



HAL
open science

**Les acides biliaries et la régulation de l'homéostasie
métabolique: rôle du récepteur Farnesoid X Receptor
(FXR) dans la cellule bêta-pancréatique: variation du
pool des acides biliaries et chirurgie bariatrique
Roux-en-Y Gastric Bypass**

Valeria Spinelli

► **To cite this version:**

Valeria Spinelli. Les acides biliaries et la régulation de l'homéostasie métabolique: rôle du récepteur Farnesoid X Receptor (FXR) dans la cellule bêta-pancréatique: variation du pool des acides biliaries et chirurgie bariatrique Roux-en-Y Gastric Bypass. Médecine humaine et pathologie. Université du Droit et de la Santé - Lille II, 2015. Français. NNT : 2015LIL2S054 . tel-03123329

HAL Id: tel-03123329

<https://theses.hal.science/tel-03123329>

Submitted on 27 Jan 2021

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

Ecole Doctorale Biologie-Santé de Lille

THESE

Pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LILLE 2

Discipline : Physiologie, physiopathologie, biologie systémique médicale

Spécialité: Sciences Biologiques (Pharmacie)

**LES ACIDES BILIAIRES ET LA REGULATION DE L'HOMÉOSTASIE
METABOLIQUE:**

ROLE DU RECEPTEUR NUCLEAIRE FARNESOID X RECEPTOR (FXR) DANS LA
CELLULE BETA-PANCREATIQUE

VARIATION DU POOL DES ACIDES BILIAIRES ET CHIRURGIE BARIATRIQUE
ROUX-EN-Y GASTRIC BYPASS

Présentée et soutenue publiquement le 17 Décembre 2015

Valeria SPINELLI

Sous la direction du Pr. Anne MUHR-TAILLEUX

JURY

Pr. Bart STAELS : Président

Pr. Bertrand CARIOU : Rapporteur

Dr. Gilles MITHIEUX : Rapporteur

PR. Anne MUHR-TAILLEUX : Examineur

*If anything is worth doing,
do it with all of your heart
Buddha*

Remerciements

Je tiens ici à remercier Monsieur le Professeur Bart Staels qui m'a accueillie au sein de son laboratoire et m'a donné l'opportunité de préparer ma thèse de doctorat. Je vous remercie pour votre exemple professionnel de rigueur et d'excellence scientifique, pour les discussions toujours très stimulantes, pour m'avoir montré et appris ce que être chercheur signifie, l'art du raisonnement et de la communication scientifique. Vous avez toute mon estime et reconnaissance.

Je remercie Monsieur le Professeur Bertrand Cariou et Monsieur le Docteur Gilles Mithieu d'avoir accepté de juger ce travail et d'en être les rapporteurs. Je vous prie de trouver ici le témoignage de ma profonde reconnaissance.

Anne, je tiens à vous exprimer ma plus profonde gratitude pour avoir été ma directrice de thèse. Cela a été un plaisir de travailler avec vous. Ma bataille a été notre bataille, pour le meilleur ou pour le pire. Merci pour la richesse scientifique et humaine avec lesquelles vous m'avez guidé pendant ces années. Merci pour avoir toujours eu confiance en moi, pour votre patience et pour votre disponibilité à n'importe quelle heure de n'importe quel jour. Merci pour le dynamisme et l'optimisme qui m'ont appris à chercher le côté positif dans les choses et aussi à le relativiser, quand c'était nécessaire. Vos conseils scientifiques et votre gentillesse m'ont permis de mener à bien ce projet de thèse dans des conditions que j'ai particulièrement appréciées.

Merci à toutes les personnes du laboratoire, de IPL et de J&K, chacune précieuse à sa façon, pour avoir créé une ambiance unique et avoir rendu le travail encore plus agréable. Merci à tous ceux qui ont trouvé du temps à me consacrer pour des discussions, des conseils scientifiques, ou pour m'expliquer des techniques, dans les premiers temps. Merci à tous ceux qui ont eu un sourire ou un mot gentil, merci pour le bonheur et la rigolade d'autres. Merci aussi à ceux qui ont mis à l'épreuve ma patience et ma diplomatie, pour m'avoir fait découvrir des qualités que je ne me connaissais pas. Mon passage dans votre équipe me laissera de très bons souvenirs. Trouvez ici l'expression de mon plus grand respect et de ma profonde sympathie.

