and GLP-1 negative epithelial cells (Fig. 6a). FXR activation in human intestinal biopsies results in the expected induction of *FGF19* mRNA levels (Supplementary Fig. 3), the human *FGF15* orthologue, and interestingly decreases proglucagon gene expression (Fig. 6b).

FXR decreases proglucagon mRNA levels in vivo in mice

To assess the regulation of intestinal proglucagon mRNA *in vivo*, 8 week-old C57Bl6-J wild-type mice were treated daily by gavage with GW4064 (30 mg per kg) for 5 days. Whereas, as expected, *Fgf15* mRNA levels increase after FXR agonist treatment (Supplementary Fig. 4a), proglucagon mRNA levels decrease in both the ileum and colon of treated mice (Fig. 7a). Because Germ-Free (GF) and conventionally-raised (CONV-R) mice display different FXR antagonist:agonist ratios due to the conversion of T β MCA, a primary BA and FXR antagonist in mice, to the secondary BA, TwMCA, by the gut microbiota resulting in higher *in vivo* FXR activation levels¹², we compared proglucagon mRNA levels in GF and CONV-R WT and FXR-deficient mice. As expected (Fig. 1b), CONV-R *Fxr*^{-/-} mice displayed higher proglucagon mRNA levels compared to CONV-R *Fxr*^{+/+} mice (Fig. 7b). However, in GF mice proglucagon gene expression tended to be higher compared to CONV-R mice. However, FXR-deficiency no longer modulates proglucagon mRNA levels, indicating that its regulation by the gut microbiota occurs via FXR in the distal intestine. In GLUTag cells, incubation for 24h with the FXR antagonist T β MCA decreases *Fgf15* gene expression (Supplementary Fig. 4b) and increases proglucagon mRNA levels (Supplementary Fig. 4c). Thus, modulation of endogenous FXR ligands by the microbiota influences proglucagon gene expression in an FXR-dependent manner.

Figure-7 (Staels)

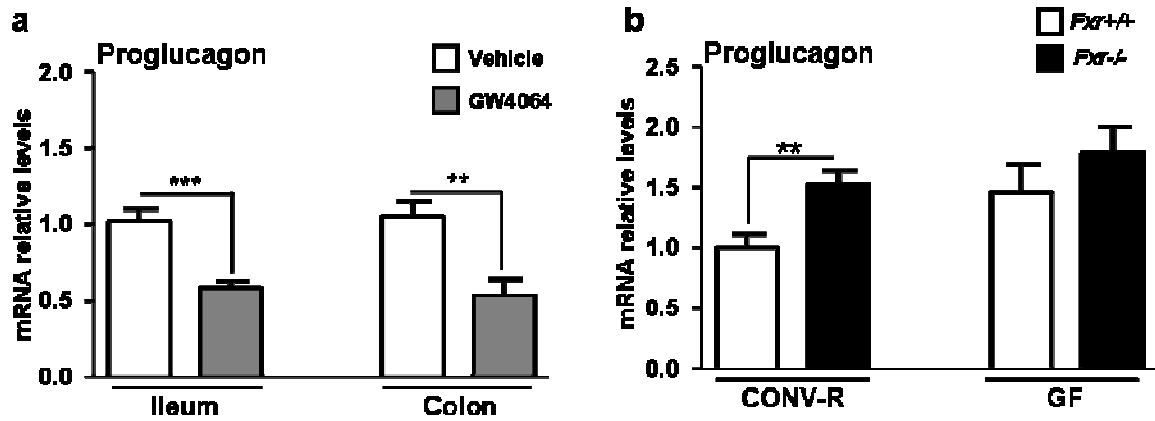
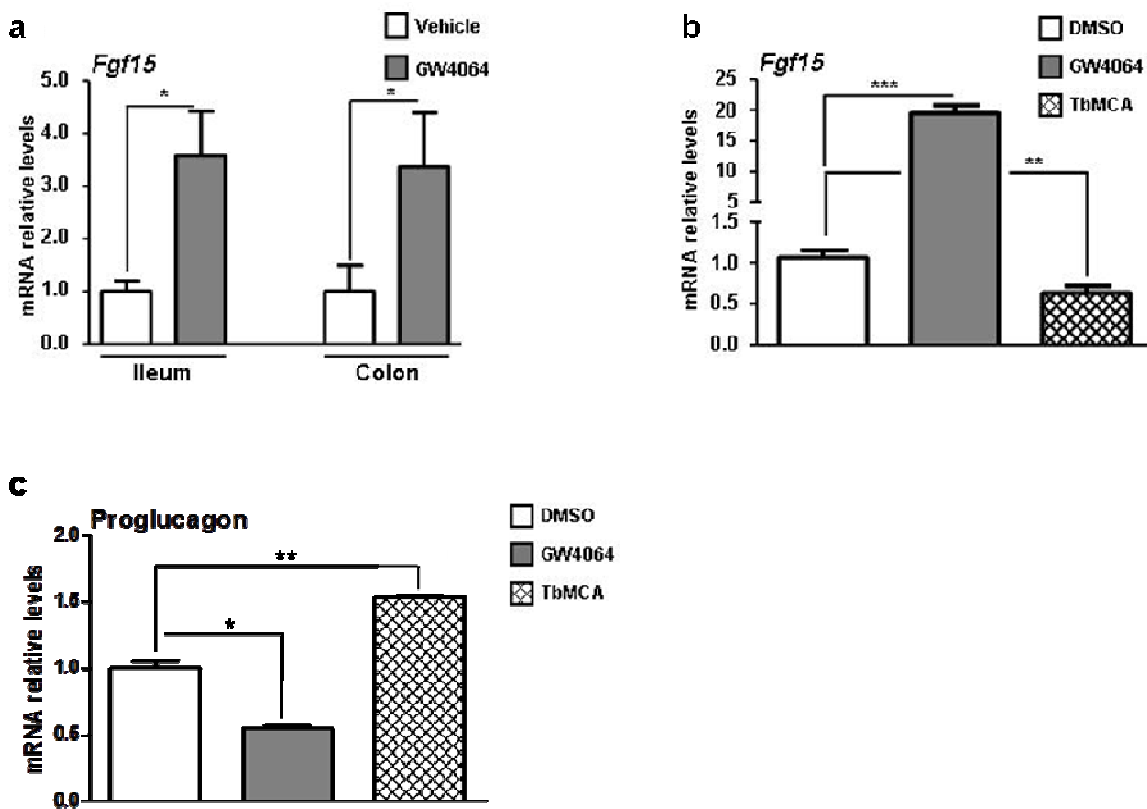


Figure 7. FXR modulates proglucagon mRNA levels in vivo in mice. (a) Proglucagon qPCR on cDNA from ileum and colon of 8-week old mice treated by gavage for 5 days with GW4064 (30 mg per kg, n=6-7 per group). Student *t* test, ** $P \leq 0.01$ & *** $P \leq 0.001$. (b) Proglucagon qPCR on cDNA from ileum of 8 week-old GF or CONV-R mice on a *Fxr*^{+/+} or a *Fxr*^{-/-} background (n=11-12 per group). Oneway ANOVA followed by Tukey Posthoc test, ** $P \leq 0.01$. Data are represented as mean +/- SEM.

Supplementary figure 4



Supplementary figure 4. (a) *Fgf15* qPCR on cDNA from ileum and colon of 8-week old mice treated by gavage for 5 days with GW4064 (30 mpk, n=6-7 per group). *Fgf15* (b) and *Proglucagon* (c) qPCRs on cDNA from

GLUTag cells treated for 24h with DMSO (0.1%), GW4064 ($5 \mu\text{mol L}^{-1}$) or with TbMCA ($100 \mu\text{mol L}^{-1}$). Student *t* test, * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$ & *** $P \leq 0.001$. Data are represented as mean \pm SEM (a) and as mean \pm SD (b,c).

FXR de-activation improves glucose metabolism in *ob/ob* mice

To test the pathophysiological relevance of these results, we treated *ob/ob Fxr+/+* and *ob/ob Fxr-/-* mice during 2 weeks with the BA sequestrant (BAS) colesevelam, a compound which improves glucose metabolism in mice and man ¹⁰. BAS improves glucose metabolism after an OGTT in *ob/ob Fxr+/+* mice, an effect not observed in *ob/ob Fxr-/-* mice (Figs. 8a, 8b and 8c). As expected ¹⁹, BAS administration results in the inhibition of FXR activity in the ileum and colon as reflected by repression of *Fgf15* gene expression (Supplementary Figs 5a and 5b). Moreover, BAS administration increases proglucagon gene expression in the ileum (Fig. 8d) and colon (Supplementary Fig. 5c) only in *ob/ob Fxr+/+* mice, an effect which may contribute to the improved glucose control.

Figure-8 (Staels)

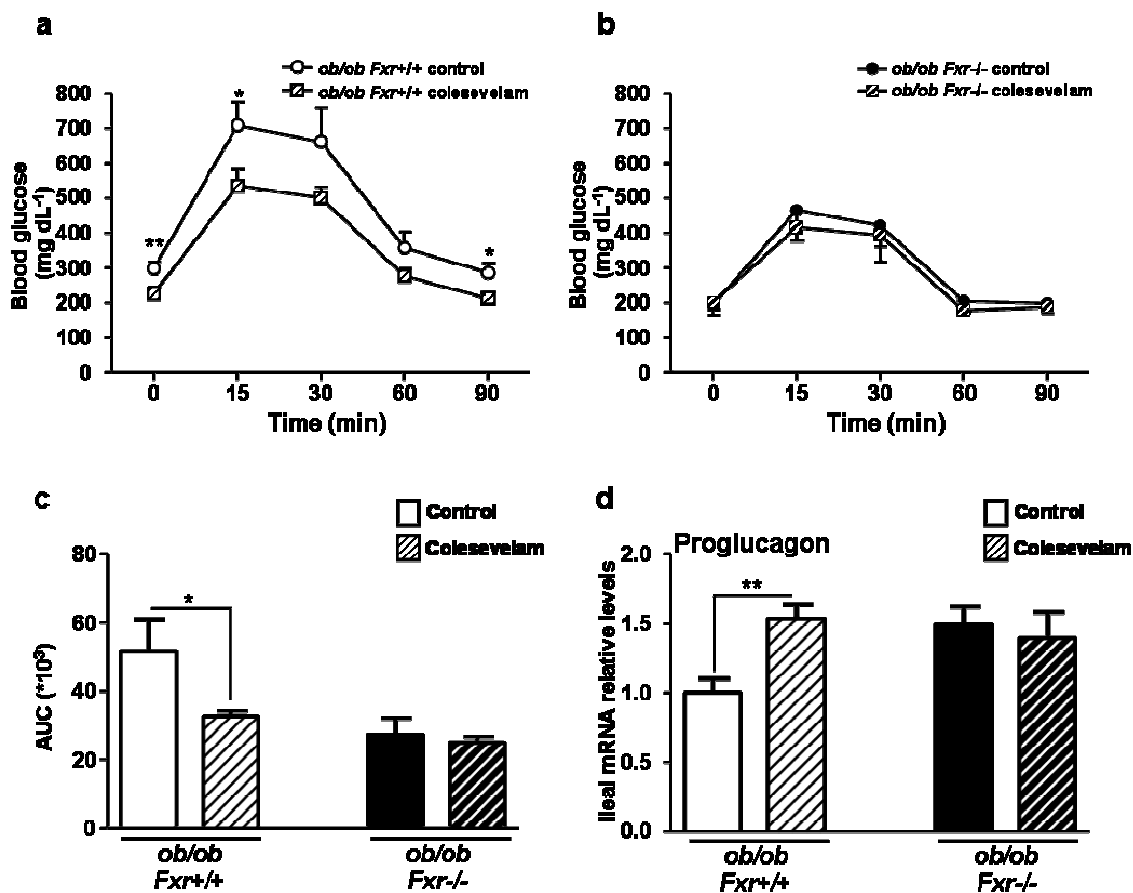
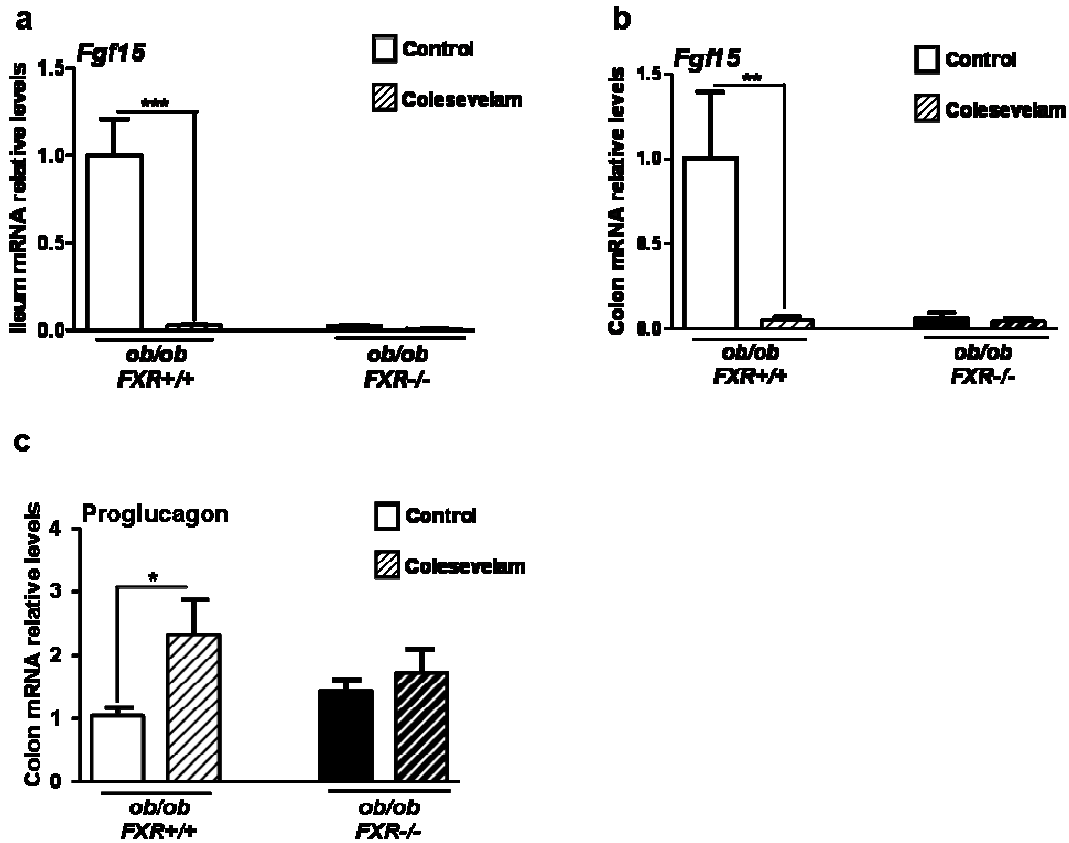


Figure 8. FXR de-activation improves glucose metabolism in ob/ob mice. OGTT after 2 weeks of vehicle or colesevelam treatment in ob/ob *Fxr*^{+/+} (a) and ob/ob *Fxr*^{-/-} mice (b). (c) Corresponding area under the curve. (d) Proglucagon qPCR on cDNA from ileum of these mice. n=5-6 mice by group. Oneway ANOVA followed by Tukey Posthoc test, *P≤0.05, & **P≤0.01. Data are represented as mean +/- SEM.

Supplementary figure 5



Supplementary figure 5. *Fgf15* qPCR on cDNA from ileum (a) or from colon (b) of 8 week-old *Fxr*^{+/+}, *Fxr*^{-/-} male mice on an *ob/ob* background fed for 2 weeks with a diet enriched or not with 2% colesevelam. (c) Proglucagon qPCR on cDNA from colon of 8 week-old *Fxr*^{+/+}, *Fxr*^{-/-} male mice on an *ob/ob* background fed for 2 weeks with a diet enriched or not with 2% colesevelam. OneWay ANOVA followed by Tukey Posthoc test, *P≤.05, **P≤.01 & *P≤.001. Data are represented as mean +/- SEM.**

Figure-9 (Stael)

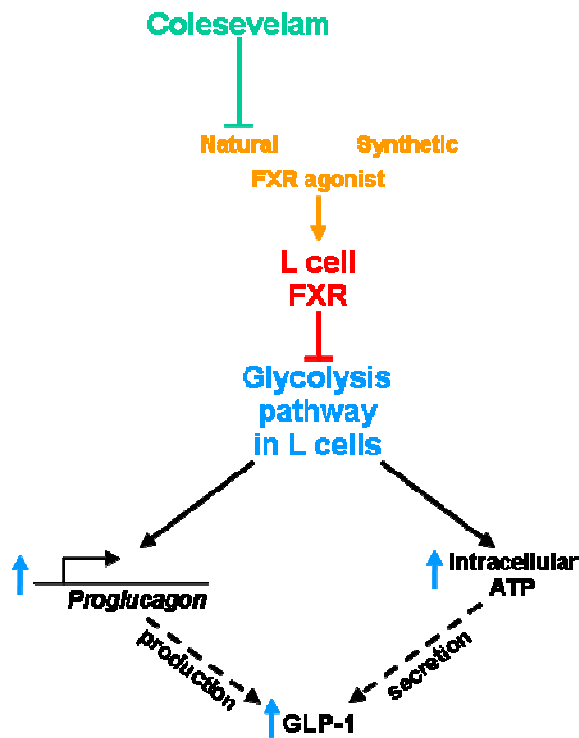


Figure 9. Proposed mechanism by which L-cell FXR decreases GLP-1 production and secretion. Glucose induces through glycolysis pathway proglucagon gene expression in L-cells via ChREBP and subsequently GLP-1 production. Moreover, glycolysis pathway increases intracellular ATP concentrations and induces GLP-1 secretion. FXR activation, by inhibiting glucose metabolism, decreases both GLP-1 production and secretion. Colesevelam, by inhibiting FXR transcriptional activity in L-cells, promotes GLP-1 production and secretion.

Discussion

Using transgenic VENUS mice expressing the reporter gene only in proglucagon positive cells and human biopsies, we show that FXR is not only expressed in the enterocyte, but also expressed in L-cells, where its activity was demonstrated by agonist regulation of 2 bona fide FXR target genes, *Fgf15* and *Shp*. Both *in vitro* and *in vivo*, in mice as well as in human intestines, activated FXR decreases proglucagon mRNA levels. Moreover, we demonstrate in GLUTag cells and FXR-deficient mice that the decrease of proglucagon gene expression and protein levels occurs in a FXR-dependent manner.

ChREBP is expressed in murine L-cells³³ and activated by glucose metabolites. Moreover, glucose induces proglucagon mRNA levels²⁹. Here we show that the glucose-

induced proglucagon gene expression is dependent on glucose metabolism and mediated by ChREBP, identifying a role for ChREBP in enteroendocrine L-cells in the control of proglucagon gene expression. This increase by glucose is inhibited by FXR activation. Since in human hepatocytes, FXR activation releases ChREBP from Carbohydrate Response Elements (ChORE) on the promoters of glycolytic genes thus inhibiting their induction by glucose²⁰, we searched *in silico* for ChOREs in the murine proglucagon gene and identified 3 ChORE in the 15kb flanking region of the proglucagon transcription start site. To which extend FXR interferes negatively with the glycolytic pathway as in human hepatocytes remains to be determined in detail, but these observations are in accordance with the overall decrease in the glycolysis pathway after FXR activation.

Glucose sensing by L-cells and subsequent secretion of GLP-1 involves both ATP-dependent and -independent pathways²⁵. The ATP-dependent pathway, predominant in GLUTag cells, involves glucose metabolism by glycolysis thus increasing intracellular ATP levels, closure of the voltage-dependent K_{ATP} -dependent channel, membrane depolarization, intracellular Ca^{2+} increase and GLP-1 secretion. We show here that FXR activation does not decrease the expression of genes involved in glucose-mediated secretion mechanisms independent of intracellular ATP (i.e. *Sglt1*, *Tas1r2*, *Tas1r3*). Moreover, FXR activated cells display no changes in KCl-induced GLP-1 secretion, but display lower GLP-1 secretion in response to both low and high glucose concentrations. To understand the mechanisms underlying the decrease in ATP-dependent GLP-1 secretion by FXR, we assessed the activity of the glycolysis pathway and mitochondria. FXR activation decreases intracellular ATP levels, independent of a decrease in mitochondrial mass or a defect of mitochondria to respond to glucose as seen in OCR experiments. ECAR measurements after ATP-synthase inhibition with oligomycin showed that GW4064-treated cells have a lower capacity to metabolize glucose which is translated into lower ATP-dependent oxygen consumption. Altogether, these results show that FXR activation decreases the transcription of glycolytic enzymes not only in human hepatocytes, but also in enteroendocrine L cells leading to decreased intracellular ATP levels and ATP-dependent GLP-1 secretion.

An increasing body of evidence shows that the BA pool size and composition control glucose homeostasis through BA receptors. Whereas their action through the transmembrane receptor TGR5 is likely to occur rapidly after food ingestion, activation of the nuclear receptor FXR induces a more delayed response thus leading to a shift between early postprandial positive effect of TGR5 activation and delayed effects through FXR activation. FXR activation in the intestine increases FGF15/19 secretion which, in addition to its role in the regulation of BA synthesis, reduces adiposity, increases brown adipose tissue energy expenditure and improves the metabolic rate in different obese murine models ^{26,27}. In contrast, recent studies in obese mice highlight that intestinal FXR antagonism results in an improved energy homeostasis. Indeed, recently identified as endogenous BA FXR antagonists in GF mice ²⁹, T β MCA and T α MCA inactivate intestinal FXR and protect mice against diet-induced obesity ¹¹. Treatment of GLUTag cells with CDCA, a well-known FXR agonist, decreases proglucagon gene expression, whereas T β MCA increases proglucagon mRNA levels. In agreement with these findings, GF mice express higher intestinal levels of proglucagon than CONV-R mice ²⁸. In addition, we show here that the increase of intestinal proglucagon mRNA upon FXR-deficiency requires the gut microbiota as FXR deficiency in GF mice does not further enhance proglucagon mRNA levels.

BA sequestrants (BAS) complex BA, preventing ileal BA re-absorption and driving BA to the colon thus facilitating their elimination ²⁹. Initially used for their cholesterol lowering effect, BAS treatment has been shown to lower blood glucose in T2D patients ³¹. Among the proposed mechanisms, FXR deactivation increases energy expenditure in obese mice ^{9,14}. Another mechanism may rely on the TGR5-mediated increase in GLP-1 production and secretion. In the colon, which contains the highest density of GLP-1 expressing cells, BAS-bound BA increase proglucagon mRNA levels and meal-induced GLP-1 secretion thus improving glucose metabolism in high-fat fed mice ³⁰. In this study, we demonstrate a role for FXR in the response to colestevlam resulting in an increase of proglucagon mRNA levels in ileum and colon translated to an improved response to oral glucose suggesting that

compounds with TGR5 agonist-FXR antagonist activity may be most optimal to enhance incretin production.

Taken together, these results demonstrate that qualitative changes in BA pool composition by gut microbiota remodelling or by BAS administration improves glucose metabolism through increased GLP-1 production upon FXR de-activation in intestinal L-cells (Fig. 9). Our results further provide a novel molecular mechanism explaining the beneficial effects of BAS on glucose control in T2DM.

Methods

Chemicals and reagents

The DPP-4 inhibitors diprotin A, FFA-free Bovine Serum Albumine (BSA), Chenodeoxycholic acid (CDCA), DMSO and CMC were purchased from Sigma-Aldrich (St Quentin-Fallavier, France). Sitagliptin was purchased from MSD. The synthetic FXR agonist GW4064 was purchased from Tocris (R&D Systems, Lille, France). For *in vitro* or *ex vivo* experiments, CDCA and GW4064 were dissolved in dimethylsulfoxide (DMSO) at 0.1% final. For *in vivo* experiments, GW4064 was dissolved in 1% Carboxymethylcellulose (CMC). Chow diet and high fat diet were purchased from UAR (A04, Villemoison/Orge, France).

Animal models and experimental protocols

8 week-old C57Bl6/J male *Fxr*^{+/+}, *Fxr*^{-/-}, *ob/ob Fxr*^{+/+}, *ob/ob Fxr*^{-/-} littermates (INSERM U1011) and corresponding WT littermate mice (Charles River Laboratories, Wilmington, MA), fed a chow diet, were housed in a temperature-controlled room (22 °C) on a 12-hour light-dark cycle. GLU-VENUS, germ-free (GF) and conventionally-raised (CONV-R) mice were housed as previously described^{18, 15}. Mice (8 mice per group) were gavaged during 5 days with 1% CMC containing or not GW4064 (30 mg per kg). C57Bl6/J male mice invalidated (*Fxr*^{-/-}) or not (*Fxr*^{+/+}) for FXR (5-6 mice by group) were fed under a chow diet. Age-matched C57Bl6/J male mice germ-free (GF) or conventional raised (CONV-R), on a

Fxr^{+/+} and a *Fxr*^{-/-} background (11-12 mice by group) were fed a standard chow diet (Labdiet). 8 week-old C57Bl6/J male *Fxr*^{+/+} and *Fxr*^{-/-} mice on a leptin-deficient (*ob/ob*) background (6-7 mice by group) were fed *ad libitum* during 2 weeks with a standard diet (UAR A04, Villemoison/Orge, France) supplemented or not with 2% of Colesevelam. After a 6h fasting, mice were sacrificed. Ileum (corresponding to the 5 terminal cm of the small intestine) and colon were washed once with PBS, opened longitudinally on ice and the intestinal mucosa was scrapped and snap-frozen in liquid nitrogen. The experiment on GLU-VENUS mice was approved by local ethics committees and conformed to United Kingdom Home Office regulations and the experiment on GF/CONV-R mice was performed with protocols approved by the University of Gothenburg Animal Studies Committee. All the other experimental protocols were approved by the Lille Pasteur Institute Ethical committee and carried out in agreement with European Union (EEC n°7430).

Ex vivo studies

Fresh human jejunum biopsies from normoglycemic subjects were obtained with informed consent as part of the A Biological Atlas of Severe Obesity (ABOS) study (ClinicalTrials.gov; NCT01129297). Mucosa were dissociated from musculosa and cut into small pieces of 1 cm² before treatment for 16h with DMSO or GW4064 (5 $\mu\text{mol L}^{-1}$) in RPMI medium + GlutaMAXTM-1 (Cat.No. 61870-010, Life Technologies) containing glucose (11 mmol L⁻¹), sodium pyruvate (1 mmol L⁻¹) and supplemented with 10% Fetal Bovine Serum (FBS, Life Technologies) and penicillin/streptomycin (10000 U L⁻¹ / 10 mg L⁻¹) in a 37 °C, 5% CO₂ controlled atmosphere. RNA extraction and qPCR analysis were performed as described below.

For immunohistochemical analysis, human jejunal biopsies were O/N fixed with paraformaldehyde 4% (Sigma) before incubation with 20% sucrose during 20h and further inclusion in Jung Tissue Freezing Medium (Jung) and storage at -80 °C before processing. Twelve μm -thick slices were post-fixed in methanol/acetone 50/50 (v/v) during 10min at -20°C. After two washes in Tris/NaCl buffer (TRIZMA- Base (20 mmol L⁻¹, Sigma) / NaCl (150

mmol L⁻¹, VWR), pH 7.6), an antigen retrieval step was performed (520W, 5min; 160W, 10min) in citrate buffer (ThermoScientific). After permeabilization during 10min (Tris/NaCl/0.1% TRITON X100), unspecific protein binding sites were masked by Dako Protein Block (DAKO) during 2h at room temperature. Then, the samples were incubated O/N with mouse anti-human GLP-1 (SC-73508, Santa-Cruz Biotech.) and rabbit anti-human FXR (Ab28676, Abcam) antibodies (1/100) at 4°C. The next day, immunoreactive cells were revealed after incubation with goat anti-mouse IgG Alexa 568 (for GLP-1) and goat anti-rabbit IgG Alexa 488 (for FXR) (dilutions: 1/200, Molecular Probes) and photographs were taken with a confocal microscope (LSM 710 Zeiss). Image analysis was performed using the ImageJ software (version 1.46c; WS Rasband, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>).

In vitro studies

Cell culture and treatment

The mouse enteroendocrine L cell line GLUTag was kindly provided by D.J. Drucker (University of Toronto, Toronto, Canada) and were grown in DMEM + GlutaMAXTM-1 medium (Cat. No. 21885-025, Invitrogen) containing glucose (5.6 mmol L⁻¹), sodium pyruvate (1 mmol L⁻¹) and supplemented with 10% FBS. For treatments, 42h cultured cells were incubated for 24h in DMEM + GlutaMAXTM-1 medium (Cat. No. 21885-025, Invitrogen) with glucose (5.6 mmol L⁻¹), sodium pyruvate (1 mmol L⁻¹) and supplemented with 0.2% BSA containing TbMCA (100 μmol L⁻¹), CDCA (100 μmol L⁻¹) or GW4064 (5 μmol L⁻¹) during 24h unless specified. In some experiments, cells were deprived of glucose by a 12h incubation in glucose-free medium (DMEM GLUTamax, Cat. No. 11966-025), supplemented with 1% glutamine, sodium pyruvate (1 mmol L⁻¹), 0.2% BSA and sodium lactate (10 mmol L⁻¹) prior to FXR activation in either lactate (10 mmol L⁻¹)-, glucose (5.6 mmol L⁻¹)- or 2-deoxyglucose (5.6mmol L⁻¹)-containing medium.

Transient transfection assays

Cells were electroporated using the Neon Transfection System (Life Technologies) with small interference RNA against random (siCtrl), *Fxr* (si*Fxr*) or *Mlxipl* (si*Chrebp*) sequences (smart pool sequences obtained from Dharmacon (Thermoscientific, Illkirch, France)) (see **Table 1**). One hundred forty thousand electroporated cells cm^{-2} seeded into 24-well plates during 42h were treated as described above.

GLP-1 secretion assays, ATP and mitotracker-FACS measurement

After treatment, GLUTag cells were starved for 30min in glucose-free Krebs/phosphate buffer (NaCl (120 mmol L^{-1}), KCl (5 mmol L^{-1}), MgCl_2 (0.25 mmol L^{-1}), CaCl_2 (0.5 mmol L^{-1}) and NaHCO_3 (2.2 mmol L^{-1}), pH 7.2) supplemented with diprotin A ($100 \mu\text{mol L}^{-1}$) and 0.2% BSA. Cells were subsequently stimulated for 1h with Krebs buffer with or without glucose (5.6 mmol L^{-1}) or with a Krebs buffer enriched with KCl (30 mmol L^{-1}). The cell supernatants were then transferred on ice-cold microtubes containing an equal volume of diprotin A ($100 \mu\text{mol L}^{-1}$) in Krebs buffer and centrifuged at 1500 rpm, $4 \text{ }^\circ\text{C}$ for 5min. Cells were lysed in NaOH (0.8 mol L^{-1}) under agitation and total protein content was determined using the BCA Protein Assay Kit (Pierce). Active 7-37 and 7-36 amide GLP-1 were measured with an enzyme-linked immunosorbent assay kit (EGLP-35K; Merck-Millipore) using Mithras Technology (Berthold) and normalized to the total quantity of cellular proteins. ATP measurement (Cell Titer Glow, Promega) on GLUTag cells in response to glucose (5.6 mmol L^{-1}) was performed in the same condition as GLP-1 secretion assays according to manufacturer's protocol and luciferase activity was measured using Viktor apparatus (PerkinElmer). To estimate mitochondrial quantity, 24h DMSO- and GW4064-treated GLUTag cells were washed with PBS, trypsinized and incubated at $37 \text{ }^\circ\text{C}$ for 20min with 100 nmol L^{-1} MitoTracker Green FM (Molecular Probes). Samples were washed 3 times in PBS and subjected to flow cytometric analysis on a FACSCalibur apparatus (Becton Dickinson, San Jose, CA).

Analysis of oxygen consumption rate (OCR) and glycolytic rate (ECAR) in intact cells

Measurements of OCR and ECAR (extracellular acidification rate) in GLUTag cells

were performed using the XF24 analyzer (Seahorse Bioscience). 4×10^4 GLUTag cells per well were seeded in XF24 V7 microplates during 42h before GW4064 treatment for 24h. OCR and ECAR were measured in Seahorse assay buffer containing basic glucose free DMEM medium (pH 7.4). The following compounds and concentrations were added successively: glucose (10 mmol L^{-1}); oligomycin ($1 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$); 2-deoxyglucose (100 mmol L^{-1}); rotenone ($1 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$) and antimycin A ($1 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$).

Western blot analysis

Western blots were generated as previously described²¹ and incubated with proglucagon (SC-80730, Santacruz), FXR (PP-9033A, R&D) or actin (SC-1616, Santacruz) antibodies (1/500). After 1h incubation with horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies (1/3000, Sigma), protein revelation was performed using the enhanced chemiluminescence FEMTO Plus reagents (ECL FEMTO, Thermofischer) by autoradiography (Camera Gbox, SynGene) and band intensity was measured (GeneTools software, SynGene).

Microarray analysis

GLUTag cells were treated or not with GW4064 ($5 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$) for 24h and 4 RNA samples of each treatment condition were hybridized on mouse GEP 8*60K arrays. Scanning clusters and data acquisition were carried out following the manufacturer's instructions (Agilent, One-color microarray Gene Expression Analysis). Data processing and analysis were performed using the Genespring Software. Biological Processes Analysis was performed using Gene Ontology Biological Processes on the Genomatix Software (Genomatix, Deutschland). Data are deposited at EBI under the E-MTAB-2199 number.

RNA extraction and quantification by qPCR

Total RNAs from FACS-isolated cells were isolated using a micro scale RNA isolation kit (RNAeasy, Qiagen, Crawley, UK) and were reverse-transcribed according to standard protocols using a Peltier Thermal Cycler-225 (MJ Research, Waltham, MA, USA). Quantitative RT-PCR was performed with 7900 HT Fast Real-Time PCR system (Applied

Biosystems, Foster City, CA, USA). PCR reactions mix consisted of first-strand cDNA template, primers (TaqMan gene expression assays, Applied Biosystems) and PCR Master mix (Applied Biosystems). *Fxr* gene expression was compared with that of β -actin measured on the same sample, in parallel, on the same plate, giving a cycle threshold difference (Δ CT) for *Fxr* gene minus *β -actin*. Total RNAs from GLUTag cells, mouse and human epithelial cells were extracted using Extract-All Reagent (Eurobio, Courteboeuf, France) according to manufacturer's protocol. After DNase treatment (Fermentas, St Rémy Les Chevreuse, France), total RNA (0.5-1 μ g) was reverse transcribed using High-Capacity Multiscribe Reverse Transcriptase (Applied Biosystems, St Aubin, France) according to the manufacturer's protocol. Quantitative RT-PCR was performed using the Master MIX SYBR Green Brilliant Fast III (Agilent) on a MX4000 apparatus (Stratagene) using specific oligonucleotides (See **Table 2**). The results are presented using the $\Delta\Delta$ Ct method normalized to a reference gene (Cyclophilin for *in vitro* and *ex vivo* experiments and TFIIIB for *in vivo* experiments). Controls were set at 1 and all conditions were expressed comparatively to control.

Data analysis

In vitro experiments were performed in triplicates and repeated at least 3 times. The *in vitro* and *ex vivo* data are presented as mean \pm SD. The *in vivo* data are presented as mean \pm SEM. All statistical analysis were performed using two-tailed Student's *t*-test or One-way ANOVA followed by Tukey's post-hoc test and stated in the figure legends. *P*-values \leq .05 were considered as significant.

References

1. Porez, G., Prawitt, J., Gross, B. & Staels, B. Bile acid receptors as targets for the treatment of dyslipidemia and cardiovascular disease. *J. Lipid Res.* **53**, 1723-1737 (2012).

2. Kawamata, Y. *et al.* A G protein-coupled receptor responsive to bile acids. *J. Biol. Chem.* **278**, 9435-9440 (2003).
3. Thomas, C. *et al.* TGR5-mediated bile acid sensing controls glucose homeostasis. *Cell Metab* **10**, 167-177 (2009).
4. Baggio, L. L. & Drucker, D. J. Biology of incretins: GLP-1 and GIP. *Gastroenterology* **132**, 2131-2157 (2007).
5. Nauck, M., Stöckmann, F., Ebert, R. & Creutzfeldt, W. Reduced incretin effect in type 2 (non-insulin-dependent) diabetes. *Diabetologia* **29**, 46-52 (1986).
6. Knop, F. K. *et al.* Reduced incretin effect in type 2 diabetes: cause or consequence of the diabetic state? *Diabetes* **56**, 1951-1959 (2007).
7. Campbell, R. K., Cobble, M. E., Reid, T. S. & Shomali, M. E. Distinguishing among incretin-based therapies. Safety, tolerability, and nonglycemic effects of incretin-based therapies. *J Fam Pract* **59**, S20-7 (2010).
8. Lefebvre, P., Cariou, B., Lien, F., Kuipers, F. & Staels, B. Role of bile acids and bile acid receptors in metabolic regulation. *Physiol. Rev.* **89**, 147-191 (2009).
9. Matsubara, T., Li, F. & Gonzalez, F. J. FXR signaling in the enterohepatic system. *Mol. Cell. Endocrinol.* **368**, 17-29 (2013).
10. Zhang, Y. *et al.* Activation of the nuclear receptor FXR improves hyperglycemia and hyperlipidemia in diabetic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **103**, 1006-1011 (2006).
11. Duran-Sandoval, D. *et al.* The farnesoid X receptor modulates hepatic carbohydrate metabolism during the fasting-refeeding transition. *J. Biol. Chem.* **280**, 29971-29979 (2005).
12. Caron, S. *et al.* Farnesoid X receptor inhibits the transcriptional activity of carbohydrate response element binding protein in human hepatocytes. *Mol. Cell. Biol.* **33**, 2202-2211 (2013).
13. Watanabe, M. *et al.* Lowering bile acid pool size with a synthetic farnesoid X receptor (FXR) agonist induces obesity and diabetes through reduced energy expenditure. *J. Biol. Chem.* **286**, 26913-26920 (2011).

14. Prawitt, J. *et al.* Farnesoid X receptor deficiency improves glucose homeostasis in mouse models of obesity. *Diabetes* **60**, 1861-1871 (2011).
15. Li, F. *et al.* Microbiome remodelling leads to inhibition of intestinal farnesoid X receptor signalling and decreased obesity. *Nat Commun* **4**, 2384 (2013).
16. Ma, K., Saha, P. K., Chan, L. & Moore, D. D. Farnesoid X receptor is essential for normal glucose homeostasis. *J. Clin. Invest.* **116**, 1102-1109 (2006).
17. Sayin, S. I. *et al.* Gut microbiota regulates bile acid metabolism by reducing the levels of tauro-beta-muricholic acid, a naturally occurring FXR antagonist. *Cell Metab* **17**, 225-235 (2013).
18. Staels, B., Handelsman, Y. & Fonseca, V. Bile acid sequestrants for lipid and glucose control. *Curr. Diab. Rep.* **10**, 70-77 (2010).
19. Meissner, M. *et al.* Bile acid sequestration reduces plasma glucose levels in db/db mice by increasing its metabolic clearance rate. *PLoS ONE* **6**, e24564 (2011).
20. Harach, T. *et al.* TGR5 potentiates GLP-1 secretion in response to anionic exchange resins. *Sci Rep* **2**, 430 (2012).
21. Potthoff, M. J. *et al.* Colesevelam suppresses hepatic glycogenolysis by TGR5-mediated induction of GLP-1 action in DIO mice. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **304**, G371-80 (2013).
22. Stroeve, J. H. M., Brufau, G., Stellaard, F., Gonzalez, F. J., Staels, B. & Kuipers, F. Intestinal FXR-mediated FGF15 production contributes to diurnal control of hepatic bile acid synthesis in mice. *Lab. Invest.* **90**, 1457-1467 (2010).
23. Inagaki, T. *et al.* Regulation of antibacterial defense in the small intestine by the nuclear bile acid receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **103**, 3920-3925 (2006).
24. Habib, A. M. *et al.* Overlap of endocrine hormone expression in the mouse intestine revealed by transcriptional profiling and flow cytometry. *Endocrinology* **153**, 3054-3065 (2012).
25. Tolhurst, G. *et al.* Short-chain fatty acids stimulate glucagon-like peptide-1 secretion via the G-protein-coupled receptor FFAR2. *Diabetes* **61**, 364-371 (2012).

26. Gil-Lozano, M., Mingomataj, E. L., Wu, W. K., Ridout, S. A. & Brubaker, P. L. Circadian secretion of the intestinal hormone, glucagon-like peptide-1, by the rodent L-cell. *Diabetes*, (2014).
27. Gribble, F. M., Williams, L., Simpson, A. K. & Reimann, F. A novel glucose-sensing mechanism contributing to glucagon-like peptide-1 secretion from the GLUTag cell line. *Diabetes* **52**, 1147-1154 (2003).
28. Berrabah, W. *et al.* The glucose sensing O-GlcNacylation pathway regulates the nuclear bile acid receptor FXR. *Hepatology* **59**, (2013).
29. Daoudi, M. *et al.* PPAR β/δ activation induces enteroendocrine L cell GLP-1 production. *Gastroenterology* **140**, 1564-1574 (2011).
30. Filhoulaud, G., Guilmeau, S., Dentin, R., Girard, J. & Postic, C. Novel insights into ChREBP regulation and function. *Trends Endocrinol. Metab.* **24**, 257-268 (2013).
31. Reimann, F. & Gribble, F. M. Glucose-sensing in glucagon-like peptide-1-secreting cells. *Diabetes* **51**, 2757-2763 (2002).
32. Lax, S. *et al.* Expression of the nuclear bile acid receptor/farnesoid X receptor is reduced in human colon carcinoma compared to nonneoplastic mucosa independent from site and may be associated with adverse prognosis. *Int. J. Cancer* **130**, 2232-2239 (2012).
33. Reimann, F., Habib, A. M., Tolhurst, G., Parker, H. E., Rogers, G. J. & Gribble, F. M. Glucose sensing in L-cells: a primary cell study. *Cell Metab* **8**, 532-539 (2008).
34. Tomlinson, E. *et al.* Transgenic mice expressing human fibroblast growth factor-19 display increased metabolic rate and decreased adiposity. *Endocrinology* **143**, 1741-1747 (2002).
35. Fu, L. *et al.* Fibroblast growth factor 19 increases metabolic rate and reverses dietary and leptin-deficient diabetes. *Endocrinology* **145**, 2594-2603 (2004).
36. Wichmann, A. *et al.* Microbial modulation of energy availability in the colon regulates intestinal transit. *Cell Host Microbe* **14**, 582-590 (2013).

37. Beysen, C. *et al.* Effect of bile acid sequestrants on glucose metabolism, hepatic de novo lipogenesis, and cholesterol and bile acid kinetics in type 2 diabetes: a randomised controlled study. *Diabetologia* **55**, 432-442 (2012).

End notes

Acknowledgments: We wish to thank Emilie Dorchies and Emmanuelle Vallez of INSERM U1011 for their technical supports on mouse experiments and Meryem Tardivel and Anne-Sophie Drucbert of BiCeL-IFR114 Facility for access to systems and technical advice. Bart Staels is a member of the Institut Universitaire de France.

Author Contributions: MST, BS & SL conceived and designed the experiments; MST, MD, JP, VT, YS, JK, PM, CAB & SS acquired the data; MST, MD, OB, SS, YS, JK, BS & SL analysed and interpreted the data; MST, BS & SL drafted the manuscript; FG, BS & SL revised the manuscript for important intellectual content; MST, SS, SC, PL, CAB & VT participated to statistical analysis; SL & BS obtained funding; VT, HD, NH, RC, GB, SS, AMT, FR, FG, FB & FP gave technical and material supports; BS & SL supervised the study.

Disclosures: The authors disclose no conflicts of interest.

Transcript Profiling: E-MTAB-2199

Grant support: MST was supported by a grant from the French Ministry for Education and Research. This work was supported by grants from Région Nord-Pas de Calais, INSERM, A.N.R. (FXREn), Université Lille 2, Université Lille Nord de France and European Genomic Institute for Diabetes (EGID, ANR-10-LABX-46). YS was supported by grant from the Lille Métropole Communauté Urbaine (LMCU). FMG, FR and CAB are funded by the Wellcome Trust (WT088357/Z/09/Z, WT084210/Z/07/Z and the WT PhD programme in Metabolic and Cardiovascular Disease).

Abbreviations: BA: bile acids; BAS: bile acid sequestrants; ChREBP: Carbohydrate Response Element Binding Protein; FGF15/19: Fibroblast Growth Factor 15/19; GLP-1:

Glucagon-Like Peptide-1; SHP: Small Heterodimer Partner; OGTT: Oral Glucose Tolerance Test.

Tables

Table 1. Mouse small RNA sequences used in siRNA experiments

Targeted gene	Dharmacon Smartpool sequences (5'→3')
<i>Fxr</i>	GAAACUUCCUGCCGGACAU
	GUGUAAAUCUAAACGGCUA
	GAUUUGUGCCGGACGGGAU
	UGCCAGGAGUGCCGGCUAA
<i>Mxipl</i>	CAUCCGACCUUUUUUGAA
	AAGAGGCGGUUCAUAUUA
	GCAGCUGCGGAUGAAAUA
	UCAUGGAGAUUCAGAUUU

Table 2. qPCR primers sequences

Species	Gene	Forward (5'→ 3')	Reverse (5'→ 3')
Mouse	<i>Fgf15</i>	GAGGACCAAACGAACGAAATT	ACGTCCTTGATGGCAATCG
	<i>Shp</i>	AGGAACCTGCCGTCCTTCTG	CTCAGCCACCTCGAAGGTCA
	proglucagon	GATCATTCCCAGCTTCCCAG	CTGGTAAAGGTCCCTTCAGC
	Exon/Intron proglucagon	CACTTCCACTCACAGATCATTCC	CTTCAGACTCTTACCGGTTCTC
	<i>Fxr</i>	CCTGAGAACCCACAGCATT	GTGTCCATCACTGCACATCC
Human	proglucagon	GTTCCCAAAGAGGGCTTGCT	GTTGCCAGCTGCCTTGACC
	<i>FGF19</i>	GGAGGAAGACTGTGCTTTCGA	GAAGAGCCTAGCCATGTGTAAC

DISCUSSION

DISCUSSION-PERSPECTIVES

La version de l'article présentée ci-dessus est la version soumise il y a quelques mois à Nature Communication. Nous avons depuis mené des expérimentations supplémentaires pour répondre aux questions des reviewers. Je détaillerai point par point les résultats et conclusions supplémentaires que nous pouvons tirer de ces travaux.

1) FXR est exprimé dans les cellules L entéroendocrines

Durant ma thèse, j'ai vérifié par qPCR chez la souris C57Bl6-J les expressions géniques des 2 récepteurs intestinaux aux acides biliaires, TGR5 et FXR. Comme attendu, *Tgr5* suit un gradient d'expression ascendant du duodénum au colon (Figure S1A). Nous vérifions également que l'expression génique de *Fxr* suit un gradient ascendant le long de l'intestin grêle de souris puis diminue légèrement dans le colon (Figure S1B). Grâce à une collaboration avec l'équipe du Pr. Fiona Gribble de Cambridge, nous avons eu accès à des données de qPCR obtenues à partir de souris GLU-VENUS. Ce modèle permet d'isoler les cellules L (L+), cellules ne représentant que 1% des cellules épithéliales intestinales, des autres cellules épithéliales intestinales (L-). Dans ce modèle élégant, on vérifie le gradient d'expression de *Tgr5* et de *Fxr* dans l'intestin (Figure S1A et S1B). Comme attendu, *Tgr5* est plus exprimé dans les cellules L que dans les autres cellules de l'épithélium de l'intestin (Figure S1C). Ce modèle nous permet de montrer que *Fxr* est exprimé au niveau génique dans les cellules L murines et que, de manière surprenante, l'expression relative de *Fxr* est plus importante dans les cellules L que dans les cellules L- (Figure S1D).

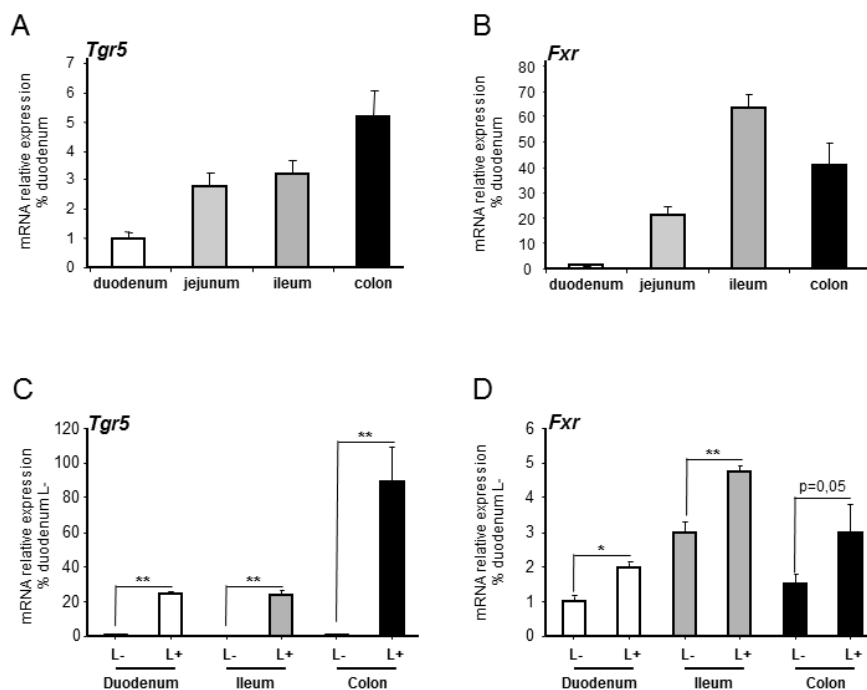


Figure S1 : Profils d'expression de TGR5 et de FXR dans le tissu intestinal et dans la cellule L murine. Expression génique de TGR5 (A) et de FXR (B) le long de l'intestin grêle et le colon de souris C57Bl6-J.

Expression génique de *TGR5* (C) et de *Fxr* (D) dans les cellules L (L+) et non-L (L-) murines isolées du duodénum, de l'iléon et du colon par FACS à partir des souris Glucagon-VENUS.

Grâce à une collaboration avec l'équipe du Pr. François Pattou de Lille (Unité INSERM U859), nous avons obtenu des échantillons d'intestins humains. Un co-immunomarquage FXR-GLP-1 a permis de montrer qu'en plus d'être exprimé dans les entérocytes, FXR était aussi exprimé dans le noyau de cellules positives pour GLP-1 du jéjunum (Figure S2A) et du colon (Figure S2B). En réalisant des fractionnements cellulaires dans les cellules L humaines NCI-H716, nous montrons également que FXR est exprimé dans cette lignée avec un enrichissement dans le noyau.

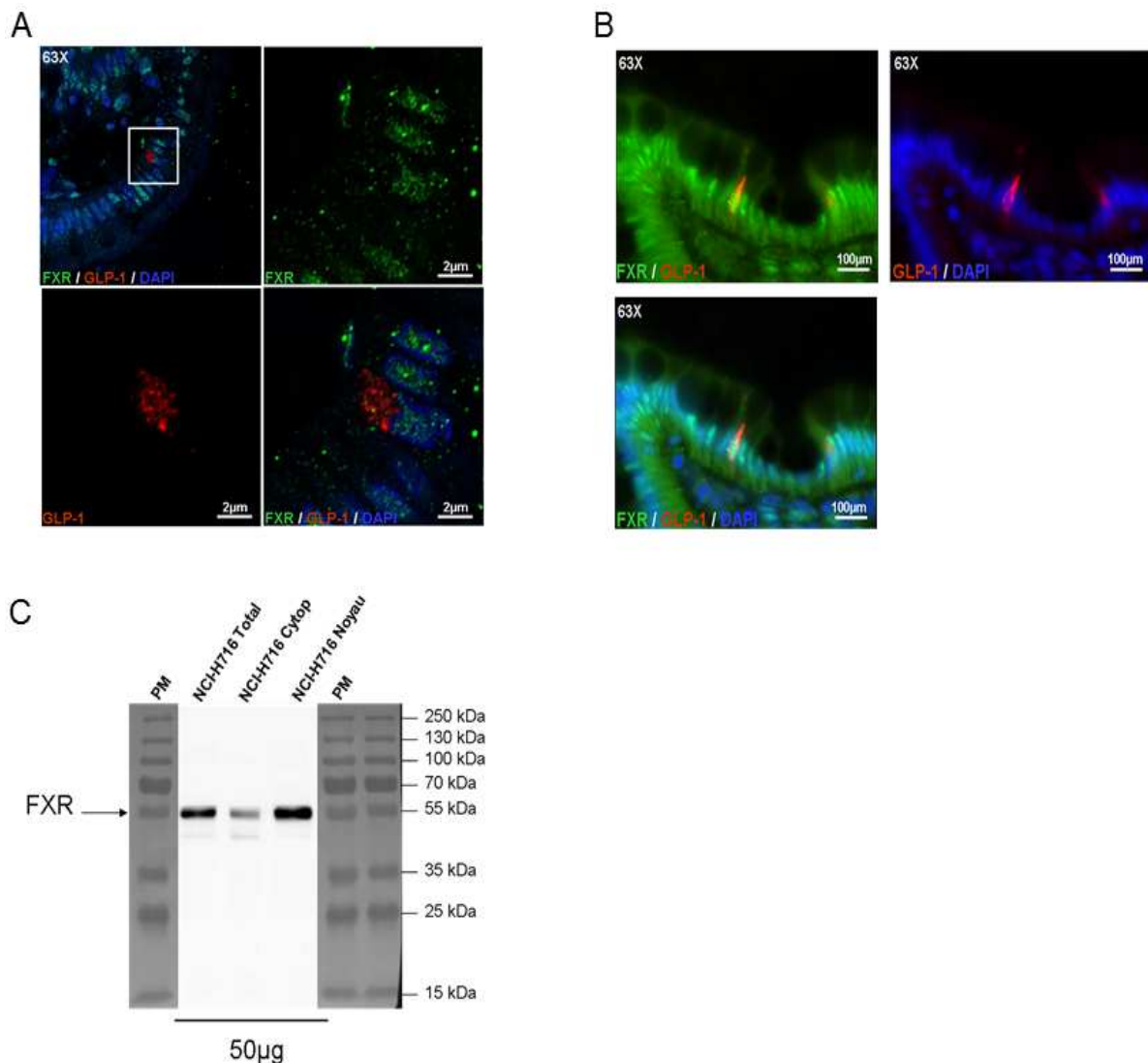


Figure S2 : Chez l'Homme, FXR est exprimé dans les cellules L. Photographies de co-immunomarquages FXR GLP-1 sur des biopsies humaines de jéjunum (A) et de colon (B). C. Photographie de western-blot après marquage par un anticorps anti FXR sur des extraits protéiques totaux, cytoplasmiques et nucléaires de NCI-H716.

2) L'activation de FXR diminue la transcription du gène du proglucagon *in vivo* chez la souris et *ex vivo* chez l'Homme

Pour déterminer le rôle de FXR dans la cellule L, nous avons tout d'abord mis en place une approche de traitement pharmacologique par l'agoniste de FXR GW4064.

Administré par gavage pendant 5 jours chez la souris C57Bl6-J, le GW4064 diminue l'expression du proglucagon dans l'iléon et dans le colon (Figure S3A). Dans la littérature, il a été montré que le GW4064 administré par voie orale à des souris sous HFD exacerbe l'hyperglycémie des souris obèses en diminuant le pool d'acides biliaires agonistes de TGR5. Pour démontrer que l'activation de FXR *per se* par le GW4064 a un impact négatif sur l'expression du proglucagon, nous avons mis en place une collaboration avec l'équipe du Pr. Kristina Schoonjans de Genève, équipe qui possède les souris *Tgr5*-KO. Dans ces souris *Tgr5*^{-/-}, le gavage par le GW4064 (30 mpk) pendant 5 jours diminue toujours l'expression du proglucagon dans l'iléon (Figure S3B). Toutefois, une telle régulation ne s'observe pas dans le colon de ces souris (Figure S3B). Cela peut être dû à la moindre expression de FXR dans le colon de ces souris (Figure S1b et S1D). Nous ne pouvons pas exclure qu'une modification du pool d'acides biliaires après traitement ait un impact sur l'expression du proglucagon *via* TGR5 dans le colon. D'autre part, la diminution du proglucagon s'observe toujours dans des cellules intestinales isolées d'iléon de souris WT traitées *ex vivo* pendant 24 h par le GW4064 (5 µM), expérimentation réalisée en collaboration avec l'équipe du Pr. Gribble (Figure S3C). Ce dernier résultat nous permet de conclure que même s'il modifie le pool d'acides biliaires, le GW4064 diminue l'expression du proglucagon en activant FXR.

Dans des biopsies intestinales humaines de patients obèses et de patients non-obèses normoglycémiques l'activation de FXR par le GW4064 diminue également l'expression du proglucagon (Figure S3D) montrant la relevance chez l'Homme résultats obtenus sur le proglucagon chez la souris après traitement par le GW4064.

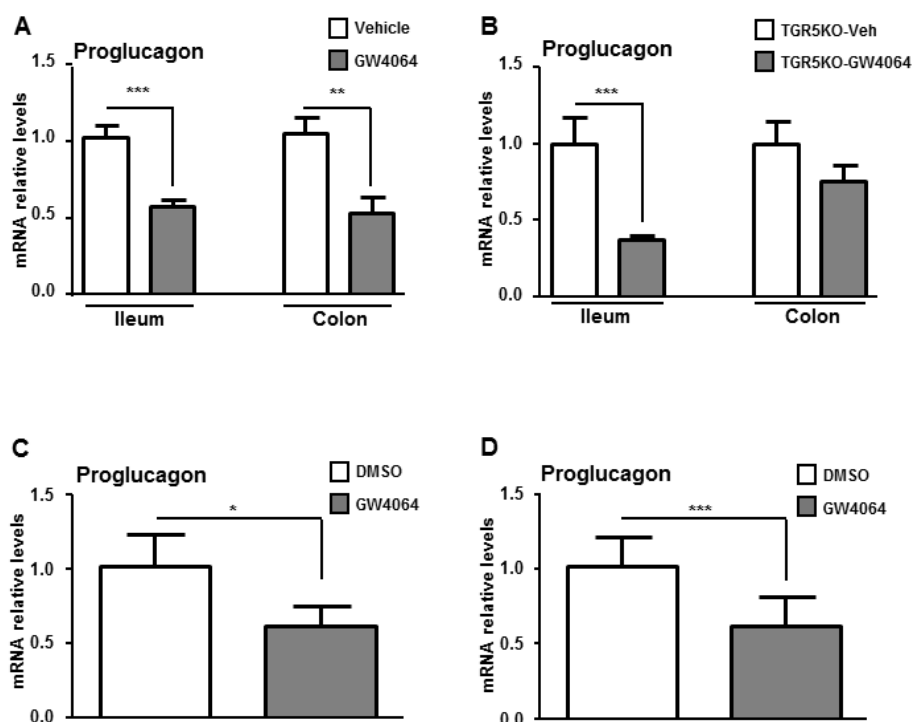


Figure S3 : L'activation de FXR diminue l'expression du proglucagon chez la souris et ex vivo chez l'Homme. Expression génique du proglucagon dans l'iléon et le colon de souris WT (A) et de souris TGR5-KO (B) traitées par gavage pendant 5 jours par le GW4064 (30 mpk). C. Expression génique du proglucagon dans des cellules intestinales épithéliales isolées de souris WT traitées ex vivo pendant 24h par le GW4064 (5µM). D. Expression génique du proglucagon dans des biopsies jéjunales de patients normoglycémiques traitées pendant 24h par le GW4064 (5µM).

2) Dans les GLUTag, l'activation de FXR diminue l'expression du proglucagon induite par le glucose

a) FXR est exprimé et fonctionnel dans les GLUTag

Pour mieux comprendre par quels mécanismes FXR régule le proglucagon, nous avons utilisé des lignées de cellule L. Dans la lignée de cellule L murine GLUTag, nous avons vérifié par qPCR et western-blot l'expression de FXR. FXR est bien exprimé tant au niveau génique qu'au niveau protéique dans les GLUTag (Figure S4A). Nous avons également réussi à identifier par qPCR *Fgf15* et *Shp* (Figures S4B et S4C), 2 gènes cibles de FXR respectivement dans l'entérocytes et l'hépatocytes, comme étant des gènes cibles de FXR dans les GLUTag. De plus, l'inactivation de FXR dans les GLUTag (Figure S4D) diminue l'induction de *Fgf15* par le GW4064 (Figure S4E).