Merci aux anciens post-docs pour les discussions stimulantes et les conseils précieux, en particulier merci à Janne et Mehdi.

Merci aux anciens thésards, qui m'ont passé le relais et qui m'ont beaucoup appris dans la première partie de ma thèse, merci pour votre sympathie et pour votre soutien. Savoir que nous étions dans la même galère a créé un esprit de solidarité et d'amitié que je n'oublierai pas. Merci à certains d'entre vous pour avoir été partie aussi de ma vie hors-labo, en rendant ces années sur Lille quelque chose de spécial. Merci Sami, Wahiba, Michal, Sarah.

Nabil, merci pour les discussions enrichissantes et les conseils techniques sur les îlots, et pour ta sympathie et ton rire incomparable.

Merci à tous ceux qui m'ont aidée avec les manips ou en me donnant des précieux conseils scientifiques, en particulier merci à Fanny, Kad, Dorothee, Olivier, Alicia, Bruno, Véro, Steve, Jasmine, Mélanie, Isabelle, Anthony, Maheul. Hélène, un gros merci pour ta gentillesse et ta patience en m'aidant dans l'analyse des puces.

Manue, merci pour ton aide irremplaçable avec les manips in vivo, merci pour ta disponibilité, ton intérêt à mon égard et pour ta patience et flexibilité parfois jusqu'à l'extrême.

Emilie, merci pour ton aide avec les manips à l'animalerie et pour ton soutien dans les moments plus durs. Merci pour la rigolade et pour ton aide hors labo. Et oui, oui, j'aime bien tes chèvres!

Olivier, merci pour ton aide inestimable dans et en dehors du labo, merci pour ta disponibilité avec les manips même si demandé à la dernière minute. Et merci pour le thé.

Jonathan, un grand merci pour tes enseignements de MDL, et pour avoir partagé avec moi des heures à congeler dans la pièce, en m'aidant à les faire passer plus vite.

Sandrine et Anais, merci pour votre sympathie, votre gentillesse et votre aide avec la grammaire française. Merci pour votre intérêt à mon égard, surtout dans la dernière période.

Merci pour les bonheurs et pour les discussions aux copains du midi, Laurent, Victoria, Laurent, à Corinne pour sa gentillesse et aux personnes de J&K, Manjula, Arianna, Sarah, Xavier, Salah, François.

Merci aux personnes du secrétariat, Pascal, Marie-Hélène, François, Rosamée, Joelle et Isabelle. Merci pour m'avoir toujours accueillie avec disponibilité et sympathie.

Merci à Oscar pour ton aide dans la dernière période d'expériences, merci pour ta sympathie et pour ton amitié. Ah, et merci pour les Petit écolier.

Merci aux amis hors du labo, en particulier Clément et Kamel.

Grazie ad Alberto per avermi fatto capire che se sono abbastanza forte da superare le difficoltà, posso superare le difficoltà anche in condizioni impossibili..! Scherzi a parte, grazie per avermi sempre rispettata e accondisceso i miei desideri fino al punto di seguirmi in quest'avventura. Grazie per la tua fiducia e soprattutto per il tuo aiuto (sì, un po' a modo tuo) di quest'ultimo infernale periodo.

Grazie a Flami per la collaborazione a distanza e il prezioso aiuto con le figure, sono ancora calde.

Grazie alla cugi per aver reso le mie giornate di sconforto meno pesanti con le foto del bagno.

Grazie a Fede, con te ho condiviso quest'intera avventura da prima ancora che iniziasse. Ne abbiamo attraversate di tutti i colori insieme. Grazie per la tua presenza in questi anni, e per avermi dato prova di come da due persone con caratteri così diversi possa nascere una bella amicizia.

Grazie agli amici lontani, ma che di lontano sono solo fisicamente, quelli che mi hanno accolta puntualmente con gioia a ogni mio ritorno, quelli che mi hanno sostenuta pur non avendo la più pallida idea di cosa stessi facendo nel nord della Francia. Grazie a Giulia, Mengo, Elena, Gianni, Richy, Laura, Angio.

Grazie per avermi fatto sentire che, nonostante la distanza, per me ci siete sempre.