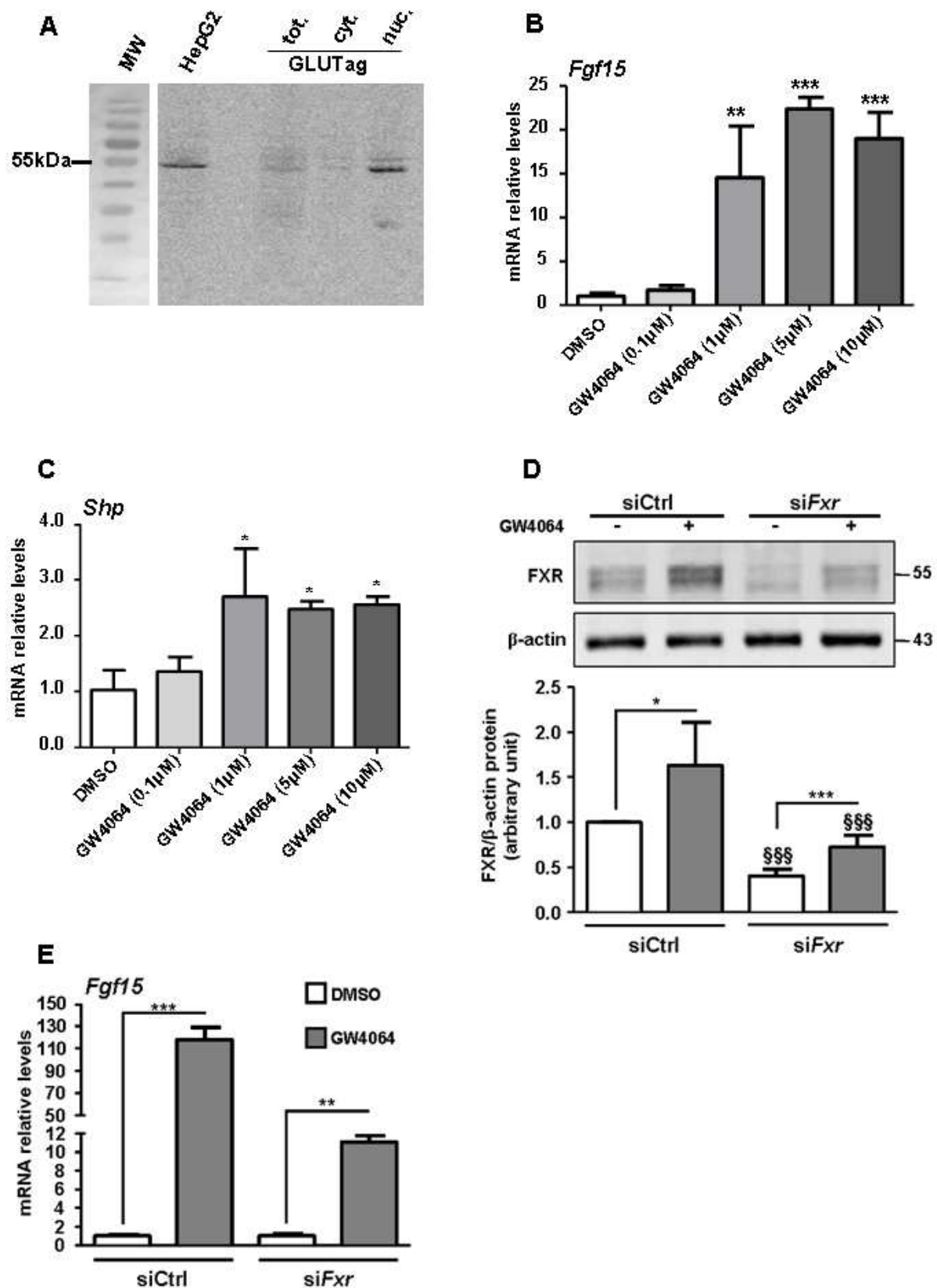


Figure S4 : FXR est exprimé et fonctionnel dans les GLUTag. A. Photographie de western-blot après marquage par un anticorps anti FXR sur des extraits protéiques totaux, cytoplasmiques et nucléaires de GLUTag. Expression génique de *Fgf15* (B) et de *Shp* (C) après incubation des GLUTag avec des doses croissantes de GW4064. Expression protéique de FXR (D) et génique de *Fgf15* (E) dans des GLUTag invalidées pour FXR et traitées pendant 24 h par le GW4064 (5 μM).

Enfin, les données de puce à ADN réalisée dans les GLUTag montrent que les trois premiers gènes à être régulés positivement par l'activation de FXR sont des gènes connus pour être des cibles de FXR dans l'entérocyte (Figure S5). Prises ensemble, ces données démontrent la présence d'un FXR fonctionnel dans les GLUTag.

Top Molecules		
Fold Change up-regulated		
Molecules	Exp. Value	Exp. Chart
FABP6	↑20021.360	
FGF19	↑96.840	
OSTBETA	↑22.265	
RNASE4	↑19.920	
ANG	↑12.208	
Ang2 (includes others)*	↑9.696	
PLB1 (includes EG:151056)	↑6.300	
IL22RA1	↑4.468	
SPHK1*	↑4.098	
AGXT	↑4.053	

Figure S5 : Liste des 10 gènes les plus augmentés après activation de FXR pendant 24h dans les GLUTag

b) L'activation de FXR dans les GLUTag diminue la production du proglucagon

Pour déterminer dans quelle mesure l'activation de FXR régule l'expression du proglucagon, nous avons réalisé des qPCR sur des ADNc et des western-blot sur des extraits protéiques de GLUTag traitées ou non avec des acides biliaires ou des agonistes synthétiques de FXR. Les résultats montrent que l'activation de FXR diminue la transcription (Figures S6A, S6B, S6C et S6D) du proglucagon.

Dans la puce à ADN, on retrouve parmi les 10 gènes les plus augmentés après traitement par le GW4064 3 gènes appartenant à la famille des RNase (Figure S5). Nous nous sommes demandé si la diminution du Proglucagon observée par qPCR était un reflet de la diminution de la transcription du proglucagon. En concevant des amorces Exon-Intron ciblant le pré-ARNm du proglucagon, nous avons pu montrer que la diminution du proglucagon observée était due à une diminution des niveaux du pré-ARNm (Figure S6B) et donc à une diminution de la transcription du gène du proglucagon. La diminution de l'expression génique et protéique du proglucagon après activation de FXR ne se retrouve pas lorsque l'expression de FXR est diminuée par siRNA (Figure S6E et S6F). Ainsi, le traitement par le GW4064 diminue la production du proglucagon par un mécanisme dépendant de FXR. Il est à noter ici que ces activations furent toutes réalisées dans un milieu de stimulation contenant 5.6 mM de glucose.

Dans la lignée de cellule L humaines NCI-H716 traitée par le GW4064, nous n'avons pas réussi à identifier des gènes cibles de FXR. De plus, nous n'avons pas observé de diminution du proglucagon par le GW4064. Ceci est en accord avec une étude montrant que

la régulation du proglucagon est anormale dans cette lignée (Cao Endocrinology 2003). Nous n'avons donc pas continué à utiliser de cette lignée.

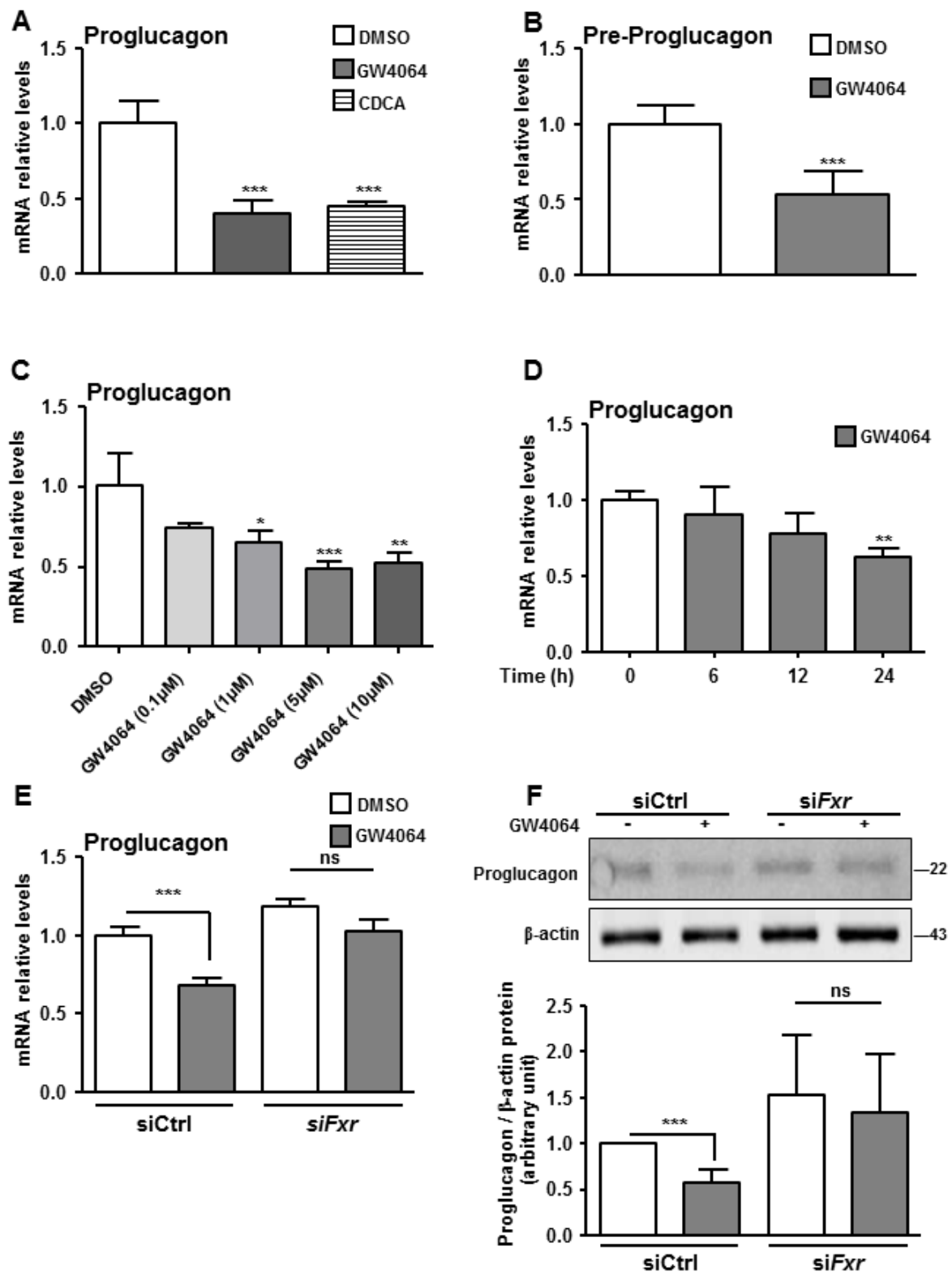


Figure S6 : L'activation de FXR dans les GLUTag diminue la production de proglucagon. Expression du proglucagon (A) et du pré-proglucagon (B) après activation de FXR. C. Expression du proglucagon dans les

GLUTag après incubation avec des doses croissantes de GW4064. D. Expression du proglucagon dans les GLUTag après 6h, 12h et 24h de traitement par le GW4064 (5µM). Expression génique (E) et protéique (F) du proglucagon après activation par le GW4064 (5µM) de GLUTag siCtrl et siFxr.

c) L'activation de FXR dans les GLUTag inhibe la transcription induite par le glucose et dépendante de ChREBP

Grâce à des travaux du laboratoire, nous savons que le glucose augmente l'expression du proglucagon (Daoudi Gastro 2011). De plus, nous savons que, dans l'hépatocyte humain, l'activation de FXR inhibe l'expression dépendante du glucose des enzymes de la glycolyse (Caron-Houde, Samanez Mol Cell Biol 2012). Pour savoir si un tel mécanisme a lieu dans les GLUTag, nous avons déprivé en glucose des GLUTag pendant 12h avant de les incuber avec des agonistes de FXR dans des milieux de stimulations contenant ou non 5.6 mM de glucose. Les résultats montrent que l'action de FXR sur l'expression du proglucagon est dépendante du glucose (Figure S7A). De plus, l'incubation des GLUTag avec des acides biliaires ou avec le GW4064 dans un milieu contenant du 2-désoxyglucose (2-DG), un analogue non hydrolysable du glucose, ne permet pas d'obtenir la diminution de l'expression du proglucagon attendue (Figure S7A). Le métabolisme intracellulaire du glucose est donc nécessaire à l'action des acides biliaires et du GW4064 sur la transcription du proglucagon.

Nous savons que, dans les hépatocytes humains, FXR interférait avec ChREBP, un facteur de transcription sensible aux métabolites du glucose et essentiel dans la régulation des voies glycolytiques et de la lipogénèse (Caron-Houde, Samanez Mol Cell Biol 2012). De plus, nous savons que ChREBP était exprimé dans les cellules L (Habib Endocrinology 2009) même si aucun rôle de ce facteur de transcription dans ces cellules n'était rapporté (Figure S7B). Nous avons vérifié que ChREBP était bien exprimé dans les GLUTag (Insert Figure S7B). Par des expériences de co-immunoprécipitation, nous avons montré que FXR interagissait physiquement avec ChREBP (Figure S7C). Enfin, l'induction par le glucose de l'expression du proglucagon est perdue dans des GLUTag électroporées par un siChREBP (Figure S7D). L'activation de FXR mime l'effet du siChREBP (Figure S7D).

FXR inhibe l'augmentation induite par le glucose et dépendante de ChREBP du proglucagon. De plus, FXR interagit physiquement avec ChREBP sans par ailleurs modifier le contenu nucléaire de ChREBP. Même si les mécanismes moléculaires demandent à être complètement élucidés, nous émettons l'hypothèse que FXR, lorsqu'il est activé, favorise le recrutement de corépresseurs au niveau du promoteur du proglucagon entraînant alors le relargage du ChORE de ChREBP et empêchant le glucose d'induire le proglucagon. Des expériences de ChIP-ChREBP suivies de PCR proglucagon utilisant des amorces conçues

pour détectées un ChORE du proglucagon nous ont pas permis de répondre à cette hypothèse.

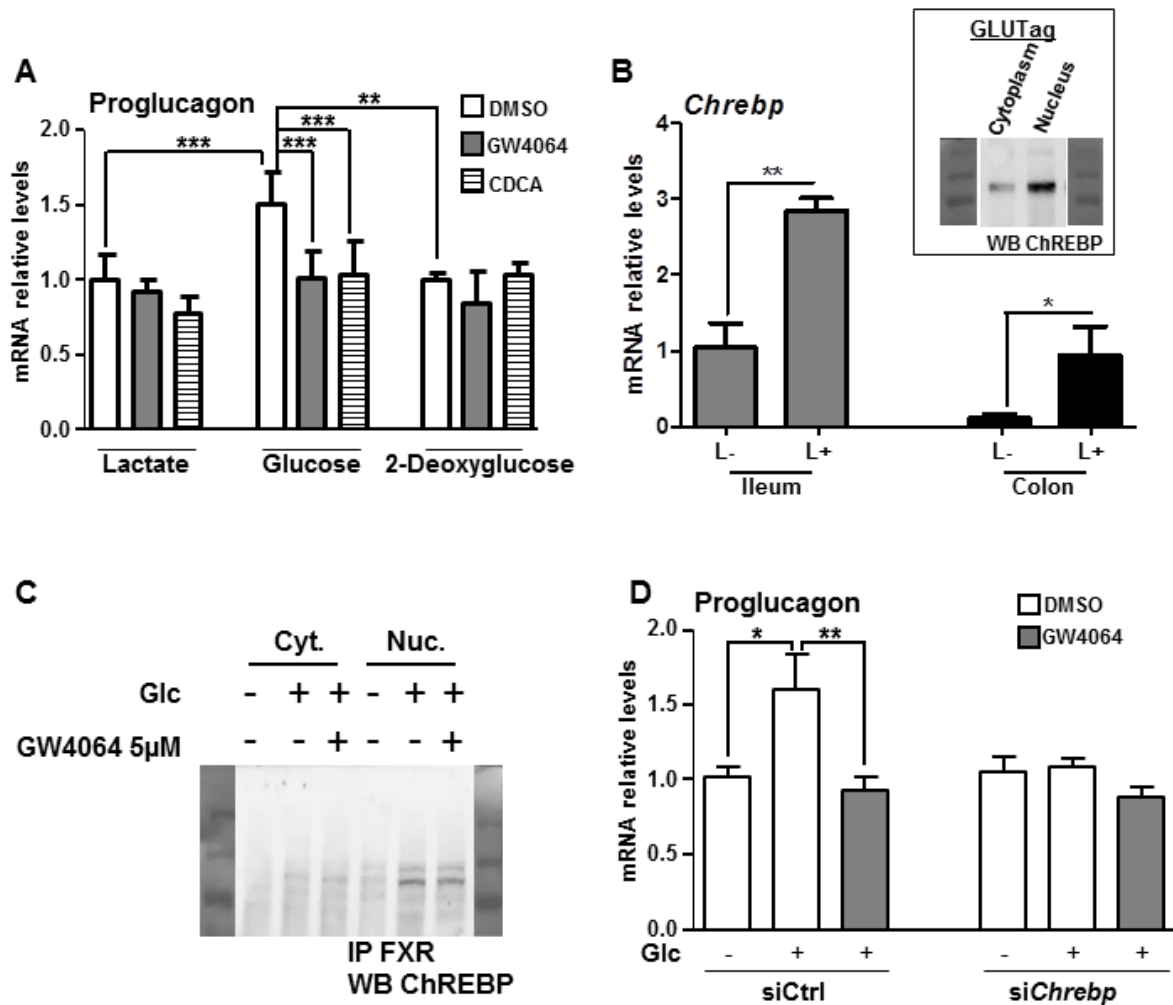


Figure S7 : L'activation de FXR dans les GLUTag inhibe la transcription induite par le glucose et dépendante de ChREBP. **A.** Expression du proglucagon après stimulation des GLUTag par du GW4064 (5µM) ou par du CDCA (100µM) dans des milieux contenant du lactate (10mM), du glucose (5,6mM) ou du 2-deoxyglucose (5,6mM). **B.** Expression génique de ChREBP dans les cellules L (L+) et non-L (L-) murines isolées de l'iléon ou du colon par FACS. Encart supérieur : Photographie d'un western-blot anti-ChREBP sur des extraits protéiques nucléaires et cytoplasmique de GLUTag. **C.** Photographie d'un western-blot anti-ChREBP après immunoprécipitation de FXR sur des extraits protéiques nucléaires et cytoplasmique de GLUTag. **D.** Expression du proglucagon après activation (GW4064 5µM) ou non (DMSO) de FXR dans des milieux contenant du lactate (10 mM) ou du glucose (5,6 mM) sur des GLUTag siCtrl et siChREBP.

3) FXR diminue la sécrétion de GLP-1 en réponse au glucose en diminuant la voie de la glycolyse

Les données de la puce à ADN sur les GLUTag activées pour FXR montrent non seulement que l'expression des gènes du métabolisme des acides biliaires est augmentée

(Figure S5) mais que de la voie de la glycolyse est diminuée, même si la diminution de l'expression individuel des gènes n'est pas significative (Figure S8A).

La relevance de cette diminution sur la fonction glycolytique des GLUTag a été testée grâce au Seahorse. Cet outil permet de suivre en temps réel la fonctionnalité de la voie de la glycolyse en mesurant l'acidification du milieu (ECAR) résultant de la production de lactate à partir du pyruvate. Sur des GLUTag traitées ou non par le GW4064, nous montrons que l'activation de FXR diminue la capacité glycolytique maximale des cellules. En effet, alors que l'ajout de glucose augmente l'ECAR de manière plus importante dans les cellules prétraitées par le GW4064 que dans les cellules contrôles, l'ajout d'oligomycine, agent chimique empêchant l'utilisation du pyruvate par la mitochondrie permettant alors de suivre la capacité glycolytique maximale, montre que la glycolyse anaérobie est amoindrie dans les cellules L où FXR est activé (Figure S8B). La mesure de la consommation d'oxygène (OCR) en parallèle des mesures d'acidification montrent que l'OCR basale est moindre dans les cellules où FXR est activé (Figure S8C). On a exclu une dysfonction mitochondriale après traitement GW4064 car, au niveau de l'OCR, les cellules DMSO et GW4064 répondent de la même manière aux drogues (Figure S8C). De plus, des mesures de fonctionnalité mitochondriale effectuées grâce au Mitotracker Green ne montrent aucune différence entre les cellules DMSO et les cellules GW4064 (Figure S8D).

Nous avons donc une diminution de la voie de la glycolyse anaérobie sans modification de la fonction mitochondriale. Nous observons également des concentrations intracellulaires d'ATP moindre dans les cellules traitées par le GW4064 (Figure S8E). J'émetts ici l'hypothèse que la diminution des enzymes de la voie de la glycolyse diminue la concentration intracellulaire de pyruvate conduisant à moins de substrat mitochondrial pour la production d'ATP. Cela expliquerait également pourquoi on a une OCR moindre dès le début de l'expérimentation sur le Seahorse. Des mesures des concentrations du pyruvate intracellulaire par kit ELISA ainsi que des analyses métabolomiques par spectrométrie de masse nous auraient permis de répondre à cette hypothèse.

Enfin, dans les GLUTag, l'activation de FXR diminue la sécrétion de GLP-1 dans des conditions basales et en réponse au glucose (5.6 mM) (Figure S8F). Toutefois, la sécrétion de GLP-1 en réponse au KCl, un dépolarisant membranaire, ne montre aucune différence entre les cellules DMSO et les cellules GW4064 (Figure S8F). Cette observation nous permet d'affirmer que, dans les GLUTag, l'activation de FXR diminue uniquement la part ATP-dépendante de la sécrétion de GLP-1 en réponse au glucose.

Dans les modèles murins de sécrétion de GLP-1, cette part ATP-dépendante de la réponse au glucose de la cellule L est controversée. Alors que dans les IEC la sécrétion de GLP-1 en réponse au glucose est SGT1-dépendante et surtout ATP-indépendante, dans les intestins perfusés de rat, la sécrétion de GLP-1 en réponse au glucose est SGLT1- et ATP-

dépendante. Or dans les GLUTag, il semble que FXR ne diminue que la part ATP-dépendante de la sécrétion de GLP-1 en réponse au glucose (Figure S8F). Nous avons testé la part relative de la sécrétion ATP-dépendante de GLP-1 en réponse au glucose en utilisant la phlorétine, un inhibiteur de GLUTs, dans notre modèle de sécrétion de GLP-1 *ex vivo*. Pour ne pas trop dégrader les biopsies, nous avons décidé de traiter *in vivo* les souris par le GW4064 puis de stimuler la sécrétion de GLP-1 *ex vivo* sur les biopsies. Contrairement aux GLUTag, la sécrétion de GLP-1 dans des conditions basales n'est pas altérée (Figure S8G). Cependant, nous retrouvons une inhibition de la réponse au glucose dans les biopsies intestinales provenant des souris GW4064 (Figure S8G), montrant que cette observation faite sur les GLUTag se traduit également chez la souris. De manière surprenante, la phlorétine inhibe totalement la sécrétion de GLP-1 en réponse au glucose (Figure S8G). Les biopsies des souris GW4064 répondent de la même manière à la phlorétine que les souris CMC (Figure 8G).

L'ensemble de ces résultats montrent que FXR est un régulateur négatif de la réponse au glucose de la cellule L à la fois au niveau de la transcription du proglucagon mais également au niveau de la sécrétion de GLP-1 *in vitro* dans les GLUTag et *ex vivo* dans des biopsies intestinales de souris.

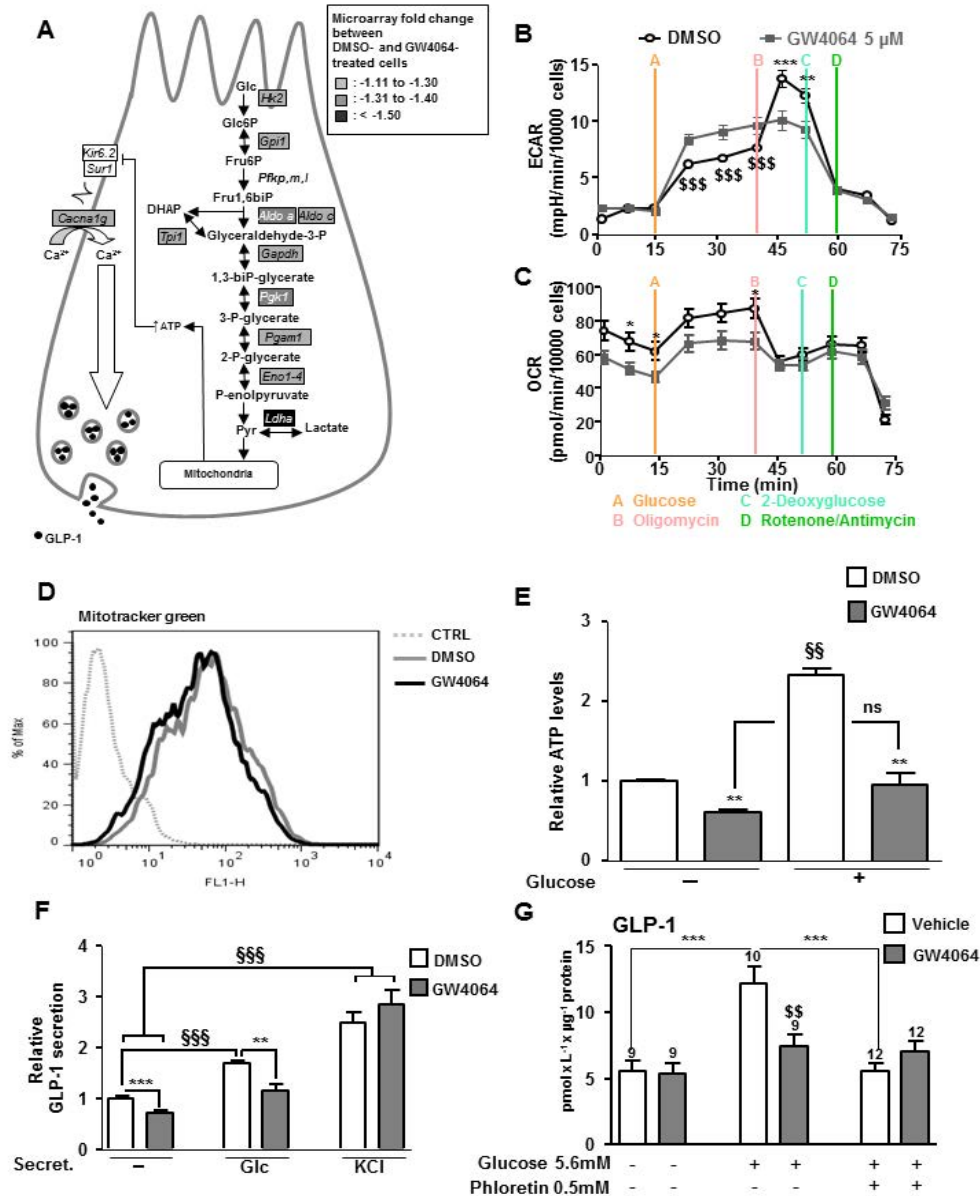


Figure S8 : L'activation de FXR diminue la sécrétion de GLP-1 en diminuant la voie de la glycolyse. A. Expression des gènes de la glycolyse par microarray. P de la voie de la glycolyse : $P=4.33 \times 10^{-6}$. **B.** Niveaux d'acidification extracellulaire (ECAR, **B**) et de consommation d'oxygène (OCR, **C**) après injection successive de glucose (10 mM), d'oligomycine (1 μ M), de 2-déoxyglucose (100 mM) et de roténone (1 μ M) / antimycine A (1 μ M) sur des GLUTag incubées pendant 24h avec le GW4064 (5 μ M). **D.** Mesure de la fluorescence de la sonde Mitotracker Green dans des GLUTag incubées avec du DMSO ou du GW4064. **E.** Mesure relative de la concentration intracellulaire d'ATP dans les GLUTag incubées avec du DMSO ou du GW4064. **F.** Mesure des concentrations de GLP-1 basales et en réponse au glucose (5,6 mM) et au KCl (30 mM) dans les surnageants de GLUTag incubées pendant 24h avec du DMSO ou du GW4064 (5 μ M). **G.** Mesure des concentrations de GLP-1 basales, en réponse au glucose 5,6 mM ou en réponse au glucose (5,6 mM) plus phlorétine (0,5 mM) sur les surnageants de biopsies iléales de souris traitées pendant 5 jours avec du CMC ou du GW4064 (30 mpk).

4) L'inactivation de FXR dans des souris sous régime normal augmente la production et la sécrétion de GLP-1

Nous avons vu que l'activation de FXR pendant 5 jours par le GW4064 administré par voie orale à des souris diminuait l'expression intestinale du proglucagon (Figure S3). Nous avons alors étudié, par une approche d'inactivation génique, l'effet du KO FXR chez la souris nourrie par un régime normal. Les souris *Fxr*^{-/-} présentent une augmentation du proglucagon dans l'iléon et le colon (Figure S9A) mais également une sécrétion de GLP-1 en réponse au glucose augmentée (Figure S9B). Lors d'une autre expérimentation, nous avons gavé les souris avec un iDPP4, la sitagliptine, avant d'administrer par bolus aux souris du glucose (2g/kg). Les souris *Fxr*^{-/-} présentent une meilleure disparition du glucose sanguin que les souris *Fxr*^{+/+} à t = 15 minutes après le bolus (Figure S9C).