Nonna, Zia Alberta, grazie per avermi fatto sentire la vostra vicinanza in questi anni, e per le ricche ore passate insieme durante i miei ritorni. Siete un dono prezioso.

Mami. Pape. Dedico a Voi il frutto di questo lavoro. Sono sempre riconoscente alla vita per avermi dato Voi come genitori. Grazie per aver creduto in me in qualsiasi condizione e avermi sempre sostenuta con tutti i mezzi possibili, dandomi la possibilità di cercare e di andare sul mio cammino. Spero troverete in queste pagine un segno della mia riconoscenza.

Résumé

Les acides biliaires (ABs) sont des molécules produites dans le foie, stockées dans la vésicule biliaire, sécrétées dans l'intestin et retournant au foie via le cycle entéro-hépatique. Une fraction des ABs échappe à la recaptation par le foie et passe dans la circulation systémique par laquelle ils atteignent les organes périphériques dont le pancréas. Outre leur fonction de faciliter l'absorption intestinale des lipides, les ABs sont des molécules de signalisation qui agissent via des récepteurs, exprimés dans les tissus clés de la régulation du métabolisme, et dont la modulation contribue à réguler l'homéostasie énergétique. Ainsi des variations dans la composition du pool d'ABs peuvent déterminer la modulation du métabolisme via leurs récepteurs.

Le récepteur aux ABs Farnesoid-X-receptor (FXR) est impliqué dans la régulation du métabolisme glucidique, lipidique et des ABs par son action dans le foie, l'intestin, le tissu adipeux et le pancréas. La souris déficiente pour FXR dans le corps entier présente une intolérance au glucose et une insulino-résistance dans le foie et dans les tissus périphériques, alors que dans un contexte d'obésité la déficience de FXR améliore ces paramètres. De plus, FXR est exprimé dans la cellule bêta-pancréatique (β cell) où il régule la synthèse et la sécrétion d'insuline, mais les mécanismes moléculaires n'ont pas été complètement élucidés. Pour comprendre 1) la contribution de FXR- β cell dans le phénotype métabolique de la souris FXRKO-total, et 2) les mécanismes moléculaires de la régulation de l'insuline par FXR dans la β cell, un modèle murin invalidé pour FXR spécifiquement dans la β cell par la stratégie Cre-LoxP a été utilisé. Le développement du modèle a mis en évidence des phénomènes de recombinaison non-spécifiques et j'ai mis au point une stratégie de génotypage permettant de pallier à cette problématique. J'ai testé différents contextes métaboliques permettant de mettre en évidence le phénotype de la souris FXRKO- β cell (régime standard et riche en graisses, conditions de jeûne et re-nourriture, variation circadienne). Par rapport au contrôle, la souris FXRKO- β cell développe une intolérance au glucose et présente des insulinémies plus basses, défauts majorés par un régime riche en graisses. L'analyse transcriptomique globale des îlots a permis d'identifier un ensemble de microRNA fortement dérégulés par l'invalidation de FXR β cell qui pourraient expliquer les dysfonctions de sécrétion d'insuline.

Le RYGB est une chirurgie de l'obésité sévère qui induit des améliorations métaboliques indépendantes de la perte de poids. Les variations quantitatives/qualitatives du pool des ABs après chirurgie pourraient contribuer à ces améliorations métaboliques. Pour étudier cette hypothèse, des modèles précliniques de RYGB ont été développés. Au cours de ma thèse j'ai comparé le pool d'ABs pre et post RYGB entre trois espèces (rat, cochon et Homme; coll. Pr. F. Pattou et Dr. E. Osto) avec l'objectif d'évaluer quel modèle préclinique est le plus approprié pour ces études en termes de caractéristiques du pool d'ABs. Une deuxième étude concerne la recherche des causes et mécanismes sous-jacents à l'augmentation des concentrations en ABs circulants induits par le RYGB. Dans le modèle de minipig (coll. Pr. F. Pattou), l'analyse de la composition des pool d'ABs circulants et d'expression génique dans le foie avant et après RYGB, a permis de montrer que des changements de la fonction hépatique sont - au moins en partie - responsables de l'augmentation dans le pool d'AB qui suit le RYGB.