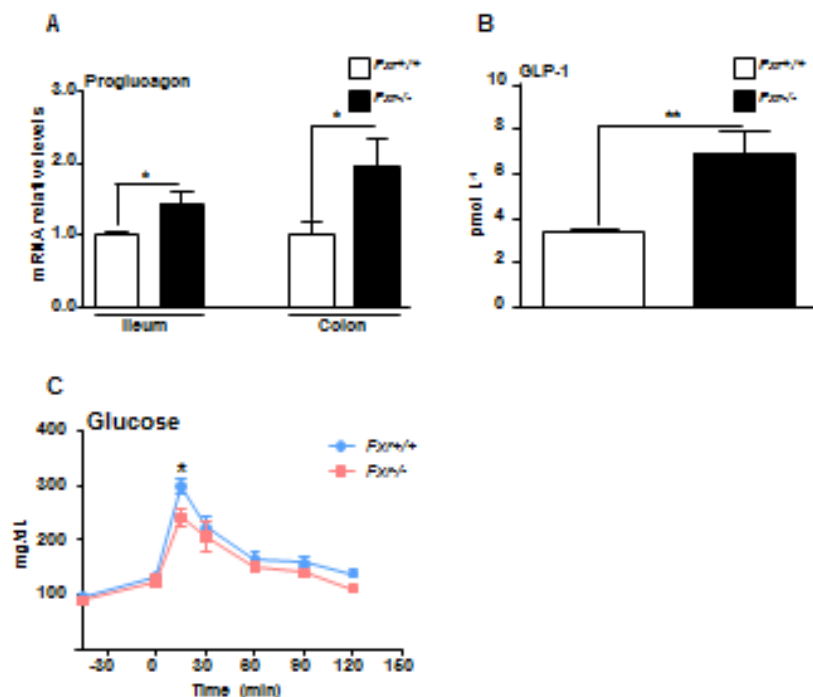


Figure S9 : L'inactivation de FXR augmente la production et la sécrétion de GLP-1 en réponse au glucose et accélère la disparition sanguine du glucose. A. Expression du proglucagon dans l'iléon et le colon de souris *Fxr*^{+/+} et de souris *Fxr*^{-/-}. **B.** Sécrétion de GLP-1 en réponse au glucose *in vivo* dans des souris *Fxr*^{+/+} et *Fxr*^{-/-}. **C.** Glycémie après un bolus de glucose (2g/kg) plus sitagliptine dans des souris *Fxr*^{+/+} et *Fxr*^{-/-}.

5) Dans des souris sous un régime chow, l'inactivation de FXR n'augmente le proglucagon que chez des souris présentant une flore intestinale. De plus, l'inactivation de FXR modifie le microbiote intestinal.

Par la littérature nous savions que le microbiote intestinal diminuait l'expression du proglucagon et de GLP-1 (Wichmann *et al.* 2013) et qu'il modulait également l'activité de FXR en générant plus d'agonistes de FXR (Sayin *et al.* 2013). Nous nous sommes alors demandés si une partie de la diminution d'expression du proglucagon induite par la flore était due à une augmentation de l'activité de FXR.

Grâce à une collaboration avec l'équipe du Pr. Fredrik Bäckhed de Göteborg, nous avons pu mesurer l'expression du proglucagon dans l'iléon de souris GF (*Fxr*^{+/+} et *Fxr*^{-/-}) et CONV-R (*Fxr*^{+/+} *Fxr*^{-/-}). Les résultats montrent que l'expression du proglucagon tend à diminuer entre les souris GF *Fxr*^{+/+} et CONV-R *Fxr*^{+/+} (Figure S10A). Toutefois, cette diminution n'atteint pas le seuil de significativité. Comme précédemment observé dans les souris de notre laboratoire, l'inactivation de FXR chez les souris présentant un microbiote intestinal augmente l'expression du proglucagon. Cette augmentation atteint des niveaux similaires à ceux observés chez les souris GF *Fxr*^{+/+}. L'inactivation de FXR chez les souris dépourvues de bactéries ne modifie pas l'expression du proglucagon (Figure S10A).

De plus, les souris *Fxr*^{-/-} présentent un microbiote intestinal différent des souris *Fxr*^{+/+} (Figure S10B) par une augmentation des bactéries appartenant au phylum *Firmicutes* (Figure S10C) et une diminution des bactéries du phylum *Bacteroidetes* (Figure S10D). Les souris *Fxr*^{-/-} présentent une sécrétion de GLP-1 en réponse au glucose plus importante que les souris *Fxr*^{+/+}. Toutefois, sans dosages des espèces du pool d'acides biliaires produits par les bactéries intestinales ou sans dosages des acides gras à chaînes courtes, il est difficile de conclure dans quelle mesure l'augmentation des bactéries du phylum *Firmicutes* peut expliquer la hausse de la sécrétion de GLP-1 en réponse au glucose ou de l'expression du proglucagon.

Comme cité précédemment, les souris GF présentent plus d'acides biliaires antagonistes de FXR dont le T β MCA. L'incubation des GLUTag pendant 24h avec 100 μ M de T β MCA diminue l'expression de *Fgf15* et augmente l'expression du proglucagon. Ces données suggèrent un rôle du microbiote intestinal sur la production de GLP-1 *via* la génération d'acides biliaires antagonistes de FXR. De plus amples études sont nécessaires pour répondre à cette question.

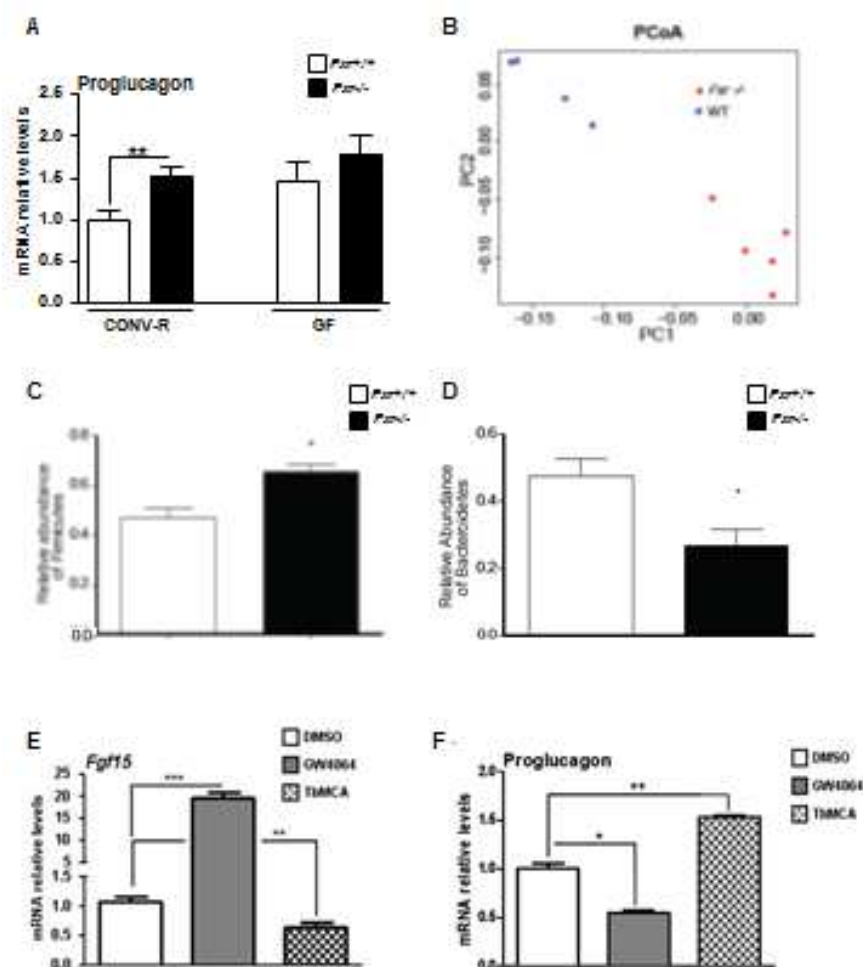


Figure S10 : L'inactivation de FXR modifie le microbiote intestinal. **A.** Expression du proglucagon dans l'iléon de souris GF et CONV-R dans un fond *Fxr*^{+/+} et *Fxr*^{-/-}. **B.** Analyse des composantes principales sur des souris *Fxr*^{+/+} et *Fxr*^{-/-}. Abondance relative des Firmicutes (**C**) et des Bacteroidetes (**D**) chez les souris *Fxr*^{+/+} et *Fxr*^{-/-}. Expression de *Fgf15* (**E**) et du proglucagon (**F**) dans les GLUTag après traitement par le DMSO, le GW4064 (5 μ M) et le T β MCA (100 μ M).

6) Dans différents modèles d'obésité, l'inactivation de FXR (*Fxr*^{-/-}) et l'inactivation de FXR dans l'intestin par approche pharmacologique améliorent la glycémie par la voie GLP-1

a) Les résines séquestrantes des acides biliaires améliorent la glycémie de souris obèses par un mécanisme impliquant la voie de GLP-1 et dépendant de FXR

Dans un contexte physiopathologique d'obésité, l'inactivation de FXR dans l'intestin améliore le profil glycémique des souris (LI *et al.* 2013). Un autre moyen d'inactiver FXR dans l'intestin consiste à administrer des résines séquestrantes des acides biliaires. Alors que l'inactivation de FXR dans des souris *ob/ob* améliore la glycémie après une IPGTT, le traitement par le colesevelam ne diminue que sensiblement la glycémie des souris *Fxr*^{+/+} (Prawitt *et al.* 2011). Toutefois, le profil glycémique après un test oral de tolérance au

glucose des souris *Fxr+/+* traitées avec la résine séquestrante des acides biliaires Colesevelam est significativement diminué (Figure S11A et S11C), reflétant un rôle de l'intestin sur l'amélioration de la glycémie après Colesevelam. Le traitement des souris *Fxr-/-* n'a pas d'effet supplémentaire à celui de l'inactivation (Figure S11B et S11C). Nous nous sommes demandés dans quelle mesure l'amélioration de la glycémie après administration des résines était le reflet d'une augmentation de la production du GLP-1 due à une inactivation intestinale de FXR. Le Colesevelam augmente l'expression génique du proglucagon à un niveau similaire à celui de l'inactivation de FXR (Figure S11D). Le Colesevelam ne'a pas d'effet sur l'expression génique du proglucagon dans les souris *Fxr-/-* (Figure S11D). Ces données montrent que le Colesevelam exerce ses effets bénéfiques sur la glycémie par une augmentation intestinale de la production de GLP-1 dépendante de FXR. Toutefois, on ne peut exclure un effet des résines sur la production de GLP-1 par TGR5 comme le montrent les études de Potthoff *et al.* et de Harach *et al.*

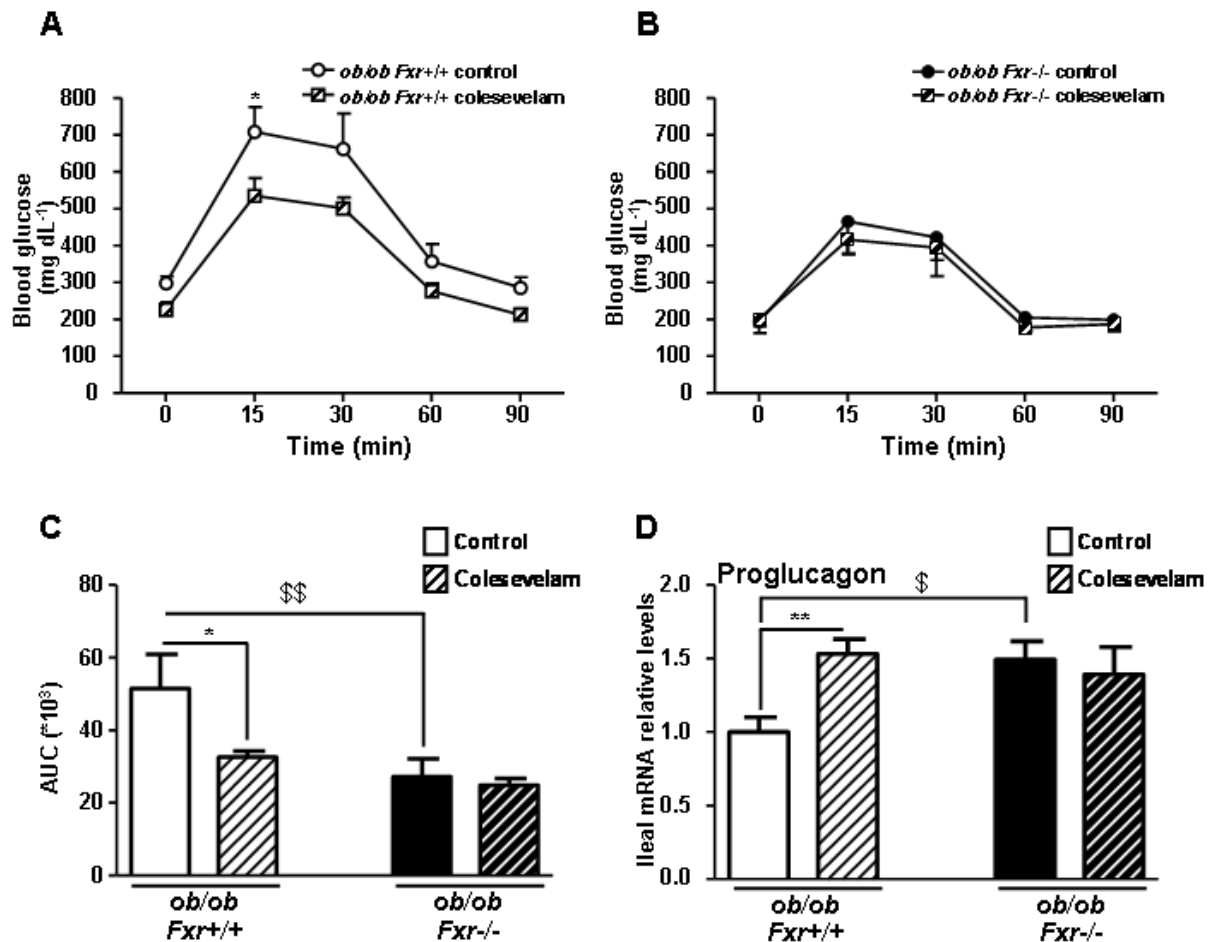


Figure S11 : L'inactivation de FXR dans l'intestin augmente l'expression du proglucagon et améliore la glycémie des souris *ob/ob*. Profil glycémique après un OGTT chez des souris *ob/ob Fxr+/+* (A) et *Fxr-/-* (B) après traitement par le colesevelam. C. Aire sous la courbe des différents profils glycémiques. D. Expression du proglucagon dans l'iléon de souris *ob/ob Fxr+/+* et *ob/ob Fxr-/-* traitées par le colesevelam.

b) L'effet bénéfique sur la glycémie de l'inactivation de FXR chez les souris HFD est perdu lorsque la signalisation du GLP-1R est bloquée

Ces données montrent dans un contexte physiopathologique d'obésité induite génétiquement que les résines séquestrantes des acides biliaires, utilisées aux Etats-Unis comme antidiabétique, pourraient exercer leurs effets sur la glycémie au moins en partie *via* l'inactivation de FXR dans la cellule L. Cette inactivation se traduit par des niveaux plus élevés du proglucagon. Toutefois, cela ne prouve pas de façon indubitable l'implication de la voie FXR/GLP-1 dans l'amélioration de la glycémie. Pour tester la relevance de cette voie *in vivo* dans un contexte physiopathologique, nous avons induit une obésité par un régime riche en graisses chez des souris *Fxr+/+* et *Fxr-/-*. Après 6 semaines, alors que les souris *Fxr+/+* gagnent plus de 30% de leur masse corporelle initiale, les souris *Fxr-/-* ne gagnent que 11% de leur masse corporelle initiale (Figure S12A). La glycémie à jeun des souris *Fxr+/+* et des souris *Fxr-/-* est légèrement détériorée (Figure S12B). On est donc, après 6 semaines de régime, au début de l'installation d'un profil hyperglycémique (glycémie comprise entre 110 et 120 mg/dL). Toutefois, les souris *Fxr-/-* présentent une légère amélioration de la glycémie à jeun (Figure S12B). Pour déterminer si la voie du GLP-1R intervenait dans l'amélioration de la glycémie des souris *Fxr-/-* après un challenge de glucose, nous avons traité les souris *Fxr+/+* et *Fxr-/-* avec du NaCl et de l'Exendine-9 (0.5 mpk) 45 minutes avant un OGTT. Comme attendu, l'inactivation de FXR améliore la glycémie des souris (Figure S12CD et S12D) et les souris WT traitées par l'exendine-9 sont plus hyperglycémiques que les souris WT traitées par le NaCl (Figure S12C). L'administration d'exendine-9 aux souris *Fxr-/-* élève la glycémie des souris au même niveau que celui des souris *Fxr+/+* NaCl (Figure 12D et 12E) montrant que l'amélioration de la glycémie après invalidation de FXR passe en partie par la voie du GLP-1.

Pris dans leur ensemble, ces données montrent que l'inactivation intestinale de FXR est bénéfique sur la glycémie des souris obèses diabétiques en partie *via* la voie GLP-1.

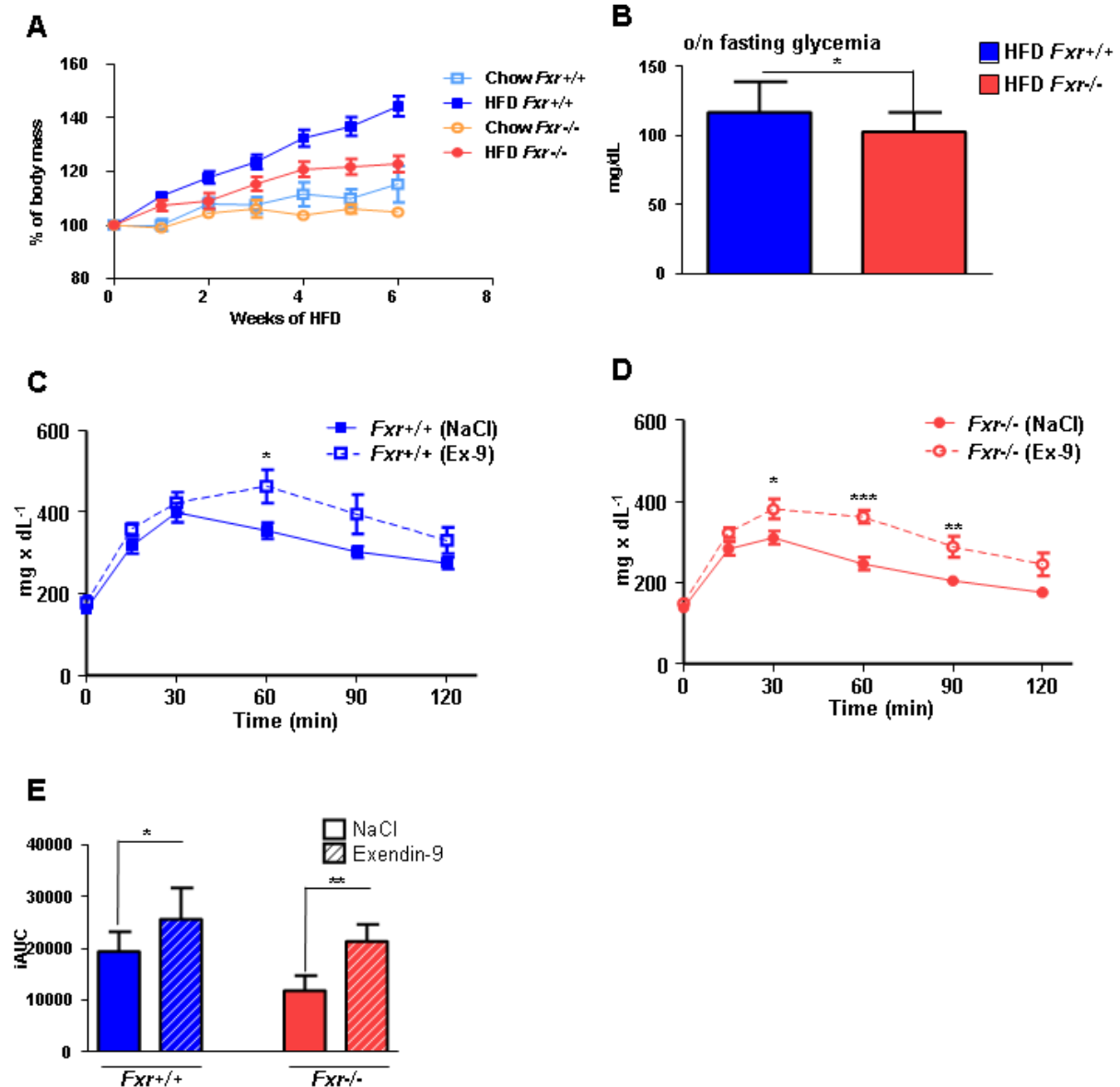


Figure S12 : L'inactivation de FXR améliore la glycémie via la voie du GLP-1R. **A.** Pourcentage du gain de masse corporelle par rapport à la masse avant régime. **B.** Glycémie à jeun des souris *Fxr*^{+/+} et *Fxr*^{-/-} sous HFD. Profil glycémique après un OGTT des souris *Fxr*^{+/+} (**C**) et *Fxr*^{-/-} (**D**) traitées (Ex-9) oui non (NaCl) avec 0.5mpk d'Exendine-9. **E.** Aire sous la courbe intégrée des différents profils glycémiques.

L'ensemble de ce travail de thèse montre pour la première fois que le récepteur nucléaire aux acides biliaires FXR est un régulateur négatif de la production et de la sécrétion de GLP-1 à la fois dans des contextes physiologiques mais aussi dans des contextes d'obésité et de diabète de type 2. Nous identifions également un nouveau mécanisme par lequel les résines séquestrantes des acides biliaires exercent leurs effets bénéfiques sur la glycémie (Figure S13).

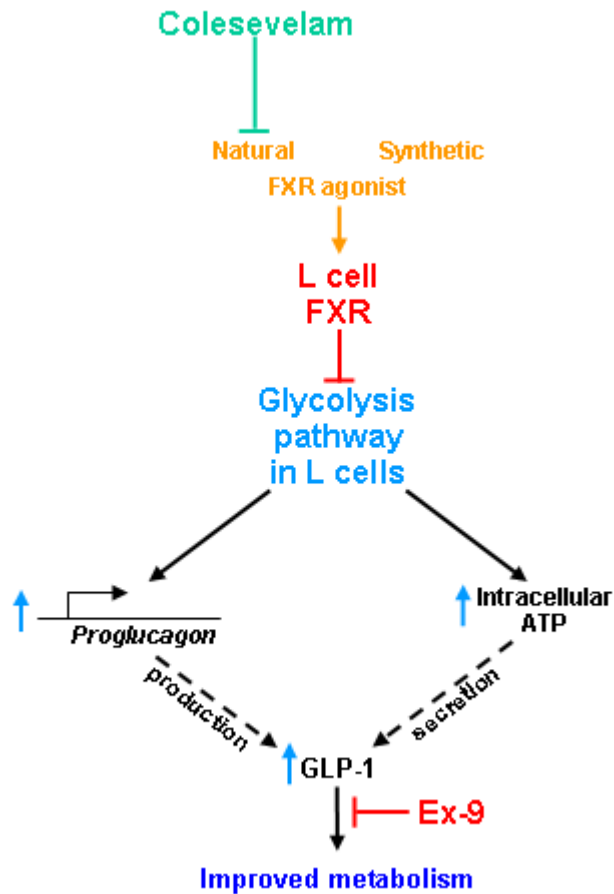


Figure S13 : Schéma bilan du mécanisme proposé. L'inactivation de FXR améliore la glycémie via la voie du GLP-1R. Le Colesevelam, en séquestrant les acides biliaires dans le lumen intestinal, empêche l'activation de FXR dans la cellule L ; FXR n'étant pas activé, il n'inhibe pas la voie de la glycolyse, menant à plus de production de proglucagon et à une meilleure sécrétion de GLP-1 en réponse au glucose. Cela conduit à une meilleure glycémie des souris atteintes d'obésité.

PERSPECTIVES

Perspectives

Jusqu'alors on pensait que FXR était exprimé dans l'intestin majoritairement dans les entérocytes, les cellules les plus abondantes de l'épithélium intestinal. Nous montrons aujourd'hui que FXR est aussi très bien exprimé dans les cellules L et qu'il est un régulateur négatif de la voie du GLP-1. Concernant les mécanismes moléculaires, FXR inhibe la réponse au glucose au niveau du proglucagon en interférant avec ChREBP et la réponse au glucose au niveau de la sécrétion de GLP-1 en diminuant la voie de la glycolyse. Toutefois les résultats sur ChREBP demandent à être mieux appréhendés à la fois *in vitro* et *in vivo*. *In vitro*, des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine liée à ChREBP permettraient d'observer si ChREBP se fixe au proglucagon et si l'activation de FXR diminue cette fixation. La mise au point de cette expérimentation dans les GLUTag, notamment au niveau de la sonication de la chromatine, m'a demandé un certain temps. Maintenant que les conditions semblent optimales, la réalisation de cette expérimentation nous permettrait de savoir si FXR diminue la fixation de ChREBP au proglucagon. Des expériences de gels shifts sur des extraits de GLUTag traitées par le GW4064 seraient aussi envisageables. *In vivo*, Il serait intéressant de voir si l'administration orale de Colesevelam à des souris *Chrebp*^{-/-} diminue toujours la glycémie après un test oral de tolérance au glucose.

Hormis l'interférence de FXR sur la réponse au glucose des cellules L, il sera intéressant d'étudier l'interférence de FXR avec d'autres sécrétagogues de GLP-1 comme, par exemple, les acides gras à chaîne courtes (SCFA), ligands de GPR43 (FFAR2). GPR43 est un RCPG de type Gas et Gαq qui, après activation par le propionate et/ou le butyrate, induit la sécrétion de GLP-1. L'analyse de la puce à ADN sur les GLUTag montre que l'activation de FXR diminue significativement l'expression de GPR43. Ces résultats de puces furent confirmés par qPCR. De plus, les souris *Fxr*^{-/-} présentent un microbiote intestinal différent des souris *Fxr*^{+/+} avec une augmentation des bactéries appartenant au phylum *Firmicutes* et une diminution des bactéries du phylum *Bacteroidetes*. Or, dans le phylum *Firmicutes*, on retrouve des espèces bactériennes productrices d'acides gras à courtes chaînes. Il serait intéressant alors d'administrer des fibres alimentaires non digérées (connues pour induire la sécrétion de GLP-1), à des souris *Fxr*^{-/-}. Cela permettrait de voir si l'augmentation de la sécrétion de GLP-1 en réponse au glucose se traduit également par une augmentation de la sécrétion de GLP-1 en réponse aux SCFA. Il deviendrait aussi nécessaire de compter après immunomarquages les cellules L dans l'intestin des souris *Fxr*^{+/+} et *Fxr*^{-/-}. Ce projet est actuellement mené par Sarah Ducastel, étudiante en 1^{ère} année de thèse.

Pour aller plus loin dans la compréhension du rôle de FXR dans la cellule L dans le contrôle de l'homéostasie énergétique, il serait intéressant de générer des souris invalidées

pour FXR spécifiquement dans la cellule L. Pour cela, on pourrait croiser des souris FXR-flox, disponibles au laboratoire, à des souris Glucagon-Cre. Des données du laboratoire montrent dans le pancréas que FXR n'est exprimé que dans les cellules β pancréatiques. Ainsi, dans la cellule α pancréatique où la recombinaison Cre serait active, elle ne pourrait pas invalider FXR. On ne peut cependant pas exclure que FXR serait invalidé aussi dans les cellules caudales du NTS, cellules exprimant le proglucagon, ce qui montre la limite de ce genre de modèle. Si après caractérisation des souris, il s'avère que FXR n'est invalidé que dans les cellules L intestinales, il serait alors intéressant de caractériser d'un point de vue métabolique ces souris par des tests de tolérances au glucose orale. De plus, l'impact de l'inactivation de FXR dans la cellule L (*lcFxr*^{-/-}) sur des souris nourries par un régime riche en graisse permettrait de déterminer si les souris *lcFxr*^{-/-} sont toujours protégées contre l'obésité et si leur profil glycémique après OGTT est toujours amélioré.

Nous observons que FXR est fonctionnel dans les GLUTag et nous identifions dans cette lignée *Shp*, *Fgf15* et *Fabp6* comme des gènes cibles de FXR fortement exprimés après activation. Or ces trois gènes interviennent dans le transport ou dans la synthèse des acides biliaires. Même si les cellules L ne représentent que 1% des cellules épithéliales intestinales, elles sont plus nombreuses dans l'intestin distal où les transporteurs et les récepteurs aux acides biliaires, dont FXR, sont le plus exprimés. Il se pourrait donc que FXR dans les cellules L joue un rôle important dans la régulation du métabolisme des acides biliaires. De plus, une dichotomie persiste entre le rôle positif de l'activation de TGR5 par les acides biliaires *via* GLP-1 et le rôle négatif de l'activation de FXR sur la voie GLP-1. Ce modèle murin d'inactivation de FXR dans la cellule L permettrait d'apporter quelques éclairages substantiels à ces interrogations. L'hypothèse que j'émetts ici est que, très rapidement après un repas, les acides biliaires activent le récepteur membranaire TGR5, plus accessible, et stimule la sécrétion postprandiale de GLP-1 pour normaliser rapidement la glycémie. Plus tard, lorsque le taux de glucose revient proche de la normoglycémie, les acides biliaires internalisés vont se fixer et activer le récepteur nucléaire FXR dans la cellule L diminuant ainsi la sécrétion de GLP-1. FXR exercerait un rétrocontrôle négatif pour préserver la cellule L d'une production superflue de GLP-1.

Au vu des résultats obtenus pendant ma thèse, la régulation de l'expression et de la sécrétion de GLP-1 par FXR fait intervenir majoritairement 3 acteurs : FXR, les acides biliaires et le glucose. Le glucose augmente l'expression du proglucagon et induit la sécrétion de GLP-1. L'activation de FXR sans glucose ne fait rien sur l'expression du proglucagon dans les GLUTag et sur la sécrétion de GLP-1 *ex vivo* chez la souris. C'est seulement en présence de glucose que FXR joue son rôle de régulateur négatif de la voie GLP-1. Au regard de ces données, l'interaction de différentes molécules pharmacologiques, connues pour induire la sécrétion de GLP-1, avec la voie FXR semble intéressante à étudier.

En effet, à part le Colesevelam, les inhibiteurs de ASBT administrés à la souris augmente la sécrétion de GLP-1 en réponse au glucose améliorant ainsi la glycémie des souris obèses. De plus, ces inhibiteurs inactivent FXR dans l'intestin. Il serait donc intéressant d'administrer des inhibiteurs de ASBT à des souris HFD *Fxr*^{+/+} et *Fxr*^{-/-} pour déterminer dans quelle mesure FXR est impliqué dans la régulation du métabolisme du glucose par les inhibiteurs de ASBT.

Chez l'Homme, le bypass gastrique de type Roux-En-Y (RYGB) est l'une des opérations qui fonctionne le mieux pour soigner l'hyperglycémie des patients obèses atteints de diabète de type 2. En effet, certaines études rapportent une rémission allant jusqu'à 76% des patients obèses diabétiques après RYGB (Buchwald JAMA 2009) ainsi qu'une diminution de la masse corporelle initiale de 15.1% 1 an après et de 21.4% 5 ans après opération (Caiazzo Ann Surg 2014). Toutefois, cette diminution de la masse corporelle ne peut pas expliquer *per se* l'amélioration de la glycémie. En effet, le RYGB, opération qui diminue de 35 à 40% la masse corporelle pré-opératoire et jusque 80% de la masse corporelle en excès (Cummings J Clin Endocrinol Metab 2004), normalise la glycémie de patients diabétiques obèses en général au bout d'une semaine ; période au bout de laquelle la masse corporelle n'est pas significativement diminuée (Pories Ann Surg 1995, Wickremesekera Obes Surg 2005). Cependant, ces actes chirurgicaux étant lourds au niveau de l'intervention, de la prise en charge et du suivi des patients, il devient nécessaire de comprendre les mécanismes moléculaires d'amélioration de la glycémie après RYGB. D'un point de vue métabolique le RYGB se traduit, entre autre, par une augmentation des acides biliaires, d'un shift dans les espèces du microbiote intestinal et d'une augmentation de GLP-1.

Très récemment, il a été montré que FXR était une cible moléculaire pouvant expliquer l'amélioration de la glycémie chez la souris après gastrectomie verticale chemisée (VSG) (Seeley *et al.* 2014), un autre type de chirurgie bariatrique qui consiste à réduire de plus de 50% la taille de l'estomac. Cette opération présente les mêmes caractéristiques que celles observées après RYGB (shift microbien, hausse des acides biliaires et de GLP-1). Dans cette étude, les auteurs montrent que le profil glycémique et que la masse corporelle des souris post-opération sont réduits de manière similaire à l'inactivation de FXR. Ils concluent que les effets de la VSG passent par une modification des acides biliaires et un shift microbien ciblant alors FXR et induisant l'amélioration de la glycémie et de la masse corporelle. Toutefois, dans cette étude aucune mesure de GLP-1 n'a été rapportée. Serait-il possible que les effets bénéfiques de la VSG se traduisent par une hausse de la sécrétion de GLP-1 due à une inhibition de FXR dans la cellule L ? Une autre étude récente faite chez le rat vient étayer un peu cette hypothèse (Goncalves *et al.* 2015). Dans cette étude, les

auteurs ont voulu étudié le rôle de la diversion biliaire sur l'amélioration de la glycémie. Se faisant, les auteurs miment la diversion biliaire qui a lieu après RYGB. Dans cette étude, les auteurs montrent que la diversion biliaire améliore la glycémie tout en diminuant la prise alimentaire, augmentant la sécrétion d'insuline en réponse au glucose, et en augmentant la sensibilité à l'insuline de ces rats. GLP-1 est connu 1) pour promouvoir tous ces effets, et 2) pour être augmenté après bypass. Toutefois les auteurs ne rapportent pas dans cette étude la sécrétion de GLP-1. De plus, les auteurs montrent que chez ces rats, l'administration plus distale des acides biliaires diminue l'activité de FXR dans l'intestin. Ces effets seraient-ils le reflet d'une augmentation de la sécrétion de GLP-1 après invalidation de FXR dans l'intestin ?

La grosse limite de ces études est la physiologie de ces modèles de rongeurs, très peu comparable à ce qui se passe réellement chez l'Homme après bypass. Pour palier à cela, le laboratoire du Pr. François Pattou développe actuellement un autre modèle d'étude dont le comportement alimentaire et la physiologie sont plus proches de l'Homme : le mini-pig. De plus, ce modèle à l'avantage d'être plus volumineux que les rongeurs permettant de réaliser plus facilement des actes chirurgicaux tels que les actes de chirurgies bariatriques ou les diversions du canal biliaire. Il serait intéressant de voir dans ce modèle si l'effet du bypass sur GLP-1 est médié par une inactivation de FXR dans la cellule L.

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

- Abbott, C.R., Monteiro, M., Small, C.J., Sajedi, A., Smith, K.L., Parkinson, J.R.C., Ghatei, M.A., and Bloom, S.R. (2005a). 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.* *1044*, 127–131.
- Abbott, C.R., Small, C.J., Kennedy, A.R., Neary, N.M., Sajedi, A., Ghatei, M.A., and Bloom, S.R. (2005b). Blockade of the neuropeptide Y Y2 receptor with the specific antagonist BIIE0246 attenuates the effect of endogenous and exogenous peptide YY(3-36) on food intake. *Brain Res.* *1043*, 139–144.
- De Aguiar Vallim, T.Q., Tarling, E.J., Ahn, H., Hagey, L.R., Romanoski, C.E., Lee, R.G., Graham, M.J., Motohashi, H., Yamamoto, M., and Edwards, P.A. (2015). MAFG Is a Transcriptional Repressor of Bile Acid Synthesis and Metabolism. *Cell Metab.* *21*, 298–310.
- Alemi, F., Poole, D.P., Chiu, J., Schoonjans, K., Cattaruzza, F., Grider, J.R., Bunnett, N.W., and Corvera, C.U. (2013). The receptor TGR5 mediates the prokinetic actions of intestinal bile acids and is required for normal defecation in mice. *Gastroenterology* *144*, 145–154.
- Amori, R.E., Lau, J., and Pittas, A.G. (2007). Efficacy and safety of incretin therapy in type 2 diabetes: systematic review and meta-analysis. *JAMA* *298*, 194–206.
- Ananthanarayanan, M., Balasubramanian, N., Makishima, M., Mangelsdorf, D.J., and Suchy, F.J. (2001). Human bile salt export pump promoter is transactivated by the farnesoid X receptor/bile acid receptor. *J. Biol. Chem.* *276*, 28857–28865.
- Aoki, K., Miyazaki, T., Nagakura, J., Orime, K., Togashi, Y., and Terauchi, Y. (2010). Effects of pre-meal versus post-meal administration of miglitol on plasma glucagon-like peptide-1 and glucosedependent insulinotropic polypeptide levels in healthy men. *Endocr. J.* *57*, 673–677.
- Arakawa, M., Mita, T., Azuma, K., Ebato, C., Goto, H., Nomiyama, T., Fujitani, Y., Hirose, T., Kawamori, R., and Watada, H. (2010). Inhibition of monocyte adhesion to endothelial cells and attenuation of atherosclerotic lesion by a glucagon-like peptide-1 receptor agonist, exendin-4. *Diabetes* *59*, 1030–1037.
- Axelsson, M., Ellis, E., Mörk, B., Garmark, K., Abrahamsson, A., Björkhem, I., Ericzon, B.G., and Einarsson, C. (2000). Bile acid synthesis in cultured human hepatocytes: support for an alternative biosynthetic pathway to cholic acid. *Hepatology* *31*, 1305–1312.
- Baggio, L.L., and Drucker, D.J. (2007). Biology of incretins: GLP-1 and GIP. *Gastroenterology* *132*, 2131–2157.
- Baggio, L.L., Huang, Q., Brown, T.J., and Drucker, D.J. (2004). 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* *53*, 2492–2500.
- Bala, V., Rajagopal, S., Kumar, D.P., Nalli, A.D., Mahavadi, S., Sanyal, A.J., Grider, J.R., and Murthy, K.S. (2014). Release of GLP-1 and PYY in response to the activation of G protein-coupled bile acid receptor TGR5 is mediated by Epac/PLC- ϵ pathway and modulated by endogenous H₂S. *Front Physiol* *5*, 420.
- Ban, K., Noyan-Ashraf, M.H., Hofer, J., Bolz, S.-S., Drucker, D.J., and Husain, M. (2008). Cardioprotective and vasodilatory actions of glucagon-like peptide 1 receptor are mediated through both glucagon-like peptide 1 receptor-dependent and -independent pathways. *Circulation* *117*, 2340–2350.
- Banting, F.G., Best, C.H., Collip, J.B., Campbell, W.R., and Fletcher, A.A. (1922). Pancreatic Extracts in the Treatment of Diabetes Mellitus. *Can Med Assoc J* *12*, 141–146.
- Barbier, O., Torra, I.P., Sirvent, A., Claudel, T., Blanquart, C., Duran-Sandoval, D., Kuipers, F., Kosykh, V., Fruchart, J.-C., and Staels, B. (2003). FXR induces the UGT2B4 enzyme in hepatocytes: a potential mechanism of negative feedback control of FXR activity. *Gastroenterology* *124*, 1926–1940.
- Barker, N., van Es, J.H., Kuipers, J., Kujala, P., van den Born, M., Cozijnsen, M., Haegerbarth, A., Korving, J., Begthel, H., Peters, P.J., et al. (2007). Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene *Lgr5*. *Nature* *449*, 1003–1007.
- Barragán, J.M., Eng, J., Rodríguez, R., and Blázquez, E. (1999). Neural contribution to the effect of glucagon-like peptide-1-(7-36) amide on arterial blood pressure in rats. *Am. J. Physiol.* *277*, E784–E791.

- Bateson, M.C., Maclean, D., Lowe, K.G., Bouchier, I.A., and Evans, J.R. (1978). Serum lipids and outcome of coronary care unit patients without proven ischaemic heart disease. *Health Bull (Edinb)* 36, 220–226.
- Batterham, R.L., Cowley, M.A., Small, C.J., Herzog, H., Cohen, M.A., Dakin, C.L., Wren, A.M., Brynes, A.E., Low, M.J., Ghatei, M.A., et al. (2002). Gut hormone PYY(3-36) physiologically inhibits food intake. *Nature* 418, 650–654.
- Batterham, R.L., Cohen, M.A., Ellis, S.M., Le Roux, C.W., Withers, D.J., Frost, G.S., Ghatei, M.A., and Bloom, S.R. (2003). Inhibition of food intake in obese subjects by peptide YY3-36. *N. Engl. J. Med.* 349, 941–948.
- Batterham, R.L., Heffron, H., Kapoor, S., Chivers, J.E., Chandarana, K., Herzog, H., Le Roux, C.W., Thomas, E.L., Bell, J.D., and Withers, D.J. (2006). Critical role for peptide YY in protein-mediated satiation and body-weight regulation. *Cell Metab.* 4, 223–233.
- Bayliss, W.M., and Starling, E.H. (1902). The mechanism of pancreatic secretion. *J. Physiol. (Lond.)* 28, 325–353.
- Beil, U., Crouse, J.R., Einarsson, K., and Grundy, S.M. (1982). Effects of interruption of the enterohepatic circulation of bile acids on the transport of very low density-lipoprotein triglycerides. *Metab. Clin. Exp.* 31, 438–444.
- Bell, G.I., Santerre, R.F., and Mullenbach, G.T. (1983). Hamster preproglucagon contains the sequence of glucagon and two related peptides. *Nature* 302, 716–718.
- Beysen, C., Murphy, E.J., Deines, K., Chan, M., Tsang, E., Glass, A., Turner, S.M., Protasio, J., Riiff, T., and Hellerstein, M.K. (2012). Effect of bile acid sequestrants on glucose metabolism, hepatic de novo lipogenesis, and cholesterol and bile acid kinetics in type 2 diabetes: a randomised controlled study. *Diabetologia* 55, 432–442.
- Bianco, A.C., Maia, A.L., da Silva, W.S., and Christoffolete, M.A. (2005). Adaptive activation of thyroid hormone and energy expenditure. *Biosci. Rep.* 25, 191–208.
- Bischoff, S.C., Mailer, R., Pabst, O., Weier, G., Sedlik, W., Li, Z., Chen, J.J., Murphy, D.L., and Gershon, M.D. (2009). Role of serotonin in intestinal inflammation: knockout of serotonin reuptake transporter exacerbates 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid colitis in mice. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 296, G685–G695.
- Bjursell, M., Wedin, M., Admyre, T., Hermansson, M., Böttcher, G., Göransson, M., Lindén, D., Bamberg, K., Oscarsson, J., and Bohlooly-Y, M. (2013). Ageing Fxr deficient mice develop increased energy expenditure, improved glucose control and liver damage resembling NASH. *PLoS ONE* 8, e64721.
- Blad, C.C., Tang, C., and Offermanns, S. (2012). G protein-coupled receptors for energy metabolites as new therapeutic targets. *Nat Rev Drug Discov* 11, 603–619.
- Van Bloemendaal, L., IJzerman, R.G., Ten Kulve, J.S., Barkhof, F., Konrad, R.J., Drent, M.L., Veltman, D.J., and Diamant, M. (2014). GLP-1 receptor activation modulates appetite- and reward-related brain areas in humans. *Diabetes* 63, 4186–4196.
- Blonde, L., and Russell-Jones, D. (2009). The safety and efficacy of liraglutide with or without oral antidiabetic drug therapy in type 2 diabetes: an overview of the LEAD 1-5 studies. *Diabetes Obes Metab* 11 Suppl 3, 26–34.
- Bookout, A.L., Jeong, Y., Downes, M., Yu, R.T., Evans, R.M., and Mangelsdorf, D.J. (2006). Anatomical profiling of nuclear receptor expression reveals a hierarchical transcriptional network. *Cell* 126, 789–799.
- Borg, C.M., le Roux, C.W., Ghatei, M.A., Bloom, S.R., Patel, A.G., and Aylwin, S.J.B. (2006). Progressive rise in gut hormone levels after Roux-en-Y gastric bypass suggests gut adaptation and explains altered satiety. *Br J Surg* 93, 210–215.
- Bos, J.L. (2006). Epac proteins: multi-purpose cAMP targets. *Trends Biochem. Sci.* 31, 680–686.
- Bose, A.K., Mocanu, M.M., Carr, R.D., Brand, C.L., and Yellon, D.M. (2005). Glucagon-like peptide 1 can directly protect the heart against ischemia/reperfusion injury. *Diabetes* 54, 146–151.
- Brubaker, P.L. (1988). Control of glucagon-like immunoreactive peptide secretion from fetal rat intestinal cultures. *Endocrinology* 123, 220–226.
- Brubaker, P.L., Drucker, D.J., Asa, S.L., and Greenberg, G.R. (1991). Regulation of peptide-YY synthesis and

secretion in fetal rat intestinal cultures. *Endocrinology* 129, 3351–3358.

Buchwald, H., Avidor, Y., Braunwald, E., Jensen, M.D., Pories, W., Fahrbach, K., and Schoelles, K. (2004). Bariatric surgery: a systematic review and meta-analysis. *JAMA* 292, 1724–1737.

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.

Burris, T.P., Montrose, C., Houck, K.A., Osborne, H.E., Bocchinfuso, W.P., Yaden, B.C., Cheng, C.C., Zink, R.W., Barr, R.J., Hepler, C.D., et al. (2005). The hypolipidemic natural product guggulsterone is a promiscuous steroid receptor ligand. *Mol. Pharmacol.* 67, 948–954.

Cabou, C., Campistron, G., Marsollier, N., Leloup, C., Cruciani-Guglielmacci, C., Pénicaud, L., Drucker, D.J., Magnan, C., and Burcelin, R. (2008). Brain glucagon-like peptide-1 regulates arterial blood flow, heart rate, and insulin sensitivity. *Diabetes* 57, 2577–2587.

Caiazzo, R., Lassailly, G., Leteurtre, E., Baud, G., Verkindt, H., Raverdy, V., Buob, D., Pigeyre, M., Mathurin, P., and Pattou, F. (2014). Roux-en-Y gastric bypass versus adjustable gastric banding to reduce nonalcoholic fatty liver disease: a 5-year controlled longitudinal study. *Ann. Surg.* 260, 893–898; discussion 898–899.

Campana, G., Pasini, P., Roda, A., and Spampinato, S. (2005). Regulation of ileal bile acid-binding protein expression in Caco-2 cells by ursodeoxycholic acid: role of the farnesoid X receptor. *Biochem. Pharmacol.* 69, 1755–1763.

Cao, X., Flock, G., Choi, C., Irwin, D.M., and Drucker, D.J. (2003). Aberrant regulation of human intestinal proglucagon gene expression in the NCI-H716 cell line. *Endocrinology* 144, 2025–2033.

Cariou, B., and Staels, B. (2007). FXR: a promising target for the metabolic syndrome? *Trends Pharmacol. Sci.* 28, 236–243.

Cariou, B., van Harmelen, K., Duran-Sandoval, D., van Dijk, T.H., Grefhorst, A., Abdelkarim, M., Caron, S., Torpier, G., Fruchart, J.-C., Gonzalez, F.J., et al. (2006). The farnesoid X receptor modulates adiposity and peripheral insulin sensitivity in mice. *J. Biol. Chem.* 281, 11039–11049.

Caron, S., Huaman Samanez, C., Dehondt, H., Ploton, M., Briand, O., Lien, F., Dorchies, E., Dumont, J., Postic, C., Cariou, B., et al. (2013). Farnesoid X receptor inhibits the transcriptional activity of carbohydrate response element binding protein in human hepatocytes. *Mol. Cell. Biol.* 33, 2202–2211.

Chen, C.-Y., and Tsai, C.-Y. (2012). Ghrelin and motilin in the gastrointestinal system. *Curr. Pharm. Des.* 18, 4755–4765.

Chen, L., McNulty, J., Anderson, D., Liu, Y., Nystrom, C., Bullard, S., Collins, J., Handlon, A.L., Klein, R., Grimes, A., et al. (2010). Cholestyramine reverses hyperglycemia and enhances glucose-stimulated glucagon-like peptide 1 release in Zucker diabetic fatty rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 334, 164–170.

Chen, L., Yao, X., Young, A., McNulty, J., Anderson, D., Liu, Y., Nystrom, C., Croom, D., Ross, S., Collins, J., et al. (2012). Inhibition of apical sodium-dependent bile acid transporter as a novel treatment for diabetes. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 302, E68–E76.

Cheng, C.Y.Y., Chu, J.Y.S., and Chow, B.K.C. (2011). Central and peripheral administration of secretin inhibits food intake in mice through the activation of the melanocortin system. *Neuropsychopharmacology* 36, 459–471.

Chiasson, J.-L., Josse, R.G., Gomis, R., Hanefeld, M., Karasik, A., Laakso, M., and STOP-NIDDM Trial Research Group (2002). Acarbose for prevention of type 2 diabetes mellitus: the STOP-NIDDM randomised trial. *Lancet* 359, 2072–2077.

Chong, H.K., Infante, A.M., Seo, Y.-K., Jeon, T.-I., Zhang, Y., Edwards, P.A., Xie, X., and Osborne, T.F. (2010). Genome-wide interrogation of hepatic FXR reveals an asymmetric IR-1 motif and synergy with LRH-1. *Nucleic Acids Res.* 38, 6007–6017.

Chong, H.K., Biesinger, J., Seo, Y.-K., Xie, X., and Osborne, T.F. (2012). Genome-wide analysis of hepatic LRH-1 reveals a promoter binding preference and suggests a role in regulating genes of lipid metabolism in concert with FXR. *BMC Genomics* 13, 51.

- Christensen, M., Miossec, P., Larsen, B.D., Werner, U., and Knop, F.K. (2014). The design and discovery of lixisenatide for the treatment of type 2 diabetes mellitus. *Expert Opin Drug Discov* 9, 1223–1251.
- Claudet, T., Sturm, E., Duez, H., Torra, I.P., Sirvent, A., Kosykh, V., Fruchart, J.-C., Dallongeville, J., Hum, D.W., Kuipers, F., et al. (2002). Bile acid-activated nuclear receptor FXR suppresses apolipoprotein A-I transcription via a negative FXR response element. *J. Clin. Invest.* 109, 961–971.
- Claudet, T., Inoue, Y., Barbier, O., Duran-Sandoval, D., Kosykh, V., Fruchart, J., Fruchart, J.-C., Gonzalez, F.J., and Staels, B. (2003). Farnesoid X receptor agonists suppress hepatic apolipoprotein CIII expression. *Gastroenterology* 125, 544–555.
- Cordier-Bussat, M., Morel, C., and Philippe, J. (1995). Homologous DNA sequences and cellular factors are implicated in the control of glucagon and insulin gene expression. *Mol. Cell. Biol.* 15, 3904–3916.
- Crouch, M.A., Mefford, I.N., and Wade, E.U. (2012). Proton pump inhibitor therapy associated with lower glycosylated hemoglobin levels in type 2 diabetes. *J Am Board Fam Med* 25, 50–54.
- Cui, J., Huang, L., Zhao, A., Lew, J.-L., Yu, J., Sahoo, S., Meinke, P.T., Royo, I., Pelaez, F., and Wright, S.D. (2003). Guggulsterone is a farnesoid X receptor antagonist in coactivator association assays but acts to enhance transcription of bile salt export pump. *J. Biol. Chem.* 278, 10214–10220.
- Cui, Y., Niziolek, P.J., MacDonald, B.T., Zylstra, C.R., Alenina, N., Robinson, D.R., Zhong, Z., Matthes, S., Jacobsen, C.M., Conlon, R.A., et al. (2011). Lrp5 functions in bone to regulate bone mass. *Nat. Med.* 17, 684–691.
- Cummings, D.E., Overduin, J., and Foster-Schubert, K.E. (2004). Gastric bypass for obesity: mechanisms of weight loss and diabetes resolution. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 89, 2608–2615.
- Daoudi, M., Hennuyer, N., Borland, M.G., Touche, V., Duhem, C., Gross, B., Caiazzo, R., Kerr-Conte, J., Pattou, F., Peters, J.M., et al. (2011). PPAR β/δ activation induces enteroendocrine L cell GLP-1 production. *Gastroenterology* 140, 1564–1574.
- Das, P., and May, C.L. (2011). Expression analysis of the Islet-1 gene in the developing and adult gastrointestinal tract. *Gene Expr. Patterns* 11, 244–254.
- Van Dijk, T.H., Grefhorst, A., Oosterveer, M.H., Bloks, V.W., Staels, B., Reijngoud, D.-J., and Kuipers, F. (2009). An increased flux through the glucose 6-phosphate pool in enterocytes delays glucose absorption in Fxr $^{-/-}$ mice. *J. Biol. Chem.* 284, 10315–10323.
- Dinneen, S., Gerich, J., and Rizza, R. (1992). Carbohydrate metabolism in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *N. Engl. J. Med.* 327, 707–713.
- Donovan, M.J., Paulino, G., and Raybould, H.E. (2007). CCK(1) receptor is essential for normal meal patterning in mice fed high fat diet. *Physiol. Behav.* 92, 969–974.
- Downes, M., Verdecia, M.A., Roecker, A.J., Hughes, R., Hogenesch, J.B., Kast-Woelbern, H.R., Bowman, M.E., Ferrer, J.-L., Anisfeld, A.M., Edwards, P.A., et al. (2003). A chemical, genetic, and structural analysis of the nuclear bile acid receptor FXR. *Mol. Cell* 11, 1079–1092.
- Drent, M.L., Tollefsen, A.T.M., van Heusden, F.H.J.A., Hoenderdos, E.B.M., Jonker, J.J.C., and van der Veen, E.A. (2002). Dose-dependent efficacy of miglitol, an alpha-glucosidase inhibitor, in type 2 diabetic patients on diet alone: results of a 24-week double-blind placebo-controlled study. *Diabetes Nutr. Metab.* 15, 152–159.
- Drucker, D.J. (2007). Dipeptidyl peptidase-4 inhibition and the treatment of type 2 diabetes: preclinical biology and mechanisms of action. *Diabetes Care* 30, 1335–1343.
- Drucker, D.J., and Brubaker, P.L. (1989). Proglucagon gene expression is regulated by a cyclic AMP-dependent pathway in rat intestine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86, 3953–3957.
- 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.
- Drucker, D.J., Campos, R., Reynolds, R., Stobie, K., and Brubaker, P.L. (1991). The rat glucagon gene is

- regulated by a protein kinase A-dependent pathway in pancreatic islet cells. *Endocrinology* 128, 394–400.
- Du, A., McCracken, K.W., Walp, E.R., Terry, N.A., Klein, T.J., Han, A., Wells, J.M., and May, C.L. (2012). Arx is required for normal enteroendocrine cell development in mice and humans. *Dev. Biol.* 365, 175–188.
- Dupre, J., Ross, S.A., Watson, D., and Brown, J.C. (1973). Stimulation of insulin secretion by gastric inhibitory polypeptide in man. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 37, 826–828.
- Duran-Sandoval, D., Mautino, G., Martin, G., Percevault, F., Barbier, O., Fruchart, J.-C., Kuipers, F., and Staels, B. (2004). Glucose regulates the expression of the farnesoid X receptor in liver. *Diabetes* 53, 890–898.
- Dwivedi, S.K.D., Singh, N., Kumari, R., Mishra, J.S., Tripathi, S., Banerjee, P., Shah, P., Kukshal, V., Tyagi, A.M., Gaikwad, A.N., et al. (2011). Bile acid receptor agonist GW4064 regulates PPAR γ coactivator-1 α expression through estrogen receptor-related receptor α . *Mol. Endocrinol.* 25, 922–932.
- Eckel, R.H., Fujimoto, W.Y., and Brunzell, J.D. (1979). Gastric inhibitory polypeptide enhanced lipoprotein lipase activity in cultured preadipocytes. *Diabetes* 28, 1141–1142.
- Edkins, J.S. (1906). The chemical mechanism of gastric secretion. *J. Physiol. (Lond.)* 34, 133–144.
- Edwards, C.M., Stanley, S.A., Davis, R., Brynes, A.E., Frost, G.S., Seal, L.J., Ghatei, M.A., and Bloom, S.R. (2001). Exendin-4 reduces fasting and postprandial glucose and decreases energy intake in healthy volunteers. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 281, E155–E161.
- Egan, J.M., Meneilly, G.S., Habener, J.F., and Elahi, D. (2002). Glucagon-like peptide-1 augments insulin-mediated glucose uptake in the obese state. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 87, 3768–3773.
- Egerod, K.L., Engelstoft, M.S., Grunddal, K.V., Nøhr, M.K., Secher, A., Sakata, I., Pedersen, J., Windeløv, J.A., Füchtbauer, E.-M., Olsen, J., et al. (2012). A major lineage of enteroendocrine cells coexpress CCK, secretin, GIP, GLP-1, PYY, and neurotensin but not somatostatin. *Endocrinology* 153, 5782–5795.
- Eliasson, L., Ma, X., Renström, E., Barg, S., Berggren, P.-O., Galvanovskis, J., Gromada, J., Jing, X., Lundquist, I., Salehi, A., et al. (2003). SUR1 regulates PKA-independent cAMP-induced granule priming in mouse pancreatic B-cells. *J. Gen. Physiol.* 121, 181–197.
- Eng, J., Kleinman, W.A., Singh, L., Singh, G., and Raufman, J.P. (1992). Isolation and characterization of exendin-4, an exendin-3 analogue, from *Heloderma suspectum* venom. Further evidence for an exendin receptor on dispersed acini from guinea pig pancreas. *J. Biol. Chem.* 267, 7402–7405.
- Essah, P.A., Levy, J.R., Sistrun, S.N., Kelly, S.M., and Nestler, J.E. (2007). Effect of macronutrient composition on postprandial peptide YY levels. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 92, 4052–4055.
- Fang, S., Suh, J.M., Reilly, S.M., Yu, E., Osborn, O., Lackey, D., Yoshihara, E., Perino, A., Jacinto, S., Lukasheva, Y., et al. (2015). Intestinal FXR agonism promotes adipose tissue browning and reduces obesity and insulin resistance. *Nat. Med.* 21, 159–165.
- Ferdinand, K.C., White, W.B., Calhoun, D.A., Lonn, E.M., Sager, P.T., Brunelle, R., Jiang, H.H., Threlkeld, R.J., Robertson, K.E., and Geiger, M.J. (2014). Effects of the once-weekly glucagon-like peptide-1 receptor agonist dulaglutide on ambulatory blood pressure and heart rate in patients with type 2 diabetes mellitus. *Hypertension* 64, 731–737.
- Filhoulaud, G., Guilmeau, S., Dentin, R., Girard, J., and Postic, C. (2013). Novel insights into ChREBP regulation and function. *Trends Endocrinol. Metab.* 24, 257–268.
- Flamez, D., Gilon, P., Moens, K., Van Breusegem, A., Delmeire, D., Scrocchi, L.A., Henquin, J.C., Drucker, D.J., and Schuit, F. (1999). Altered cAMP and Ca²⁺ signaling in mouse pancreatic islets with glucagon-like peptide-1 receptor null phenotype. *Diabetes* 48, 1979–1986.
- Flatt, P.R., Kwasowski, P., and Bailey, C.J. (1989). Stimulation of gastric inhibitory polypeptide release in ob/ob mice by oral administration of sugars and their analogues. *J. Nutr.* 119, 1300–1303.
- Ford, H.E., Peters, V., Martin, N.M., Sleeth, M.L., Ghatei, M.A., Frost, G.S., and Bloom, S.R. (2011). Effects of oral ingestion of sucralose on gut hormone response and appetite in healthy normal-weight subjects. *Eur J Clin Nutr* 65, 508–513.

- Forman, B.M., Goode, E., Chen, J., Oro, A.E., Bradley, D.J., Perlmann, T., Noonan, D.J., Burka, L.T., McMorris, T., Lamph, W.W., et al. (1995). Identification of a nuclear receptor that is activated by farnesol metabolites. *Cell* 81, 687–693.
- Fujimoto, K., Shibasaki, T., Yokoi, N., Kashima, Y., Matsumoto, M., Sasaki, T., Tajima, N., Iwanaga, T., and Seino, S. (2002). Piccolo, a Ca²⁺ sensor in pancreatic beta-cells. Involvement of cAMP-GEFII.Rim2. Piccolo complex in cAMP-dependent exocytosis. *J. Biol. Chem.* 277, 50497–50502.
- Fujita, Y., Wideman, R.D., Speck, M., Asadi, A., King, D.S., Webber, T.D., Haneda, M., and Kieffer, T.J. (2009). Incretin release from gut is acutely enhanced by sugar but not by sweeteners in vivo. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 296, E473–E479.
- Gagnon, J., Baggio, L.L., Drucker, D.J., and Brubaker, P.L. (2014). Ghrelin is a Novel Regulator of Glucagon-like Peptide-1 Secretion. *Diabetes*.
- Le Gall, M., Tobin, V., Stolarczyk, E., Dalet, V., Leturque, A., and Brot-Laroche, E. (2007). Sugar sensing by enterocytes combines polarity, membrane bound detectors and sugar metabolism. *J. Cell. Physiol.* 213, 834–843.
- Gallmann, E., Arsenijevic, D., Spengler, M., Williams, G., and Langhans, W. (2005). Effect of CCK-8 on insulin-induced hyperphagia and hypothalamic orexigenic neuropeptide expression in the rat. *Peptides* 26, 437–445.
- Gameiro, A., Reimann, F., Habib, A.M., O'Malley, D., Williams, L., Simpson, A.K., and Gribble, F.M. (2005). The neurotransmitters glycine and GABA stimulate glucagon-like peptide-1 release from the GLUTag cell line. *J. Physiol. (Lond.)* 569, 761–772.
- Garg, A., and Grundy, S.M. (1994). Cholestyramine therapy for dyslipidemia in non-insulin-dependent diabetes mellitus. A short-term, double-blind, crossover trial. *Ann. Intern. Med.* 121, 416–422.
- Gibbons, C., Caudwell, P., Finlayson, G., Webb, D.-L., Hellström, P.M., Näslund, E., and Blundell, J.E. (2013). Comparison of postprandial profiles of ghrelin, active GLP-1, and total PYY to meals varying in fat and carbohydrate and their association with hunger and the phases of satiety. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 98, E847–E855.
- Gil-Lozano, M., Mingomataj, E.L., Wu, W.K., Ridout, S.A., and Brubaker, P.L. (2014). Circadian secretion of the intestinal hormone GLP-1 by the rodent L cell. *Diabetes* 63, 3674–3685.
- Göke, R., Fehmann, H.C., Linn, T., Schmidt, H., Krause, M., Eng, J., and Göke, B. (1993). Exendin-4 is a high potency agonist and truncated exendin-(9-39)-amide an antagonist at the glucagon-like peptide 1-(7-36)-amide receptor of insulin-secreting beta-cells. *J. Biol. Chem.* 268, 19650–19655.
- Goldstone, A.P., Morgan, I., Mercer, J.G., Morgan, D.G., Moar, K.M., Ghatei, M.A., and Bloom, S.R. (2000). Effect of leptin on hypothalamic GLP-1 peptide and brain-stem pre-proglucagon mRNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 269, 331–335.
- Goncalves, D., Barataud, A., De Vadder, F., Vinera, J., Zitoun, C., Duchamp, A., and Mithieux, G. (2015). Bile Routing Modification Reproduces Key Features of Gastric Bypass in Rat. *Ann. Surg.*
- Gonzalez, G.A., Yamamoto, K.K., Fischer, W.H., Karr, D., Menzel, P., Biggs, W., Vale, W.W., and Montminy, M.R. (1989). A cluster of phosphorylation sites on the cyclic AMP-regulated nuclear factor CREB predicted by its sequence. *Nature* 337, 749–752.
- Gorboulev, V., Schürmann, A., Vallon, V., Kipp, H., Jaschke, A., Klessen, D., Friedrich, A., Scherneck, S., Rieg, T., Cunard, R., et al. (2012). Na(+)-D-glucose cotransporter SGLT1 is pivotal for intestinal glucose absorption and glucose-dependent incretin secretion. *Diabetes* 61, 187–196.
- Goto, H., Nomiya, T., Mita, T., Yasunari, E., Azuma, K., Komiya, K., Arakawa, M., Jin, W.L., Kanazawa, A., Kawamori, R., et al. (2011). Exendin-4, a glucagon-like peptide-1 receptor agonist, reduces intimal thickening after vascular injury. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 405, 79–84.
- Gouyon, F., Caillaud, L., Carriere, V., Klein, C., Dalet, V., Citadelle, D., Kellett, G.L., Thorens, B., Leturque, A., and Brot-Laroche, E. (2003). Simple-sugar meals target GLUT2 at enterocyte apical membranes to improve sugar absorption: a study in GLUT2-null mice. *J. Physiol. (Lond.)* 552, 823–832.
- Grant, S.G., Seidman, I., Hanahan, D., and Bautch, V.L. (1991). Early invasiveness characterizes metastatic

carcinoid tumors in transgenic mice. *Cancer Res.* 51, 4917–4923.

Gregersen, S., Jeppesen, P.B., Holst, J.J., and Hermansen, K. (2004). Antihyperglycemic effects of stevioside in type 2 diabetic subjects. *Metab. Clin. Exp.* 53, 73–76.

Gribble, F.M., Williams, L., Simpson, A.K., and Reimann, F. (2003). A novel glucose-sensing mechanism contributing to glucagon-like peptide-1 secretion from the GLUTag cell line. *Diabetes* 52, 1147–1154.

Grigoryan, M., Kedees, M.H., Guz, Y., and Teitelman, G. (2012). Phenotype of entero-endocrine L cells becomes restricted during development. *Dev. Dyn.* 241, 1986–1992.

Habib, A.M., Richards, P., Cairns, L.S., Rogers, G.J., Bannon, C.A.M., Parker, H.E., Morley, T.C.E., Yeo, G.S.H., Reimann, F., and Gribble, F.M. (2012). Overlap of endocrine hormone expression in the mouse intestine revealed by transcriptional profiling and flow cytometry. *Endocrinology* 153, 3054–3065.

Habib, A.M., Richards, P., Rogers, G.J., Reimann, F., and Gribble, F.M. (2013). Co-localisation and secretion of glucagon-like peptide 1 and peptide YY from primary cultured human L cells. *Diabetologia* 56, 1413–1416.

Hamada, Y., Nagasaki, H., Fuchigami, M., Furuta, S., Seino, Y., Nakamura, J., and Oiso, Y. (2013). The alpha-glucosidase inhibitor miglitol affects bile acid metabolism and ameliorates obesity and insulin resistance in diabetic mice. *Metab. Clin. Exp.* 62, 734–742.

Hansen, M.B., and Witte, A.-B. (2008). The role of serotonin in intestinal luminal sensing and secretion. *Acta Physiol (Oxf)* 193, 311–323.

Harach, T., Pols, T.W.H., Nomura, M., Maida, A., Watanabe, M., Auwerx, J., and Schoonjans, K. (2012). TGR5 potentiates GLP-1 secretion in response to anionic exchange resins. *Sci Rep* 2, 430.

Hart, A.W., Mella, S., Mendrychowski, J., van Heyningen, V., and Kleinjan, D.A. (2013). The developmental regulator Pax6 is essential for maintenance of islet cell function in the adult mouse pancreas. *PLoS ONE* 8, e54173.

Hayes, M.R., and Covasa, M. (2005). CCK and 5-HT act synergistically to suppress food intake through simultaneous activation of CCK-1 and 5-HT₃ receptors. *Peptides* 26, 2322–2330.

Hayes, M.R., and Covasa, M. (2006). Gastric distension enhances CCK-induced Fos-like immunoreactivity in the dorsal hindbrain by activating 5-HT₃ receptors. *Brain Res.* 1088, 120–130.

Hayes, M.R., Chory, F.M., Gallagher, C.A., and Covasa, M. (2006). Serotonin type-3 receptors mediate cholecystokinin-induced satiation through gastric distension. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 291, R115–R123.

Heine, R.J., Van Gaal, L.F., Johns, D., Mihm, M.J., Widel, M.H., Brodows, R.G., and GWAA Study Group (2005). Exenatide versus insulin glargine in patients with suboptimally controlled type 2 diabetes: a randomized trial. *Ann. Intern. Med.* 143, 559–569.

Helander, H.F., and Fändriks, L. (2014). Surface area of the digestive tract - revisited. *Scand. J. Gastroenterol.* 49, 681–689.

Herrema, H., Meissner, M., van Dijk, T.H., Brufau, G., Boverhof, R., Oosterveer, M.H., Reijngoud, D.-J., Müller, M., Stellaard, F., Groen, A.K., et al. (2010). Bile salt sequestration induces hepatic de novo lipogenesis through farnesoid X receptor- and liver X receptor alpha-controlled metabolic pathways in mice. *Hepatology* 51, 806–816.

Herzig, S., Fuzesi, L., and Knepel, W. (2000). Heterodimeric Pbx-Prep1 homeodomain protein binding to the glucagon gene restricting transcription in a cell type-dependent manner. *J. Biol. Chem.* 275, 27989–27999.

Hill, J.O. (2006). Understanding and addressing the epidemic of obesity: an energy balance perspective. *Endocr. Rev.* 27, 750–761.

Hill, M.E., Asa, S.L., and Drucker, D.J. (1999). Essential requirement for Pax6 in control of enteroendocrine proglucagon gene transcription. *Mol. Endocrinol.* 13, 1474–1486.

Hirasawa, A., Tsumaya, K., Awaji, T., Katsuma, S., Adachi, T., Yamada, M., Sugimoto, Y., Miyazaki, S., and Tsujimoto, G. (2005). Free fatty acids regulate gut incretin glucagon-like peptide-1 secretion through GPR120.

Nat. Med. 11, 90–94.

Hirokane, H., Nakahara, M., Tachibana, S., Shimizu, M., and Sato, R. (2004). Bile acid reduces the secretion of very low density lipoprotein by repressing microsomal triglyceride transfer protein gene expression mediated by hepatocyte nuclear factor-4. *J. Biol. Chem.* 279, 45685–45692.

Högenauer, K., Arista, L., Schmiedeberg, N., Werner, G., Jaksche, H., Bouhelal, R., Nguyen, D.G., Bhat, B.G., Raad, L., Rauld, C., et al. (2014). G-Protein-Coupled Bile Acid Receptor 1 (GPBAR1, TGR5) Agonists Reduce the Production of Proinflammatory Cytokines and Stabilize the Alternative Macrophage Phenotype. *J. Med. Chem.* 57, 10343–10354.

Holt, J.A., Luo, G., Billin, A.N., Bisi, J., McNeill, Y.Y., Kozarsky, K.F., Donahee, M., Wang, D.Y., Mansfield, T.A., Kliewer, S.A., et al. (2003). Definition of a novel growth factor-dependent signal cascade for the suppression of bile acid biosynthesis. *Genes Dev.* 17, 1581–1591.

Hu, X., Bonde, Y., Eggertsen, G., and Rudling, M. (2014). Muricholic bile acids are potent regulators of bile acid synthesis via a positive feedback mechanism. *J. Intern. Med.* 275, 27–38.

Huber, R.M., Murphy, K., Miao, B., Link, J.R., Cunningham, M.R., Rugar, M.J., Gunyuzlu, P.L., Haws, T.F., Kassam, A., Powell, F., et al. (2002). Generation of multiple farnesoid-X-receptor isoforms through the use of alternative promoters. *Gene* 290, 35–43.

Iakoubov, R., Izzo, A., Yeung, A., Whiteside, C.I., and Brubaker, P.L. (2007). Protein kinase Czeta is required for oleic acid-induced secretion of glucagon-like peptide-1 by intestinal endocrine L cells. *Endocrinology* 148, 1089–1098.

Imai, C., Saito, M., Mochizuki, K., Fuchigami, M., Goda, T., and Osonoi, T. (2014). Cotreatment with the α -glucosidase inhibitor miglitol and DPP-4 inhibitor sitagliptin improves glycemic control and reduces the expressions of CVD risk factors in type 2 diabetic Japanese patients. *Metab. Clin. Exp.* 63, 746–753.

Imeryüz, N., Yeğen, B.C., Bozkurt, A., Coşkun, T., Villanueva-Peñacarrillo, M.L., and Ulusoy, N.B. (1997). Glucagon-like peptide-1 inhibits gastric emptying via vagal afferent-mediated central mechanisms. *Am. J. Physiol.* 273, G920–G927.

Inci, F., Atmaca, M., Ozturk, M., Yildiz, S., Koceroglu, R., Sekeroglu, R., Ipekci, S.H., and Kebapcilar, L. (2014). Pantoprazole may improve beta cell function and diabetes mellitus. *J. Endocrinol. Invest.* 37, 449–454.

Irwin, N., Hunter, K., Montgomery, I.A., and Flatt, P.R. (2013a). Comparison of independent and combined metabolic effects of chronic treatment with (pGlu-Gln)-CCK-8 and long-acting GLP-1 and GIP mimetics in high fat-fed mice. *Diabetes Obes Metab* 15, 650–659.

Irwin, N., Frizelle, P., O'Harte, F.P.M., and Flatt, P.R. (2013b). (pGlu-Gln)-CCK-8[mPEG]: a novel, long-acting, mini-PEGylated cholecystokinin (CCK) agonist that improves metabolic status in dietary-induced diabetes. *Biochim. Biophys. Acta* 1830, 4009–4016.

Ishibashi, S., Schwarz, M., Frykman, P.K., Herz, J., and Russell, D.W. (1996). Disruption of cholesterol 7 α -hydroxylase gene in mice. I. Postnatal lethality reversed by bile acid and vitamin supplementation. *J. Biol. Chem.* 271, 18017–18023.

Jackson Huang, T.H., and Brubaker, P.L. (1995). Synthesis and secretion of glucagon-like peptide-1 by fetal rat intestinal cells in culture. *Endocrine* 3, 499–503.

Jang, H.-J., Kokrashvili, Z., Theodorakis, M.J., Carlson, O.D., Kim, B.-J., Zhou, J., Kim, H.H., Xu, X., Chan, S.L., Juhaszova, M., et al. (2007). Gut-expressed gustducin and taste receptors regulate secretion of glucagon-like peptide-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104, 15069–15074.

Jang, J.-H., Rickenbacher, A., Humar, B., Weber, A., Raptis, D.A., Lehmann, K., Stieger, B., Moritz, W., Soll, C., Georgiev, P., et al. (2012). Serotonin protects mouse liver from cholestatic injury by decreasing bile salt pool after bile duct ligation. *Hepatology* 56, 209–218.

Jenny, M., Uhl, C., Roche, C., Duluc, I., Guillermin, V., Guillemot, F., Jensen, J., Kedinger, M., and Gradwohl, G. (2002). Neurogenin3 is differentially required for endocrine cell fate specification in the intestinal and gastric epithelium. *EMBO J.* 21, 6338–6347.

- Jensen, E.V. (1966). Mechanism of estrogen action in relation to carcinogenesis. *Proc Can Cancer Conf* 6, 143–165.
- Jin, T. (2008). Mechanisms underlying proglucagon gene expression. *J. Endocrinol.* 198, 17–28.
- Jin, T., and Drucker, D.J. (1995). The proglucagon gene upstream enhancer contains positive and negative domains important for tissue-specific proglucagon gene transcription. *Mol. Endocrinol.* 9, 1306–1320.
- Kang, G., Chepurny, O.G., and Holz, G.G. (2001). cAMP-regulated guanine nucleotide exchange factor II (Epac2) mediates Ca²⁺-induced Ca²⁺ release in INS-1 pancreatic beta-cells. *J. Physiol. (Lond.)* 536, 375–385.
- Kang, G., Joseph, J.W., Chepurny, O.G., Monaco, M., Wheeler, M.B., Bos, J.L., Schwede, F., Genieser, H.-G., and Holz, G.G. (2003). Epac-selective cAMP analog 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP as a stimulus for Ca²⁺-induced Ca²⁺ release and exocytosis in pancreatic beta-cells. *J. Biol. Chem.* 278, 8279–8285.
- Kang, G., Chepurny, O.G., Malester, B., Rindler, M.J., Rehmann, H., Bos, J.L., Schwede, F., Coetzee, W.A., and Holz, G.G. (2006). cAMP sensor Epac as a determinant of ATP-sensitive potassium channel activity in human pancreatic beta cells and rat INS-1 cells. *J. Physiol. (Lond.)* 573, 595–609.
- Kashima, Y., Miki, T., Shibasaki, T., Ozaki, N., Miyazaki, M., Yano, H., and Seino, S. (2001). Critical role of cAMP-GEFII-Rim2 complex in incretin-potentiated insulin secretion. *J. Biol. Chem.* 276, 46046–46053.
- Katakami, N., Mita, T., Yoshii, H., Onuma, T., Kaneto, H., Osonoi, T., Shiraiwa, T., Kosugi, K., Umayahara, Y., Yamamoto, T., et al. (2013). Rationale, design, and baseline characteristics of a trial for the prevention of diabetic atherosclerosis using a DPP-4 inhibitor: the Study of Preventive Effects of Alogliptin on Diabetic Atherosclerosis (SPEAD-A). *J. Atheroscler. Thromb.* 20, 893–902.
- Kawamata, Y., Fujii, R., Hosoya, M., Harada, M., Yoshida, H., Miwa, M., Fukusumi, S., Habata, Y., Itoh, T., Shintani, Y., et al. (2003). A G protein-coupled receptor responsive to bile acids. *J. Biol. Chem.* 278, 9435–9440.
- Kawasaki, H., Springett, G.M., Mochizuki, N., Toki, S., Nakaya, M., Matsuda, M., Housman, D.E., and Graybiel, A.M. (1998). A family of cAMP-binding proteins that directly activate Rap1. *Science* 282, 2275–2279.
- Keitel, V., Donner, M., Winandy, S., Kubitz, R., and Häussinger, D. (2008). Expression and function of the bile acid receptor TGR5 in Kupffer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 372, 78–84.
- Keitel, V., Cupisti, K., Ullmer, C., Knoefel, W.T., Kubitz, R., and Häussinger, D. (2009). The membrane-bound bile acid receptor TGR5 is localized in the epithelium of human gallbladders. *Hepatology* 50, 861–870.
- Keitel, V., Ullmer, C., and Häussinger, D. (2010). The membrane-bound bile acid receptor TGR5 (Gpbar-1) is localized in the primary cilium of cholangiocytes. *Biol. Chem.* 391, 785–789.
- Kellett, G.L., Brot-Laroche, E., Mace, O.J., and Leturque, A. (2008). Sugar absorption in the intestine: the role of GLUT2. *Annu. Rev. Nutr.* 28, 35–54.
- Kelly, A.S., Bergenstal, R.M., Gonzalez-Campoy, J.M., Katz, H., and Bank, A.J. (2012). Effects of exenatide vs. metformin on endothelial function in obese patients with pre-diabetes: a randomized trial. *Cardiovasc Diabetol* 11, 64.
- Kemp, D.M., and Habener, J.F. (2001). Insulinotropic hormone glucagon-like peptide 1 (GLP-1) activation of insulin gene promoter inhibited by p38 mitogen-activated protein kinase. *Endocrinology* 142, 1179–1187.
- Kendall, D.M., Riddle, M.C., Rosenstock, J., Zhuang, D., Kim, D.D., Fineman, M.S., and Baron, A.D. (2005). Effects of exenatide (exendin-4) on glycemic control over 30 weeks in patients with type 2 diabetes treated with metformin and a sulfonyleurea. *Diabetes Care* 28, 1083–1091.
- Kieffer, T.J., and Habener, J.F. (1999). The glucagon-like peptides. *Endocr. Rev.* 20, 876–913.
- Kim, B.-J., Carlson, O.D., Jang, H.-J., Elahi, D., Berry, C., and Egan, J.M. (2005). Peptide YY is secreted after oral glucose administration in a gender-specific manner. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 90, 6665–6671.
- Kim, I., Ahn, S.-H., Inagaki, T., Choi, M., Ito, S., Guo, G.L., Kliewer, S.A., and Gonzalez, F.J. (2007). Differential regulation of bile acid homeostasis by the farnesoid X receptor in liver and intestine. *J. Lipid Res.* 48, 2664–2672.

- Kim, M., Platt, M.J., Shibasaki, T., Quaggin, S.E., Backx, P.H., Seino, S., Simpson, J.A., and Drucker, D.J. (2013). GLP-1 receptor activation and Epac2 link atrial natriuretic peptide secretion to control of blood pressure. *Nat. Med.* *19*, 567–575.
- Kitahara, M., Takamine, F., Imamura, T., and Benno, Y. (2000). Assignment of *Eubacterium* sp. VPI 12708 and related strains with high bile acid 7 α -dehydroxylating activity to *Clostridium scindens* and proposal of *Clostridium hylemonae* sp. nov., isolated from human faeces. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* *50 Pt 3*, 971–978.
- Kitahara, M., Takamine, F., Imamura, T., and Benno, Y. (2001). *Clostridium hiranonis* sp. nov., a human intestinal bacterium with bile acid 7 α -dehydroxylating activity. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* *51*, 39–44.
- Kjems, L.L., Holst, J.J., Vølund, A., and Madsbad, S. (2003). The influence of GLP-1 on glucose-stimulated insulin secretion: effects on beta-cell sensitivity in type 2 and nondiabetic subjects. *Diabetes* *52*, 380–386.
- Knapper, J.M., Puddicombe, S.M., Morgan, L.M., and Fletcher, J.M. (1995). Investigations into the actions of glucose-dependent insulinotropic polypeptide and glucagon-like peptide-1(7-36)amide on lipoprotein lipase activity in explants of rat adipose tissue. *J. Nutr.* *125*, 183–188.
- Knauf, C., Cani, P.D., Perrin, C., Iglesias, M.A., Maury, J.F., Bernard, E., Benhamed, F., Grémeaux, T., Drucker, D.J., Kahn, C.R., et al. (2005). Brain glucagon-like peptide-1 increases insulin secretion and muscle insulin resistance to favor hepatic glycogen storage. *J. Clin. Invest.* *115*, 3554–3563.
- Knauf, C., Cani, P.D., Kim, D.-H., Iglesias, M.A., Chabo, C., Waget, A., Colom, A., Rastrelli, S., Delzenne, N.M., Drucker, D.J., et al. (2008). Role of central nervous system glucagon-like Peptide-1 receptors in enteric glucose sensing. *Diabetes* *57*, 2603–2612.
- Knepel, W., Chafitz, J., and Habener, J.F. (1990). Transcriptional activation of the rat glucagon gene by the cyclic AMP-responsive element in pancreatic islet cells. *Mol. Cell. Biol.* *10*, 6799–6804.
- Kobelt, P., Tebbe, J.J., Tjandra, I., and Stengel, A. (2005). CCK inhibits the orexigenic effect of peripheral ghrelin. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* *288*, R751–R758.
- Kokrashvili, Z., Mosinger, B., and Margolskee, R.F. (2009). T1r3 and alpha-gustducin in gut regulate secretion of glucagon-like peptide-1. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *1170*, 91–94.
- Koo, B.-K., and Clevers, H. (2014). Stem cells marked by the R-spondin receptor LGR5. *Gastroenterology* *147*, 289–302.
- Kuhre, R.E., Gribble, F.M., Hartmann, B., Reimann, F., Windeløv, J.A., Rehfeld, J.F., and Holst, J.J. (2014). Fructose stimulates GLP-1 but not GIP secretion in mice, rats, and humans. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* *306*, G622–G630.
- Kuhre, R.E., Frost, C.R., Svendsen, B., and Holst, J.J. (2015). Molecular Mechanisms of Glucose-Stimulated GLP-1 Secretion From Perfused Rat Small Intestine. *Diabetes* *64*, 370–382.
- Kuipers, F., Claudel, T., Sturm, E., and Staels, B. (2004). The Farnesoid X Receptor (FXR) as modulator of bile acid metabolism. *Rev Endocr Metab Disord* *5*, 319–326.
- Kuntz, E., Pinget, M., and Damgé, P. (2004). Cholecystokinin octapeptide: a potential growth factor for pancreatic beta cells in diabetic rats. *JOP* *5*, 464–475.
- Kwon, D.Y., Kim, Y.S., Ahn, I.S., Kim, D.S., Kang, S., Hong, S.M., and Park, S. (2009). Exendin-4 potentiates insulinotropic action partly via increasing beta-cell proliferation and neogenesis and decreasing apoptosis in association with the attenuation of endoplasmic reticulum stress in islets of diabetic rats. *J. Pharmacol. Sci.* *111*, 361–371.
- Kwon, G., Pappan, K.L., Marshall, C.A., Schaffer, J.E., and McDaniel, M.L. (2004). cAMP Dose-dependently prevents palmitate-induced apoptosis by both protein kinase A- and cAMP-guanine nucleotide exchange factor-dependent pathways in beta-cells. *J. Biol. Chem.* *279*, 8938–8945.
- Laferrère, B., Swerdlow, N., Bawa, B., Arias, S., Bose, M., Oliván, B., Teixeira, J., McGinty, J., and Rother, K.I. (2010). Rise of oxyntomodulin in response to oral glucose after gastric bypass surgery in patients with type 2 diabetes. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *95*, 4072–4076.

- Lambert, G., Amar, M.J.A., Guo, G., Brewer, H.B., Gonzalez, F.J., and Sinal, C.J. (2003). The farnesoid X-receptor is an essential regulator of cholesterol homeostasis. *J. Biol. Chem.* 278, 2563–2570.
- Lamont, B.J., Li, Y., Kwan, E., Brown, T.J., Gaisano, H., and Drucker, D.J. (2012). Pancreatic GLP-1 receptor activation is sufficient for incretin control of glucose metabolism in mice. *J. Clin. Invest.* 122, 388–402.
- Lan, H., Lin, H.V., Wang, C.F., Wright, M.J., Xu, S., Kang, L., Juhl, K., Hedrick, J.A., and Kowalski, T.J. (2012). Agonists at GPR119 mediate secretion of GLP-1 from mouse enteroendocrine cells through glucose-independent pathways. *Br. J. Pharmacol.* 165, 2799–2807.
- Langhi, C., Le May, C., Kourimate, S., Caron, S., Staels, B., Krempf, M., Costet, P., and Cariou, B. (2008). Activation of the farnesoid X receptor represses PCSK9 expression in human hepatocytes. *FEBS Lett.* 582, 949–955.
- De Lau, W., Kujala, P., Schneeberger, K., Middendorp, S., Li, V.S.W., Barker, N., Martens, A., Hofhuis, F., DeKoter, R.P., Peters, P.J., et al. (2012). Peyer's patch M cells derived from Lgr5(+) stem cells require SpiB and are induced by RankL in cultured "miniguts." *Mol. Cell. Biol.* 32, 3639–3647.
- Lauffer, L.M., Iakoubov, R., and Brubaker, P.L. (2009). GPR119 is essential for oleoylethanolamide-induced glucagon-like peptide-1 secretion from the intestinal enteroendocrine L-cell. *Diabetes* 58, 1058–1066.
- Lavoie, B., Balemba, O.B., Godfrey, C., Watson, C.A., Vassileva, G., Corvera, C.U., Nelson, M.T., and Mawe, G.M. (2010). Hydrophobic bile salts inhibit gallbladder smooth muscle function via stimulation of GPBAR1 receptors and activation of KATP channels. *J. Physiol. (Lond.)* 588, 3295–3305.
- Lee, A., Patrick, P., Wishart, J., Horowitz, M., and Morley, J.E. (2002). The effects of miglitol on glucagon-like peptide-1 secretion and appetite sensations in obese type 2 diabetics. *Diabetes Obes Metab* 4, 329–335.
- Lee, E.Y., Kaneko, S., Jutabha, P., Zhang, X., Seino, S., Jomori, T., Anzai, N., and Miki, T. (2015). Distinct action of the α -glucosidase inhibitor miglitol on SGLT3, enteroendocrine cells, and GLP1 secretion. *J. Endocrinol.* 224, 205–214.
- Lefebvre, P., Cariou, B., Lien, F., Kuipers, F., and Staels, B. (2009). Role of bile acids and bile acid receptors in metabolic regulation. *Physiol. Rev.* 89, 147–191.
- Leibowitz, M.D., Biswas, C., Brady, E.J., Conti, M., Cullinan, C.A., Hayes, N.S., Manganiello, V.C., Saperstein, R., Wang, L.H., and Zafian, P.T. (1995). A novel insulin secretagogue is a phosphodiesterase inhibitor. *Diabetes* 44, 67–74.
- Leiss, O., and von Bergmann, K. (1982). Different effects of chenodeoxycholic acid and ursodeoxycholic acid on serum lipoprotein concentrations in patients with radiolucent gallstones. *Scand. J. Gastroenterol.* 17, 587–592.
- Lesurtel, M., Graf, R., Aleil, B., Walther, D.J., Tian, Y., Jochum, W., Gachet, C., Bader, M., and Clavien, P.-A. (2006). Platelet-derived serotonin mediates liver regeneration. *Science* 312, 104–107.
- Li, F., Jiang, C., Krausz, K.W., Li, Y., Albert, I., Hao, H., Fabre, K.M., Mitchell, J.B., Patterson, A.D., and Gonzalez, F.J. (2013). Microbiome remodelling leads to inhibition of intestinal farnesoid X receptor signalling and decreased obesity. *Nat Commun* 4, 2384.
- Li, H., Lam, A., Xu, A., Lam, K.S., and Chung, S.K. (2010). High dosage of Exendin-4 increased early insulin secretion in differentiated beta cells from mouse embryonic stem cells. *Acta Pharmacol. Sin.* 31, 570–577.
- Li, S., Hsu, D.D.F., Li, B., Luo, X., Alderson, N., Qiao, L., Ma, L., Zhu, H.H., He, Z., Suino-Powell, K., et al. (2014). Cytoplasmic tyrosine phosphatase Shp2 coordinates hepatic regulation of bile acid and FGF15/19 signaling to repress bile acid synthesis. *Cell Metab.* 20, 320–332.
- Li, T., Holmstrom, S.R., Kir, S., Umetani, M., Schmidt, D.R., Kliewer, S.A., and Mangelsdorf, D.J. (2011). The G protein-coupled bile acid receptor, TGR5, stimulates gallbladder filling. *Mol. Endocrinol.* 25, 1066–1071.
- Little, T.J., Pilichiewicz, A.N., Russo, A., Phillips, L., Jones, K.L., Nauck, M.A., Wishart, J., Horowitz, M., and Feinle-Bisset, C. (2006). Effects of intravenous glucagon-like peptide-1 on gastric emptying and intragastric distribution in healthy subjects: relationships with postprandial glycemic and insulinemic responses. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 91, 1916–1923.

- Lupi, R., Del Guerra, S., D'Aleo, V., Boggi, U., Filippini, F., and Marchetti, P. (2010). The direct effects of GLP-1 and GIP, alone or in combination, on human pancreatic islets. *Regul. Pept.* 165, 129–132.
- Ma, K., Saha, P.K., Chan, L., and Moore, D.D. (2006). Farnesoid X receptor is essential for normal glucose homeostasis. *J. Clin. Invest.* 116, 1102–1109.
- Ma, Y., Huang, Y., Yan, L., Gao, M., and Liu, D. (2013). Synthetic FXR agonist GW4064 prevents diet-induced hepatic steatosis and insulin resistance. *Pharm. Res.* 30, 1447–1457.
- Mace, O.J., Schindler, M., and Patel, S. (2012). The regulation of K- and L-cell activity by GLUT2 and the calcium-sensing receptor CasR in rat small intestine. *J. Physiol. (Lond.)* 590, 2917–2936.
- Makishima, M., Okamoto, A.Y., Repa, J.J., Tu, H., Learned, R.M., Luk, A., Hull, M.V., Lustig, K.D., Mangelsdorf, D.J., and Shan, B. (1999). Identification of a nuclear receptor for bile acids. *Science* 284, 1362–1365.
- Maloney, P.R., Parks, D.J., Haffner, C.D., Fivush, A.M., Chandra, G., Plunket, K.D., Creech, K.L., Moore, L.B., Wilson, J.G., Lewis, M.C., et al. (2000). Identification of a chemical tool for the orphan nuclear receptor FXR. *J. Med. Chem.* 43, 2971–2974.
- Mangelsdorf, D.J., Thummel, C., Beato, M., Herrlich, P., Schütz, G., Umesono, K., Blumberg, B., Kastner, P., Mark, M., Chambon, P., et al. (1995). The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* 83, 835–839.
- Margolskee, R.F., Dyer, J., Kokrashvili, Z., Salmon, K.S.H., Ilegems, E., Daly, K., Maillet, E.L., Ninomiya, Y., Mosingher, B., and Shirazi-Beechey, S.P. (2007). T1R3 and gustducin in gut sense sugars to regulate expression of Na⁺-glucose cotransporter 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104, 15075–15080.
- De Marinis, Y.Z., Salehi, A., Ward, C.E., Zhang, Q., Abdulkader, F., Bengtsson, M., Braha, O., Braun, M., Ramracheya, R., Amisten, S., et al. (2010). GLP-1 inhibits and adrenaline stimulates glucagon release by differential modulation of N- and L-type Ca²⁺ channel-dependent exocytosis. *Cell Metab.* 11, 543–553.
- Maruyama, T., Tanaka, K., Suzuki, J., Miyoshi, H., Harada, N., Nakamura, T., Miyamoto, Y., Kanatani, A., and Tamai, Y. (2006). Targeted disruption of G protein-coupled bile acid receptor 1 (Gpbar1/M-Bar) in mice. *J. Endocrinol.* 191, 197–205.
- Mawe, G.M., and Hoffman, J.M. (2013). Serotonin signalling in the gut—functions, dysfunctions and therapeutic targets. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 10, 473–486.
- Mcintyre, N., Holdsworth, C.D., and Turner, D.S. (1964). NEW INTERPRETATION OF ORAL GLUCOSE TOLERANCE. *Lancet* 2, 20–21.
- McKenna, N.J., Cooney, A.J., DeMayo, F.J., Downes, M., Glass, C.K., Lanz, R.B., Lazar, M.A., Mangelsdorf, D.J., Moore, D.D., Qin, J., et al. (2009). Minireview: Evolution of NURSA, the Nuclear Receptor Signaling Atlas. *Mol. Endocrinol.* 23, 740–746.
- Meeran, K., O'Shea, D., Edwards, C.M., Turton, M.D., Heath, M.M., Gunn, I., Abusnana, S., Rossi, M., Small, C.J., Goldstone, A.P., et al. (1999). Repeated intracerebroventricular administration of glucagon-like peptide-1-(7-36) amide or exendin-(9-39) alters body weight in the rat. *Endocrinology* 140, 244–250.
- Meier, J.J., Gallwitz, B., Salmen, S., Goetze, O., Holst, J.J., Schmidt, W.E., and Nauck, M.A. (2003). Normalization of glucose concentrations and deceleration of gastric emptying after solid meals during intravenous glucagon-like peptide 1 in patients with type 2 diabetes. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 88, 2719–2725.
- Meier, J.J., Kemmeries, G., Holst, J.J., and Nauck, M.A. (2005). Erythromycin antagonizes the deceleration of gastric emptying by glucagon-like peptide 1 and unmasks its insulinotropic effect in healthy subjects. *Diabetes* 54, 2212–2218.
- Mellitzer, G., Beucher, A., Lobstein, V., Michel, P., Robine, S., Keding, M., and Gradwohl, G. (2010). Loss of enteroendocrine cells in mice alters lipid absorption and glucose homeostasis and impairs postnatal survival. *J. Clin. Invest.* 120, 1708–1721.
- Meneilly, G.S., McIntosh, C.H.S., Pederson, R.A., Habener, J.F., Ehlers, M.R.W., Egan, J.M., and Elahi, D. (2003). Effect of glucagon-like peptide 1 (7-36 amide) on insulin-mediated glucose uptake in patients with type 1 diabetes. *Diabetes Care* 26, 837–842.

- Migrenne, S., Marsollier, N., Cruciani-Guglielmacci, C., and Magnan, C. (2006). Importance of the gut-brain axis in the control of glucose homeostasis. *Curr Opin Pharmacol* 6, 592–597.
- Modica, S., Gadaleta, R.M., and Moschetta, A. (2010). Deciphering the nuclear bile acid receptor FXR paradigm. *Nucl Recept Signal* 8, e005.
- Moore, B. (1906). On the treatment of Diabetes mellitus by acid extract of Duodenal Mucous Membrane. *Biochem. J.* 1, 28–38.
- Moran, T.H. (2009). Gut peptides in the control of food intake. *Int J Obes (Lond)* 33 *Suppl* 1, S7–S10.
- Morgan, W.A., Nk, T., and Ding, Y. (2008). The use of High Performance Thin-Layer Chromatography to determine the role of membrane lipid composition in bile salt-induced kidney cell damage. *J Pharmacol Toxicol Methods* 57, 70–73.
- Moriya, R., Shirakura, T., Ito, J., Mashiko, S., and Seo, T. (2009). Activation of sodium-glucose cotransporter 1 ameliorates hyperglycemia by mediating incretin secretion in mice. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 297, E1358–E1365.
- Mueller, M., Thorell, A., Claudel, T., Jha, P., Koefeler, H., Lackner, C., Hoesel, B., Fauler, G., Stojakovic, T., Einarrsson, C., et al. (2015). Ursodeoxycholic Acid Exerts Farnesoid X Receptor-antagonistic Effects on Bile Acid and Lipid Metabolism in Morbid Obesity. *J. Hepatol.*
- Mulder, H., Ekelund, M., Ekblad, E., and Sundler, F. (1997). Islet amyloid polypeptide in the gut and pancreas: localization, ontogeny and gut motility effects. *Peptides* 18, 771–783.
- Mustain, W.C., Rychahou, P.G., and Evers, B.M. (2011). The role of neurotensin in physiologic and pathologic processes. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 18, 75–82.
- Nagashima, M., Watanabe, T., Terasaki, M., Tomoyasu, M., Nohtomi, K., Kim-Kaneyama, J., Miyazaki, A., and Hirano, T. (2011). Native incretins prevent the development of atherosclerotic lesions in apolipoprotein E knockout mice. *Diabetologia* 54, 2649–2659.
- Nagatake, T., Fujita, H., Minato, N., and Hamazaki, Y. (2014). Enteroendocrine cells are specifically marked by cell surface expression of claudin-4 in mouse small intestine. *PLoS ONE* 9, e90638.
- Nakahara, M., Fujii, H., Maloney, P.R., Shimizu, M., and Sato, R. (2002). Bile acids enhance low density lipoprotein receptor gene expression via a MAPK cascade-mediated stabilization of mRNA. *J. Biol. Chem.* 277, 37229–37234.
- Narita, T., Katsuura, Y., Sato, T., Hosoba, M., Fujita, H., Morii, T., and Yamada, Y. (2009). Miglitol induces prolonged and enhanced glucagon-like peptide-1 and reduced gastric inhibitory polypeptide responses after ingestion of a mixed meal in Japanese Type 2 diabetic patients. *Diabet. Med.* 26, 187–188.
- Natalicchio, A., De Stefano, F., Orlando, M.R., Melchiorre, M., Leonardini, A., Cignarelli, A., Labarbuta, R., Marchetti, P., Perrini, S., Laviola, L., et al. (2010). Exendin-4 prevents c-Jun N-terminal protein kinase activation by tumor necrosis factor-alpha (TNFalpha) and inhibits TNFalpha-induced apoptosis in insulin-secreting cells. *Endocrinology* 151, 2019–2029.
- Nauck, M., Stöckmann, F., Ebert, R., and Creutzfeldt, W. (1986). Reduced incretin effect in type 2 (non-insulin-dependent) diabetes. *Diabetologia* 29, 46–52.
- Nauck, M.A., Heimesaat, M.M., Orskov, C., Holst, J.J., Ebert, R., and Creutzfeldt, W. (1993). 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.* 91, 301–307.
- Nauck, M.A., Holst, J.J., and Willms, B. (1997). Glucagon-like peptide 1 and its potential in the treatment of non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Horm. Metab. Res.* 29, 411–416.
- Neuschwander-Tetri, B.A., Loomba, R., Sanyal, A.J., Lavine, J.E., Van Natta, M.L., Abdelmalek, M.F., Chalasani, N., Dasarathy, S., Diehl, A.M., Hameed, B., et al. (2014). Farnesoid X nuclear receptor ligand obeticholic acid for non-cirrhotic, non-alcoholic steatohepatitis (FLINT): a multicentre, randomised, placebo-controlled trial. *Lancet.*
- Ni, Z., Anini, Y., Fang, X., Mills, G., Brubaker, P.L., and Jin, T. (2003). Transcriptional activation of the

proglucagon gene by lithium and beta-catenin in intestinal endocrine L cells. *J. Biol. Chem.* 278, 1380–1387.

Nocito, A., Dahm, F., Jochum, W., Jang, J.H., Georgiev, P., Bader, M., Renner, E.L., and Clavien, P.-A. (2007). Serotonin mediates oxidative stress and mitochondrial toxicity in a murine model of nonalcoholic steatohepatitis. *Gastroenterology* 133, 608–618.

Nuclear Receptors Nomenclature Committee (1999). A unified nomenclature system for the nuclear receptor superfamily. *Cell* 97, 161–163.

Oben, J., Morgan, L., Fletcher, J., and Marks, V. (1991). Effect of the entero-pancreatic hormones, gastric inhibitory polypeptide and glucagon-like polypeptide-1(7-36) amide, on fatty acid synthesis in explants of rat adipose tissue. *J. Endocrinol.* 130, 267–272.

Ochsner, S.A., Watkins, C.M., LaGrone, B.S., Steffen, D.L., and McKenna, N.J. (2010). Research resource: Tissue-specific transcriptomics and cistromics of nuclear receptor signaling: a web research resource. *Mol. Endocrinol.* 24, 2065–2069.

Okerson, T., Yan, P., Stonehouse, A., and Brodows, R. (2010). Effects of exenatide on systolic blood pressure in subjects with type 2 diabetes. *Am. J. Hypertens.* 23, 334–339.

Ait-Omar, A., Monteiro-Sepulveda, M., Poitou, C., Le Gall, M., Cotillard, A., Gilet, J., Garbin, K., Houllier, A., Château, D., Lacombe, A., et al. (2011). GLUT2 accumulation in enterocyte apical and intracellular membranes: a study in morbidly obese human subjects and ob/ob and high fat-fed mice. *Diabetes* 60, 2598–2607.

Owsley, E., and Chiang, J.Y.L. (2003). Guggulsterone antagonizes farnesoid X receptor induction of bile salt export pump but activates pregnane X receptor to inhibit cholesterol 7 α -hydroxylase gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 304, 191–195.

Ozaki, N., Shibasaki, T., Kashima, Y., Miki, T., Takahashi, K., Ueno, H., Sunaga, Y., Yano, H., Matsuura, Y., Iwanaga, T., et al. (2000). cAMP-GEFII is a direct target of cAMP in regulated exocytosis. *Nat. Cell Biol.* 2, 805–811.

Park, J.-H., Kim, S.-J., Park, S.-H., Son, D.-G., Bae, J.-H., Kim, H.K., Han, J., and Song, D.-K. (2012). Glucagon-like peptide-1 enhances glucokinase activity in pancreatic β -cells through the association of Epac2 with Rim2 and Rab3A. *Endocrinology* 153, 574–582.

Parker, H.E., Adriaenssens, A., Rogers, G., Richards, P., Koepsell, H., Reimann, F., and Gribble, F.M. (2012). Predominant role of active versus facilitative glucose transport for glucagon-like peptide-1 secretion. *Diabetologia* 55, 2445–2455.

Pawlak, M., Lefebvre, P., and Staels, B. (2012). General molecular biology and architecture of nuclear receptors. *Curr Top Med Chem* 12, 486–504.

Pedersen, J., Ugleholdt, R.K., Jørgensen, S.M., Windeløv, J.A., Grunddal, K.V., Schwartz, T.W., Füchtbauer, E.M., Poulsen, S.S., Holst, P.J., and Holst, J.J. (2013). Glucose metabolism is altered after loss of L cells and α -cells but not influenced by loss of K cells. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 304, E60–E73.

Pellicciari, R., Fiorucci, S., Camaioni, E., Clerici, C., Costantino, G., Maloney, P.R., Morelli, A., Parks, D.J., and Willson, T.M. (2002). 6 α -ethyl-chenodeoxycholic acid (6-ECDCA), a potent and selective FXR agonist endowed with anticholestatic activity. *J. Med. Chem.* 45, 3569–3572.

Perez, M.-J., and Briz, O. (2009). Bile-acid-induced cell injury and protection. *World J. Gastroenterol.* 15, 1677–1689.

Petersen, T.I., Pahle, E., Sommer, T., and Zilling, T. (2013). Laparoscopic minimally invasive total gastrectomy with linear stapled oesophagojejunostomy--experience from the first thirty procedures. *Anticancer Res.* 33, 3269–3273.

Philippe, J., and Rochat, S. (1991). Strict distance requirement for transcriptional activation by two regulatory elements of the glucagon gene. *DNA Cell Biol.* 10, 119–124.

Pinney, S.E., Oliver-Krasinski, J., Ernst, L., Hughes, N., Patel, P., Stoffers, D.A., Russo, P., and De León, D.D. (2011). Neonatal diabetes and congenital malabsorptive diarrhea attributable to a novel mutation in the human neurogenin-3 gene coding sequence. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 96, 1960–1965.

- Plass, J.R.M., Mol, O., Heegsma, J., Geuken, M., Faber, K.N., Jansen, P.L.M., and Müller, M. (2002). Farnesoid X receptor and bile salts are involved in transcriptional regulation of the gene encoding the human bile salt export pump. *Hepatology* 35, 589–596.
- Popescu, I.R., Helleboid-Chapman, A., Lucas, A., Vandewalle, B., Dumont, J., Bouchaert, E., Derudas, B., Kerr-Conte, J., Caron, S., Pattou, F., et al. (2010). The nuclear receptor FXR is expressed in pancreatic beta-cells and protects human islets from lipotoxicity. *FEBS Lett.* 584, 2845–2851.
- Porez, G., Prawitt, J., Gross, B., and Staels, B. (2012). Bile acid receptors as targets for the treatment of dyslipidemia and cardiovascular disease. *J. Lipid Res.* 53, 1723–1737.
- Pories, W.J., Swanson, M.S., MacDonald, K.G., Long, S.B., Morris, P.G., Brown, B.M., Barakat, H.A., deRamon, R.A., Israel, G., and Dolezal, J.M. (1995). Who would have thought it? An operation proves to be the most effective therapy for adult-onset diabetes mellitus. *Ann. Surg.* 222, 339–350; discussion 350–352.
- Portela-Gomes, G.M., Stridsberg, M., Johansson, H., and Grimelius, L. (1997). Complex co-localization of chromogranins and neurohormones in the human gastrointestinal tract. *J. Histochem. Cytochem.* 45, 815–822.
- Potthoff, M.J., Potts, A., He, T., Duarte, J.A.G., Taussig, R., Mangelsdorf, D.J., Kliewer, S.A., and Burgess, S.C. (2013). Colesevelam suppresses hepatic glycogenolysis by TGR5-mediated induction of GLP-1 action in DIO mice. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 304, G371–G380.
- Powell, D.R., DaCosta, C.M., Gay, J., Ding, Z.-M., Smith, M., Greer, J., Doree, D., Jeter-Jones, S., Mseeh, F., Rodriguez, L.A., et al. (2013). Improved glycemic control in mice lacking Sglt1 and Sglt2. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 304, E117–E130.
- Prawitt, J., and Staels, B. (2010). Bile acid sequestrants: glucose-lowering mechanisms. *Metab Syndr Relat Disord* 8 Suppl 1, S3–S8.
- Prawitt, J., Abdelkarim, M., Stroeve, J.H.M., Popescu, I., Duez, H., Velagapudi, V.R., Dumont, J., Bouchaert, E., van Dijk, T.H., Lucas, A., et al. (2011). Farnesoid X receptor deficiency improves glucose homeostasis in mouse models of obesity. *Diabetes* 60, 1861–1871.
- Prawitt, J., Caron, S., and Staels, B. (2014). Glucose-lowering effects of intestinal bile acid sequestration through enhancement of splanchnic glucose utilization. *Trends Endocrinol. Metab.* 25, 235–244.
- Pyke, C., Heller, R.S., Kirk, R.K., Ørskov, C., Reedtz-Runge, S., Kaastrup, P., Hvelplund, A., Bardram, L., Calatayud, D., and Knudsen, L.B. (2014). GLP-1 receptor localization in monkey and human tissue: novel distribution revealed with extensively validated monoclonal antibody. *Endocrinology* 155, 1280–1290.
- Ranta, F., Avram, D., Berchtold, S., Düfer, M., Drews, G., Lang, F., and Ullrich, S. (2006). Dexamethasone induces cell death in insulin-secreting cells, an effect reversed by exendin-4. *Diabetes* 55, 1380–1390.
- Ravassa, S., Zudaire, A., and Díez, J. (2012). GLP-1 and cardioprotection: from bench to bedside. *Cardiovasc. Res.* 94, 316–323.
- Rehfeld, J.F., and Stadil, F. (1973). The effect of gastrin on basal- and glucose-stimulated insulin secretion in man. *J. Clin. Invest.* 52, 1415–1426.
- Rehfeld, J.F., Lauritsen, K.B., and Stadil, F. (1976). Insulin secretion in the Zollinger-Ellison syndrome. *Scand. J. Gastroenterol. Suppl.* 37, 63–66.
- Reimann, F., Williams, L., da Silva Xavier, G., Rutter, G.A., and Gribble, F.M. (2004). Glutamine potently stimulates glucagon-like peptide-1 secretion from GLUTag cells. *Diabetologia* 47, 1592–1601.
- Reimann, F., Maziarz, M., Flock, G., Habib, A.M., Drucker, D.J., and Gribble, F.M. (2005). Characterization and functional role of voltage gated cation conductances in the glucagon-like peptide-1 secreting GLUTag cell line. *J. Physiol. (Lond.)* 563, 161–175.
- Reimann, F., Habib, A.M., Tolhurst, G., Parker, H.E., Rogers, G.J., and Gribble, F.M. (2008). Glucose sensing in L cells: a primary cell study. *Cell Metab.* 8, 532–539.
- Renga, B., Mencarelli, A., Vavassori, P., Brancaleone, V., and Fiorucci, S. (2010). The bile acid sensor FXR regulates insulin transcription and secretion. *Biochim. Biophys. Acta* 1802, 363–372.

- Reubi, J.C., Waser, B., Gugger, M., Friess, H., Kleeff, J., Kaye, H., Büchler, M.W., and Laissie, J.A. (2003). Distribution of CCK1 and CCK2 receptors in normal and diseased human pancreatic tissue. *Gastroenterology* 125, 98–106.
- Richter, B., Bandeira-Echtler, E., Bergerhoff, K., and Lerch, C.L. (2008). Dipeptidyl peptidase-4 (DPP-4) inhibitors for type 2 diabetes mellitus. *Cochrane Database Syst Rev* CD006739.
- Rindi, G., Ratineau, C., Ronco, A., Candusso, M.E., Tsai, M., and Leiter, A.B. (1999). Targeted ablation of secretin-producing cells in transgenic mice reveals a common differentiation pathway with multiple enteroendocrine cell lineages in the small intestine. *Development* 126, 4149–4156.
- Ritzel, U., Fromme, A., Ottleben, M., Leonhardt, U., and Ramadori, G. (1997). Release of glucagon-like peptide-1 (GLP-1) by carbohydrates in the perfused rat ileum. *Acta Diabetol* 34, 18–21.
- Ritz-Laser, B., Estreicher, A., Gauthier, B.R., Mamin, A., Edlund, H., and Philippe, J. (2002). The pancreatic beta-cell-specific transcription factor Pax-4 inhibits glucagon gene expression through Pax-6. *Diabetologia* 45, 97–107.
- Robinson-Rechavi, M., Escriva Garcia, H., and Laudet, V. (2003). The nuclear receptor superfamily. *J. Cell. Sci.* 116, 585–586.
- Rocca, A.S., and Brubaker, P.L. (1999). Role of the vagus nerve in mediating proximal nutrient-induced glucagon-like peptide-1 secretion. *Endocrinology* 140, 1687–1694.
- Rolo, A.P., Palmeira, C.M., Holy, J.M., and Wallace, K.B. (2004). Role of mitochondrial dysfunction in combined bile acid-induced cytotoxicity: the switch between apoptosis and necrosis. *Toxicol. Sci.* 79, 196–204.
- De Rooij, J., Zwartkruis, F.J., Verheijen, M.H., Cool, R.H., Nijman, S.M., Wittinghofer, A., and Bos, J.L. (1998). Epac is a Rap1 guanine-nucleotide-exchange factor directly activated by cyclic AMP. *Nature* 396, 474–477.
- Rooman, I., and Bouwens, L. (2004). Combined gastrin and epidermal growth factor treatment induces islet regeneration and restores normoglycaemia in C57Bl6/J mice treated with alloxan. *Diabetologia* 47, 259–265.
- Rooman, I., Lardon, J., and Bouwens, L. (2002). Gastrin stimulates beta-cell neogenesis and increases islet mass from transdifferentiated but not from normal exocrine pancreas tissue. *Diabetes* 51, 686–690.
- Rosen, H., Reshef, A., Maeda, N., Lippoldt, A., Shpizen, S., Triger, L., Eggertsen, G., Björkhem, I., and Leitersdorf, E. (1998). Markedly reduced bile acid synthesis but maintained levels of cholesterol and vitamin D metabolites in mice with disrupted sterol 27-hydroxylase gene. *J. Biol. Chem.* 273, 14805–14812.
- Ross, S.A., and Dupre, J. (1978). Effects of ingestion of triglyceride or galactose on secretion of gastric inhibitory polypeptide and on responses to intravenous glucose in normal and diabetic subjects. *Diabetes* 27, 327–333.
- Le Roux, C.W., Aylwin, S.J.B., Batterham, R.L., Borg, C.M., Coyle, F., Prasad, V., Shurey, S., Ghatei, M.A., Patel, A.G., and Bloom, S.R. (2006). Gut hormone profiles following bariatric surgery favor an anorectic state, facilitate weight loss, and improve metabolic parameters. *Ann. Surg.* 243, 108–114.
- Rushakoff, R.J., Goldfine, I.D., Carter, J.D., and Liddle, R.A. (1987). Physiological concentrations of cholecystokinin stimulate amino acid-induced insulin release in humans. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 65, 395–401.
- Ryan, K.K., Tremaroli, V., Clemmensen, C., Kovatcheva-Datchary, P., Myronovych, A., Karns, R., Wilson-Pérez, H.E., Sandoval, D.A., Kohli, R., Bäckhed, F., et al. (2014). FXR is a molecular target for the effects of vertical sleeve gastrectomy. *Nature* 509, 183–188.
- Samocho-Bonet, D., Wong, O., Synnott, E.-L., Piyyaratna, N., Douglas, A., Gribble, F.M., Holst, J.J., Chisholm, D.J., and Greenfield, J.R. (2011). Glutamine reduces postprandial glycemia and augments the glucagon-like peptide-1 response in type 2 diabetes patients. *J. Nutr.* 141, 1233–1238.
- Sandhu, H., Wiesenthal, S.R., MacDonald, P.E., McCall, R.H., Tchipashvili, V., Rashid, S., Satkunarajah, M., Irwin, D.M., Shi, Z.Q., Brubaker, P.L., et al. (1999). Glucagon-like peptide 1 increases insulin sensitivity in depancreatized dogs. *Diabetes* 48, 1045–1053.
- Sato, T., van Es, J.H., Snippert, H.J., Stange, D.E., Vries, R.G., van den Born, M., Barker, N., Shroyer, N.F., van de Wetering, M., and Clevers, H. (2011). Paneth cells constitute the niche for Lgr5 stem cells in intestinal crypts. *Nature* 469, 415–418.

- Sayin, S.I., Wahlström, A., Felin, J., Jääntti, S., Marschall, H.-U., Bamberg, K., Angelin, B., Hyötyläinen, T., Orešič, M., and Bäckhed, F. (2013). Gut microbiota regulates bile acid metabolism by reducing the levels of tauro-beta-muricholic acid, a naturally occurring FXR antagonist. *Cell Metab.* *17*, 225–235.
- Schinner, S., Barthel, A., Dellas, C., Grzeskowiak, R., Sharma, S.K., Oetjen, E., Blume, R., and Knepel, W. (2005). Protein kinase B activity is sufficient to mimic the effect of insulin on glucagon gene transcription. *J. Biol. Chem.* *280*, 7369–7376.
- Schirra, J., Houck, P., Wank, U., Arnold, R., Göke, B., and Katschinski, M. (2000). Effects of glucagon-like peptide-1(7-36)amide on antro-pyloro-duodenal motility in the interdigestive state and with duodenal lipid perfusion in humans. *Gut* *46*, 622–631.
- Schirra, J., Wank, U., Arnold, R., Göke, B., and Katschinski, M. (2002). Effects of glucagon-like peptide-1(7-36)amide on motility and sensation of the proximal stomach in humans. *Gut* *50*, 341–348.
- Schrader, H., Menge, B.A., Breuer, T.G.K., Ritter, P.R., Uhl, W., Schmidt, W.E., Holst, J.J., and Meier, J.J. (2009). Impaired glucose-induced glucagon suppression after partial pancreatectomy. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *94*, 2857–2863.
- Schwarz, M., Russell, D.W., Dietschy, J.M., and Turley, S.D. (1998). Marked reduction in bile acid synthesis in cholesterol 7 α -hydroxylase-deficient mice does not lead to diminished tissue cholesterol turnover or to hypercholesterolemia. *J. Lipid Res.* *39*, 1833–1843.
- Sekar, R., and Chow, B.K.C. (2014). Secretin receptor-knockout mice are resistant to high-fat diet-induced obesity and exhibit impaired intestinal lipid absorption. *FASEB J.* *28*, 3494–3505.
- Seol, W., Choi, H.S., and Moore, D.D. (1995). Isolation of proteins that interact specifically with the retinoid X receptor: two novel orphan receptors. *Mol. Endocrinol.* *9*, 72–85.
- Shang, Q., Saumoy, M., Holst, J.J., Salen, G., and Xu, G. (2010). Colesevelam improves insulin resistance in a diet-induced obesity (F-DIO) rat model by increasing the release of GLP-1. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* *298*, G419–G424.
- Shen, H., Zhang, Y., Ding, H., Wang, X., Chen, L., Jiang, H., and Shen, X. (2008). Farnesoid X receptor induces GLUT4 expression through FXR response element in the GLUT4 promoter. *Cell. Physiol. Biochem.* *22*, 1–14.
- Sillakivi, T., Suumann, J., Kirsimägi, U., and Peetsalu, A. (2013). Plasma levels of gastric biomarkers in patients after bariatric surgery: biomarkers after bariatric surgery. *Hepatogastroenterology* *60*, 2129–2132.
- Sinal, C.J., Tohkin, M., Miyata, M., Ward, J.M., Lambert, G., and Gonzalez, F.J. (2000). Targeted disruption of the nuclear receptor FXR/BAR impairs bile acid and lipid homeostasis. *Cell* *102*, 731–744.
- Sjölund, K., Sandén, G., Håkanson, R., and Sundler, F. (1983). Endocrine cells in human intestine: an immunocytochemical study. *Gastroenterology* *85*, 1120–1130.
- Skoglund, G., Hussain, M.A., and Holz, G.G. (2000). Glucagon-like peptide 1 stimulates insulin gene promoter activity by protein kinase A-independent activation of the rat insulin I gene cAMP response element. *Diabetes* *49*, 1156–1164.
- Sladek, F.M. (2011). What are nuclear receptor ligands? *Mol. Cell. Endocrinol.* *334*, 3–13.
- Smith, J.P., Stanley, W.B., Verderame, M.F., and Zagon, I.S. (2004). The functional significance of the cholecystokinin-C (CCK-C) receptor in human pancreatic cancer. *Pancreas* *29*, 271–277.
- Song, W.-J., Seshadri, M., Ashraf, U., Mdluli, T., Mondal, P., Keil, M., Azevedo, M., Kirschner, L.S., Stratakis, C.A., and Hussain, M.A. (2011). Snapin mediates incretin action and augments glucose-dependent insulin secretion. *Cell Metab.* *13*, 308–319.
- Staels, B., and Kuipers, F. (2007). Bile acid sequestrants and the treatment of type 2 diabetes mellitus. *Drugs* *67*, 1383–1392.
- Staudinger, J.L., Goodwin, B., Jones, S.A., Hawkins-Brown, D., MacKenzie, K.I., LaTour, A., Liu, Y., Klaassen, C.D., Brown, K.K., Reinhard, J., et al. (2001). The nuclear receptor PXR is a lithocholic acid sensor that protects against liver toxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *98*, 3369–3374.

- Steinert, R.E., Gerspach, A.C., Gutmann, H., Asarian, L., Drewe, J., and Beglinger, C. (2011). The functional involvement of gut-expressed sweet taste receptors in glucose-stimulated secretion of glucagon-like peptide-1 (GLP-1) and peptide YY (PYY). *Clin Nutr* 30, 524–532.
- Stock, S., Leichner, P., Wong, A.C.K., Ghatei, M.A., Kieffer, T.J., Bloom, S.R., and Chanoine, J.-P. (2005). Ghrelin, peptide YY, glucose-dependent insulinotropic polypeptide, and hunger responses to a mixed meal in anorexic, obese, and control female adolescents. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 90, 2161–2168.
- Suarez-Pinzon, W.L., Yan, Y., Power, R., Brand, S.J., and Rabinovitch, A. (2005). Combination therapy with epidermal growth factor and gastrin increases beta-cell mass and reverses hyperglycemia in diabetic NOD mice. *Diabetes* 54, 2596–2601.
- Suissa, Y., Magenheim, J., Stolovich-Rain, M., Hija, A., Collombat, P., Mansouri, A., Susse, L., Sosa-Pineda, B., McCracken, K., Wells, J.M., et al. (2013). Gastrin: a distinct fate of neurogenin3 positive progenitor cells in the embryonic pancreas. *PLoS ONE* 8, e70397.
- Suzuki, K., Jayasena, C.N., and Bloom, S.R. (2012). Obesity and appetite control. *Exp Diabetes Res* 2012, 824305.
- Szayna, M., Doyle, M.E., Betkey, J.A., Holloway, H.W., Spencer, R.G., Greig, N.H., and Egan, J.M. (2000). Exendin-4 decelerates food intake, weight gain, and fat deposition in Zucker rats. *Endocrinology* 141, 1936–1941.
- Talchai, C., Xuan, S., Kitamura, T., DePinho, R.A., and Accili, D. (2012). Generation of functional insulin-producing cells in the gut by Foxo1 ablation. *Nat. Genet.* 44, 406–412, S1.
- Tang-Christensen, M., Larsen, P.J., Göke, R., Fink-Jensen, A., Jessop, D.S., Møller, M., and Sheikh, S.P. (1996). Central administration of GLP-1-(7-36) amide inhibits food and water intake in rats. *Am. J. Physiol.* 271, R848–R856.
- Taniguchi, T., Chen, J., and Cooper, A.D. (1994). Regulation of cholesterol 7 alpha-hydroxylase gene expression in Hep-G2 cells. Effect of serum, bile salts, and coordinate and noncoordinate regulation with other sterol-responsive genes. *J. Biol. Chem.* 269, 10071–10078.
- Thomas, A.M., Hart, S.N., Li, G., Lu, H., Fang, Y., Fang, J., Zhong, X.-B., and Guo, G.L. (2013). Hepatocyte nuclear factor 4 alpha and farnesoid X receptor co-regulates gene transcription in mouse livers on a genome-wide scale. *Pharm. Res.* 30, 2188–2198.
- Thomas, C., Gioiello, A., Noriega, L., Strehle, A., Oury, J., Rizzo, G., Macchiarulo, A., Yamamoto, H., Matakaki, C., Pruzanski, M., et al. (2009). TGR5-mediated bile acid sensing controls glucose homeostasis. *Cell Metab.* 10, 167–177.
- Thorens, B., Porret, A., Bühler, L., Deng, S.P., Morel, P., and Widmann, C. (1993). Cloning and functional expression of the human islet GLP-1 receptor. Demonstration that exendin-4 is an agonist and exendin-(9-39) an antagonist of the receptor. *Diabetes* 42, 1678–1682.
- Toft-Nielsen, M.B., Madsbad, S., and Holst, J.J. (2001). Determinants of the effectiveness of glucagon-like peptide-1 in type 2 diabetes. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 86, 3853–3860.
- 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.
- Toth, P.P. (2015). Overview of saxagliptin efficacy and safety in patients with type 2 diabetes and cardiovascular disease or risk factors for cardiovascular disease. *Vasc Health Risk Manag* 11, 9–23.
- Turton, M.D., O’Shea, D., Gunn, I., Beak, S.A., Edwards, C.M., Meeran, K., Choi, S.J., Taylor, G.M., Heath, M.M., Lambert, P.D., et al. (1996). A role for glucagon-like peptide-1 in the central regulation of feeding. *Nature* 379, 69–72.
- Twisk, J., Hoekman, M.F., Mager, W.H., Moorman, A.F., de Boer, P.A., Scheja, L., Princen, H.M., and Gebhardt, R. (1995). Heterogeneous expression of cholesterol 7 alpha-hydroxylase and sterol 27-hydroxylase genes in the rat liver lobulus. *J. Clin. Invest.* 95, 1235–1243.
- Urizar, N.L., Liverman, A.B., Dodds, D.T., Silva, F.V., Ordentlich, P., Yan, Y., Gonzalez, F.J., Heyman, R.A., Mangelsdorf, D.J., and Moore, D.D. (2002). A natural product that lowers cholesterol as an antagonist ligand for

FXR. *Science* 296, 1703–1706.

Ussher, J.R., Baggio, L.L., Campbell, J.E., Mulvihill, E.E., Kim, M., Kabir, M.G., Cao, X., Baranek, B.M., Stoffers, D.A., Seeley, R.J., et al. (2014). Inactivation of the cardiomyocyte glucagon-like peptide-1 receptor (GLP-1R) unmasks cardiomyocyte-independent GLP-1R-mediated cardioprotection. *Mol Metab* 3, 507–517.

Vahl, T.P., Tauchi, M., Durler, T.S., Elfers, E.E., Fernandes, T.M., Bitner, R.D., Ellis, K.S., Woods, S.C., Seeley, R.J., Herman, J.P., et al. (2007). Glucagon-like peptide-1 (GLP-1) receptors expressed on nerve terminals in the portal vein mediate the effects of endogenous GLP-1 on glucose tolerance in rats. *Endocrinology* 148, 4965–4973.

Vallim, T.Q. de A., and Edwards, P.A. (2009). Bile acids have the gall to function as hormones. *Cell Metab.* 10, 162–164.

Vassileva, G., Golovko, A., Markowitz, L., Abbondanzo, S.J., Zeng, M., Yang, S., Hoos, L., Tetzloff, G., Levitan, D., Murgolo, N.J., et al. (2006). Targeted deletion of Gpbar1 protects mice from cholesterol gallstone formation. *Biochem. J.* 398, 423–430.

Vilsbøll, T., Krarup, T., Madsbad, S., and Holst, J.J. (2002). Defective amplification of the late phase insulin response to glucose by GIP in obese Type II diabetic patients. *Diabetologia* 45, 1111–1119.

Vilsbøll, T., Krarup, T., Sonne, J., Madsbad, S., Vølund, A., Juul, A.G., and Holst, J.J. (2003). Incretin secretion in relation to meal size and body weight in healthy subjects and people with type 1 and type 2 diabetes mellitus. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 88, 2706–2713.

Vrang, N., Larsen, P.J., Jensen, P.B., Lykkegaard, K., Artmann, A., Larsen, L.K., and Tang-Christensen, M. (2008). Upregulation of the brainstem preproglucagon system in the obese Zucker rat. *Brain Res.* 1187, 116–124.

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.

Walther, D.J., Peter, J.-U., Bashammakh, S., Hörtnagl, H., Voits, M., Fink, H., and Bader, M. (2003). Synthesis of serotonin by a second tryptophan hydroxylase isoform. *Science* 299, 76.

Wang, M., and Drucker, D.J. (1995). The LIM domain homeobox gene *isl-1* is a positive regulator of islet cell-specific proglucagon gene transcription. *J. Biol. Chem.* 270, 12646–12652.

Wang, J., Cortina, G., Wu, S.V., Tran, R., Cho, J.-H., Tsai, M.-J., Bailey, T.J., Jamrich, M., Ament, M.E., Treem, W.R., et al. (2006a). Mutant neurogenin-3 in congenital malabsorptive diarrhea. *N. Engl. J. Med.* 355, 270–280.

Wang, W., Birch, N.P., and Beinfeld, M.C. (1998). Prohormone convertase 1 (PC1) when expressed with pro cholecystokinin (pro CCK) in L cells performs three endoproteolytic cleavages which are observed in rat brain and in CCK-expressing endocrine cells in culture, including the production of glycine and arginine extended CCK8. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 248, 538–541.

Wang, Y., Jones, P.J.H., Woollett, L.A., Buckley, D.D., Yao, L., Granholm, N.A., Tolley, E.A., and Heubi, J.E. (2006b). Effects of chenodeoxycholic acid and deoxycholic acid on cholesterol absorption and metabolism in humans. *Transl Res* 148, 37–45.

Watanabe, M., Houten, S.M., Matak, C., Christoffolete, M.A., Kim, B.W., Sato, H., Messaddeq, N., Harney, J.W., Ezaki, O., Kodama, T., et al. (2006). Bile acids induce energy expenditure by promoting intracellular thyroid hormone activation. *Nature* 439, 484–489.

Watanabe, M., Horai, Y., Houten, S.M., Morimoto, K., Sugizaki, T., Arita, E., Matak, C., Sato, H., Tanigawara, Y., Schoonjans, K., et al. (2011). Lowering bile acid pool size with a synthetic farnesoid X receptor (FXR) agonist induces obesity and diabetes through reduced energy expenditure. *J. Biol. Chem.* 286, 26913–26920.

Wells, J.E., Williams, K.B., Whitehead, T.R., Heuman, D.M., and Hylemon, P.B. (2003). Development and application of a polymerase chain reaction assay for the detection and enumeration of bile acid 7 α -dehydroxylating bacteria in human feces. *Clin. Chim. Acta* 331, 127–134.

Wettergren, A., Wøjdemann, M., Meisner, S., Stadil, F., and Holst, J.J. (1997). The inhibitory effect of glucagon-like peptide-1 (GLP-1) 7-36 amide on gastric acid secretion in humans depends on an intact vagal innervation.

Gut 40, 597–601.

Wettergren, A., Wøjdemann, M., and Holst, J.J. (1998). Glucagon-like peptide-1 inhibits gastropancreatic function by inhibiting central parasympathetic outflow. *Am. J. Physiol.* 275, G984–G992.

White, J.W., and Saunders, G.F. (1986). Structure of the human glucagon gene. *Nucleic Acids Res.* 14, 4719–4730.

Wichmann, A., Allahyar, A., Greiner, T.U., Plovier, H., Lundén, G.Ö., Larsson, T., Drucker, D.J., Delzenne, N.M., Cani, P.D., and Bäckhed, F. (2013). Microbial modulation of energy availability in the colon regulates intestinal transit. *Cell Host Microbe* 14, 582–590.

Wickremesekera, K., Miller, G., Naotunne, T.D., Knowles, G., and Stubbs, R.S. (2005). Loss of insulin resistance after Roux-en-Y gastric bypass surgery: a time course study. *Obes Surg* 15, 474–481.

Wierup, N., Björkqvist, M., Weström, B., Pierzynowski, S., Sundler, F., and Sjölund, K. (2007). Ghrelin and motilin are cosecreted from a prominent endocrine cell population in the small intestine. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 92, 3573–3581.

Wishart, J.M., Horowitz, M., Morris, H.A., Jones, K.L., and Nauck, M.A. (1998). Relation between gastric emptying of glucose and plasma concentrations of glucagon-like peptide-1. *Peptides* 19, 1049–1053.

Wu, Y.-J., Guo, X., Li, C.-J., Li, D.-Q., Zhang, J., Yang, Y., Kong, Y., Guo, H., Liu, D.-M., and Chen, L.-M. (2015). Dipeptidyl peptidase-4 inhibitor, vildagliptin, inhibits pancreatic beta cell apoptosis in association with its effects suppressing endoplasmic reticulum stress in db/db mice. *Metab. Clin. Exp.* 64, 226–235.

Xie, W., Radominska-Pandya, A., Shi, Y., Simon, C.M., Nelson, M.C., Ong, E.S., Waxman, D.J., and Evans, R.M. (2001). An essential role for nuclear receptors SXR/PXR in detoxification of cholestatic bile acids. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98, 3375–3380.

Yadav, V.K., Ryu, J.-H., Suda, N., Tanaka, K.F., Gingrich, J.A., Schütz, G., Glorieux, F.H., Chiang, C.Y., Zajac, J.D., Insogna, K.L., et al. (2008). Lrp5 controls bone formation by inhibiting serotonin synthesis in the duodenum. *Cell* 135, 825–837.

Yadav, V.K., Balaji, S., Suresh, P.S., Liu, X.S., Lu, X., Li, Z., Guo, X.E., Mann, J.J., Balapure, A.K., Gershon, M.D., et al. (2010). Pharmacological inhibition of gut-derived serotonin synthesis is a potential bone anabolic treatment for osteoporosis. *Nat. Med.* 16, 308–312.

Ye, D.Z., and Kaestner, K.H. (2009). Foxa1 and Foxa2 control the differentiation of goblet and enteroendocrine L- and D-cells in mice. *Gastroenterology* 137, 2052–2062.

Yi, F., Brubaker, P.L., and Jin, T. (2005). TCF-4 mediates cell type-specific regulation of proglucagon gene expression by beta-catenin and glycogen synthase kinase-3beta. *J. Biol. Chem.* 280, 1457–1464.

Yi, F., Sun, J., Lim, G.E., Fantus, I.G., Brubaker, P.L., and Jin, T. (2008). Cross talk between the insulin and Wnt signaling pathways: evidence from intestinal endocrine L cells. *Endocrinology* 149, 2341–2351.

Yip, R.G., and Wolfe, M.M. (2000). GIP biology and fat metabolism. *Life Sci.* 66, 91–103.

Yoon, H.-G., Chan, D.W., Huang, Z.-Q., Li, J., Fondell, J.D., Qin, J., and Wong, J. (2003). Purification and functional characterization of the human N-CoR complex: the roles of HDAC3, TBL1 and TBLR1. *EMBO J.* 22, 1336–1346.

Yu, C., Wang, F., Kan, M., Jin, C., Jones, R.B., Weinstein, M., Deng, C.X., and McKeethan, W.L. (2000). Elevated cholesterol metabolism and bile acid synthesis in mice lacking membrane tyrosine kinase receptor FGFR4. *J. Biol. Chem.* 275, 15482–15489.

Yu, J., Lo, J.-L., Huang, L., Zhao, A., Metzger, E., Adams, A., Meinke, P.T., Wright, S.D., and Cui, J. (2002). Lithocholic acid decreases expression of bile salt export pump through farnesoid X receptor antagonist activity. *J. Biol. Chem.* 277, 31441–31447.

Zambrowicz, B., Freiman, J., Brown, P.M., Frazier, K.S., Turnage, A., Bronner, J., Ruff, D., Shadoan, M., Banks, P., Mseeh, F., et al. (2012). LX4211, a dual SGLT1/SGLT2 inhibitor, improved glycemic control in patients with type 2 diabetes in a randomized, placebo-controlled trial. *Clin. Pharmacol. Ther.* 92, 158–169.

- Zander, M., Madsbad, S., Madsen, J.L., and Holst, J.J. (2002). Effect of 6-week course of glucagon-like peptide 1 on glycaemic control, insulin sensitivity, and beta-cell function in type 2 diabetes: a parallel-group study. *Lancet* 359, 824–830.
- Zhang, J., Kalkum, M., Chait, B.T., and Roeder, R.G. (2002). The N-CoR-HDAC3 nuclear receptor corepressor complex inhibits the JNK pathway through the integral subunit GPS2. *Mol. Cell* 9, 611–623.
- Zhang, Y., Lee, F.Y., Barrera, G., Lee, H., Vales, C., Gonzalez, F.J., Willson, T.M., and Edwards, P.A. (2006). Activation of the nuclear receptor FXR improves hyperglycemia and hyperlipidemia in diabetic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 1006–1011.
- Zhang, Y., Yin, L., Anderson, J., Ma, H., Gonzalez, F.J., Willson, T.M., and Edwards, P.A. (2010). Identification of novel pathways that control farnesoid X receptor-mediated hypocholesterolemia. *J. Biol. Chem.* 285, 3035–3043.
- Zheng, Y., and Sarr, M.G. (2012). Translocation of transfected GLUT2 to the apical membrane in rat intestinal IEC-6 cells. *Dig. Dis. Sci.* 57, 1203–1212.
- Zhou, J., Martin, R.J., Tulley, R.T., Raggio, A.M., McCutcheon, K.L., Shen, L., Danna, S.C., Tripathy, S., Hegsted, M., and Keenan, M.J. (2008). Dietary resistant starch upregulates total GLP-1 and PYY in a sustained day-long manner through fermentation in rodents. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 295, E1160–E1166.

**Rôle du récepteur nucléaire FXR
dans la régulation de la production de GLP-1 :
nouvelle cible thérapeutique dans le traitement du diabète de type 2 ?**

L'homéostasie énergétique ou 'balance énergétique' est l'équilibre qui s'établit chez l'Homme entre la prise quotidienne de nutriments et leur oxydation pour ne produire que la quantité énergétique nécessaire. Parmi les signaux émis pour maintenir cette balance, on retrouve des hormones entéroendocrines sécrétées après un repas par des cellules intestinales, les cellules entéroendocrines. Parmi ces cellules, les **cellules de type L** sont d'importances majeures de par leur capacité à sécréter l'**incrétine GLP-1** (Glucagon Like Peptide-1) après un repas et ainsi **potentialiser la sécrétion d'insuline en réponse au glucose**. La prise d'un repas s'accompagne également de la libération d'**acides biliaires**, molécules détergentes des lipides alimentaires, mais aussi molécules de signalisation dans l'intestin et le foie notamment *via* le récepteur nucléaire **FXR** (Farnesoid X Receptor).

Au cours de ma thèse je me suis intéressé à l'**intestin** pour son rôle de **régulateur de l'homéostasie énergétique** dans un contexte physiologique ou physiopathologique d'**obésité** *via* sa capacité à sécréter l'incrétine GLP-1 en réponse au glucose. J'ai étudié plus particulièrement l'interférence entre la voie des acides biliaires par FXR et la production et la sécrétion de GLP-1 en réponse au glucose.

L'utilisation de lignées cellulaires murines, de biopsies intestinales murines ainsi que des expérimentation *in vivo* m'a permis de montrer que FXR est exprimé dans les cellules L de souris. De plus, son activation chez la souris s'accompagne d'une diminution de la production et de la sécrétion de GLP-1 en réponse au glucose *via* une diminution de la glycolyse. Dans des biopsies intestinales provenant de patients normoglycémiques, l'activation de FXR diminue l'expression du proglucagon. Chez la souris, l'inactivation de FXR, quant à elle, augmente la synthèse du proglucagon, l'ARNm de GLP-1, et la sécrétion de GLP-1 en réponse au glucose. Cette inactivation de FXR s'accompagne également d'un shift dans le microbiote intestinal. Enfin, l'inactivation de FXR par une résine séquestrante des acides biliaires et l'inactivation de FXR dans 2 modèles murins d'obésité améliorent la glycémie *via* la voie du GLP-1. FXR *via* sa capacité à réguler GLP-1 par les cellules L en réponse au glucose est donc un régulateur majeur de l'homéostasie énergétique et pourrait être une cible thérapeutique d'intérêt pour soigner les patients diabétiques.

**Role of the nuclear receptor FXR
on the regulation of GLP-1 production by L-cells: a new therapeutic target for type 2 diabetes?**

Originally identified as dietary lipid detergents, bile acids (BA) are now recognized as signaling molecules which bind to the transmembrane receptor TGR5 and the nuclear receptor FXR (Farnesoid X Receptor). Upon binding to TGR5 at the surface of **enteroendocrine L cells**, bile acids (**BA**) promote the secretion of the **incretin GLP-1** which **potentiates the glucose-induced insulin secretion** by pancreatic beta-cells. **FXR** is a ligand-activated nuclear receptor highly expressed in the liver and in the distal intestine. **FXR controls BA, lipid and glucose metabolism.**

Whether FXR is expressed, functional in intestinal enteroendocrine L cells and in which extent its activation affects GLP-1 production are not yet reported. Encouraging data were obtained during my M2 training course. The aim of my thesis was thus to assess whether FXR in enteroendocrine L cells could participate to the control of the deregulation of glucose homeostasis and in which extent FXR in L cells could be a promising therapeutic target on type 2 diabetes.

The use of murine L cell line and intestine from mice treated with a FXR agonist allow us to conclude that **FXR activation decreases glucose-induced proglucagon mRNA and GLP-1 levels** by a negative interference with the glycolysis pathway. Such a result was also obtained on human intestinal biopsies from normoglycemic patients treated with a FXR agonist. Moreover, FXR-deficient mice have an increased proglucagon mRNA levels and GLP-1 secretion in response to glucose is enhanced. Furthermore, *Fxr*^{-/-} mice display a strong shift in gut microbiota. Finally, in high fat diet-induced obese mice, FXR inactivation improves glucose profile through GLP-1. In *ob/ob* mice, a genetically induced mice model, intestinal FXR inactivation with an anionic bile acid resin improves glycemia by a FXR-dependant GLP-1 mediated pathway. Taken together, these results suggest that intestinal FXR inactivation could be a promising therapeutic target to fight against type 2 diabetes through its capacity to enhance GLP-1 pathway.

A bréviations

Entre parenthèses : alias du gène cité

A bréviations

Entre parenthèses : alias du gène cité

A bréviations

Entre parenthèses : alias du gène cité

AMPc: Adénosine monophosphate cyclique
ASBT: Apical Sodium Bile Salt Transporter
ATP: Adénosine triphosphate
BSEP: Bile salt export pump
BSH: Bile salt hydrolase
CA: Acide cholique
CCK: Cholecystokinin
CDCA: Acide chénodéoxycholique
ChORE: Elément de réponse aux carbohydrates
ChREBP: Carbohydrate Responsive Element Binding Protein (MlxIPL)
CRE: Elément de réponse à l'AMPc
CREBP: cAMP responsive element binding protein
DAG: Diacylglycérol
DCA: Acide déoxycholique
Dio-2: Déiodinase-2
DPP-4: Dipeptidyl Peptidase-4
DT2: Diabète de type 2
EPAC2: Exchange Protein Directly Activated by cAMP 2
FACS: Fluorescence-activated cell sorting
FFAR2/3: Free fatty acid receptor 2 (GPR43) / 3 (GPR41)
FGF15/19: Fibroblast Growth Factor 15/19
FGFR4: Fibroblast Growth Factor receptor 4
FRIC: Cellules intestinales de foetus de rat
Fru-1,6-biP: Fructose-1,6-biPhosphate
Fru-2,6-biP: Fructose-2,6-biPhosphate
FXR: Farnesoid X Receptor
FXRE: Elément de réponse à FXR
GFP: Green Fluorescent Protein
GIP: Glucose-dependent Inhibitory Polypeptide
Glc-6-P: Glucose-6-phosphate
GLP-1: Glucagon Like Peptide-1

AMPc: Adénosine monophosphate cyclique
ASBT: Apical Sodium Bile Salt Transporter
ATP: Adénosine triphosphate
BSEP: Bile salt export pump
BSH: Bile salt hydrolase
CA: Acide cholique
CCK: Cholecystokinin
CDCA: Acide chénodéoxycholique
ChORE: Elément de réponse aux carbohydrates
ChREBP: Carbohydrate Responsive Element Binding Protein (MlxIPL)
CRE: Elément de réponse à l'AMPc
CREBP: cAMP responsive element binding protein
DAG: Diacylglycérol
DCA: Acide déoxycholique
Dio-2: Déiodinase-2
DPP-4: Dipeptidyl Peptidase-4
DT2: Diabète de type 2
EPAC2: Exchange Protein Directly Activated by cAMP 2
FACS: Fluorescence-activated cell sorting
FFAR2/3: Free fatty acid receptor 2 (GPR43) / 3 (GPR41)
FGF15/19: Fibroblast Growth Factor 15/19
FGFR4: Fibroblast Growth Factor receptor 4
FRIC: Cellules intestinales de foetus de rat
Fru-1,6-biP: Fructose-1,6-biPhosphate
Fru-2,6-biP: Fructose-2,6-biPhosphate
FXR: Farnesoid X Receptor
FXRE: Elément de réponse à FXR
GFP: Green Fluorescent Protein
GIP: Glucose-dependent Inhibitory Polypeptide
Glc-6-P: Glucose-6-phosphate
GLP-1: Glucagon Like Peptide-1

AMPc: Adénosine monophosphate cyclique
ASBT: Apical Sodium Bile Salt Transporter
ATP: Adénosine triphosphate
BSEP: Bile salt export pump
BSH: Bile salt hydrolase
CA: Acide cholique
CCK: Cholecystokinin
CDCA: Acide chénodéoxycholique
ChORE: Elément de réponse aux carbohydrates
ChREBP: Carbohydrate Responsive Element Binding Protein (MlxIPL)
CRE: Elément de réponse à l'AMPc
CREBP: cAMP responsive element binding protein
DAG: Diacylglycérol
DCA: Acide déoxycholique
Dio-2: Déiodinase-2
DPP-4: Dipeptidyl Peptidase-4
DT2: Diabète de type 2
EPAC2: Exchange Protein Directly Activated by cAMP 2
FACS: Fluorescence-activated cell sorting
FFAR2/3: Free fatty acid receptor 2 (GPR43) / 3 (GPR41)
FGF15/19: Fibroblast Growth Factor 15/19
FGFR4: Fibroblast Growth Factor receptor 4
FRIC: Cellules intestinales de foetus de rat
Fru-1,6-biP: Fructose-1,6-biPhosphate
Fru-2,6-biP: Fructose-2,6-biPhosphate
FXR: Farnesoid X Receptor
FXRE: Elément de réponse à FXR
GFP: Green Fluorescent Protein
GIP: Glucose-dependent Inhibitory Polypeptide
Glc-6-P: Glucose-6-phosphate
GLP-1: Glucagon Like Peptide-1

GLP-2: Glucagon Like Peptide-2	GLP-2: Glucagon Like Peptide-2	GLP-2: Glucagon Like Peptide-2
GLUT: Glucose transporter	GLUT: Glucose transporter	GLUT: Glucose transporter
GHRH: Growth Hormone Secretagogue Receptor	GHRH: Growth Hormone Secretagogue Receptor	GHRH: Growth Hormone Secretagogue Receptor
HbA1C: Hémoglobine glyquée	HbA1C: Hémoglobine glyquée	HbA1C: Hémoglobine glyquée
HDAC3: Histone deacetylase 3	HDAC3: Histone deacetylase 3	HDAC3: Histone deacetylase 3
HDL: Lipoprotéine de haute densité	HDL: Lipoprotéine de haute densité	HDL: Lipoprotéine de haute densité
HOMA index: Homeostatic model assessment index	HOMA index: Homeostatic model assessment index	HOMA index: Homeostatic model assessment index
IBABP: Ileal bile acid binding protein (FABP6)	IBABP: Ileal bile acid binding protein (FABP6)	IBABP: Ileal bile acid binding protein (FABP6)
IBMX: 3-isobutyl-1-methylxanthine	IBMX: 3-isobutyl-1-methylxanthine	IBMX: 3-isobutyl-1-methylxanthine
iDPP-4: Inhibiteur de DPP-4	iDPP-4: Inhibiteur de DPP-4	iDPP-4: Inhibiteur de DPP-4
IEC: Cellules intestinales épithéliales	IEC: Cellules intestinales épithéliales	IEC: Cellules intestinales épithéliales
IP3: Inositol-tri-phosphate	IP3: Inositol-tri-phosphate	IP3: Inositol-tri-phosphate
LCA: Acide lithocholique	LCA: Acide lithocholique	LCA: Acide lithocholique
LDL: Lipoprotéine de faible densité	LDL: Lipoprotéine de faible densité	LDL: Lipoprotéine de faible densité
LGR5: leucine-rich repeat containing G protein-coupled receptor 5	LGR5: leucine-rich repeat containing G protein-coupled receptor 5	LGR5: leucine-rich repeat containing G protein-coupled receptor 5
LRH-1: Liver nuclear receptor homolog-1	LRH-1: Liver nuclear receptor homolog-1	LRH-1: Liver nuclear receptor homolog-1
LRP5: low density lipoprotein receptor-related protein 5	LRP5: low density lipoprotein receptor-related protein 5	LRP5: low density lipoprotein receptor-related protein 5
NASH: Stéatose hépatique non alcoolique	NASH: Stéatose hépatique non alcoolique	NASH: Stéatose hépatique non alcoolique
NCoR: Nuclear receptor co-repressor	NCoR: Nuclear receptor co-repressor	NCoR: Nuclear receptor co-repressor
NGN3: Neurogénine 3	NGN3: Neurogénine 3	NGN3: Neurogénine 3
NPY: Neuropeptide Tyrosine	NPY: Neuropeptide Tyrosine	NPY: Neuropeptide Tyrosine
NTCP: Sodium/taurocholate cotransporting polypeptide	NTCP: Sodium/taurocholate cotransporting polypeptide	NTCP: Sodium/taurocholate cotransporting polypeptide
OST α/β : Organic solute transporter α/β	OST α/β : Organic solute transporter α/β	OST α/β : Organic solute transporter α/β
PC1/3: Prohormone Convertase 1/3	PC1/3: Prohormone Convertase 1/3	PC1/3: Prohormone Convertase 1/3
PC2: Prohormone Convertase 2	PC2: Prohormone Convertase 2	PC2: Prohormone Convertase 2
PKA: Protéine kinase A	PKA: Protéine kinase A	PKA: Protéine kinase A
PLC: Phospholipase C	PLC: Phospholipase C	PLC: Phospholipase C
PPAR: Peroxisome proliferator-activated receptor	PPAR: Peroxisome proliferator-activated receptor	PPAR: Peroxisome proliferator-activated receptor
PYY: Peptide Tyrosine-Tyrosine	PYY: Peptide Tyrosine-Tyrosine	PYY: Peptide Tyrosine-Tyrosine
SERT: Serotonin transport protein	SERT: Serotonin transport protein	SERT: Serotonin transport protein
SGLT: Sodium-glucose transporter	SGLT: Sodium-glucose transporter	SGLT: Sodium-glucose transporter
SHP2: Src-homology tyrosine phosphatase 2	SHP2: Src-homology tyrosine phosphatase 2	SHP2: Src-homology tyrosine phosphatase 2
SMRT: Silencing mediator for retinoid and thyroid hormone receptors	SMRT: Silencing mediator for retinoid and thyroid hormone receptors	SMRT: Silencing mediator for retinoid and thyroid hormone receptors
SR-BI: Scavenger receptor-Type B class I	SR-BI: Scavenger receptor-Type B class I	SR-BI: Scavenger receptor-Type B class I
T3: 3,5,3'-tri-iodothyronine	T3: 3,5,3'-tri-iodothyronine	T3: 3,5,3'-tri-iodothyronine
T4: Thyroxine	T4: Thyroxine	T4: Thyroxine
T β MCA: Acide tauro- β -muricholique	T β MCA: Acide tauro- β -muricholique	T β MCA: Acide tauro- β -muricholique
TGR5: Takeda G-coupled receptor 5	TGR5: Takeda G-coupled receptor 5	TGR5: Takeda G-coupled receptor 5
UDCA: Acide ursodéoxycholique	UDCA: Acide ursodéoxycholique	UDCA: Acide ursodéoxycholique
Xyl-5-P: Xylulose-5-phosphate	Xyl-5-P: Xylulose-5-phosphate	Xyl-5-P: Xylulose-5-phosphate
Y2R: Récepteur tyrosine-tyrosine	Y2R: Récepteur tyrosine-tyrosine	Y2R: Récepteur tyrosine-tyrosine