Au cours de ma thèse j'ai travaillé avec des modèles précliniques (rongeurs, minipig) pour étudier les mécanismes d'action des ABs dans la cellule bêta via leur récepteur FXR, et les mécanismes sous-jacents à leurs changements après RYGB. Un élément émergent des deux études est la nécessité impérative de procéder avec rigueur et transposer avec précaution les résultats obtenus à l'Homme, pour des raisons qui vont des limitations techniques des souches transgéniques aux différences inter-espèces.

Summary

Bile acids and the regulation of metabolic homeostasis: Role of their receptor Farnesoid X Receptor (FXR) in the pancreatic beta cell Variation of bile acid pool after Roux-en-Y Gastric Bypass bariatric surgery

Bile acids (BAs) are molecules produced in the liver, stored in the gallbladder, secreted into the intestine and returning to the liver via the enterohepatic circulation. A fraction of BAs escapes the reuptake by the liver and enters the systemic circulation, by which they reach the peripheral organs including the pancreas. Besides their function in facilitating the intestinal absorption of lipids, BAs are signaling molecules that act through receptors which are expressed in the key tissues of metabolic regulation, and whose modulation contribute to regulate energy homeostasis. Thus, variations in the composition of the BAs pool determine the modulation of metabolism via their receptors. The BA-receptor Farnesoid-X receptor (FXR) is involved in the regulation of glucose, lipid and BA metabolism by its action in the liver, intestine, adipose tissue and pancreas. Whole body FXR deficient (FXRKO) mice are glucose intolerant and insulin resistant in liver and peripheral tissues, whereas in a context of obesity, FXR deficiency rather improves these parameters. Furthermore, FXR is expressed in the pancreatic beta cell (β cell), where it regulates the synthesis and the secretion of insulin, but the molecular mechanisms have not been fully elucidated yet. To understand 1) the contribution of FXR β cell in the metabolic phenotype of the FXRKO mouse, and 2) the molecular mechanisms of the regulation of insulin production by FXR in the β cell, a mouse model invalidated for FXR specifically in the β cell by the Cre-loxP strategy has been used. The development of the model showed nonspecific recombination phenomena, and I developed a genotyping strategy to overcome this problem. To highlight the phenotype of the FXRKO- β cell mouse I tested various metabolic contexts (standard and high fat diet, fasting and refeeding conditions, circadian variations). Compared to control, FXRKO- β cell mice developed glucose intolerance and have lower insulinemia, defects increased by a high fat diet. The global transcriptomic analysis in the islets identified a set of microRNA strongly deregulated by invalidating FXR in the β cell, which could explain the dysfunctions in insulin secretion.

Roux-en-Y Gastric Bypass (RYGB) is a surgery practice employed in the treatment of severe obesity, which induces weight loss independent metabolic improvements. The quantitative/qualitative changes of the BA pool after surgery may contribute to these metabolic improvements. To investigate this hypothesis, some preclinical models of RYGB have been developed. During my thesis I compared the pool of BAs pre and post RYGB among three species (rat, pig and human; Coll. Prof. F. Pattou and Dr. E.Osto) with the aim of assessing which preclinical model is most suitable for these studies in terms of characteristics of the BAs pool. In the second study, I focused on the causes and mechanisms underlying the increased concentrations of circulating BAs induced by RYGB. In the model of minipig (coll. Pr. F. Pattou), the analysis of the plasma BA pool composition and the hepatic gene expression before and after RYGB, allowed to show that changes in the hepatic function are - at least in part - responsible for the increase of the BA pool following RYGB.

Liste des Publications

Articles publiés:

Valeria Spinelli, Céline Martin, Emilie Dorchies, Emmanuelle Vallez, Hélène Dehondt, Mohamed-Sami Trabelsi, Anne Tailleux, Sandrine Caron, Bart Staels. Screening strategy to generate cell specific recombination: a case report with the RIP-Cre mice. *Transgenic Research*, 2015 Jun 20. IF 2014: 2.32

Trabelsi MS, Daoudi M, Prawitt J, Ducastel S, Touche V, Sayin SI, Perino A, Brighton CA, Sebti Y, Kluza J, Briand O, Dehondt H, Vallez E, Dorchies E, Baud G, **Spinelli V**, Hennuyer N, Caron S, Bantubungi K, Caiazzo R, Reimann F, Marchetti P, Lefebvre P, Bäckhed F, Gribble FM, Schoonjans K, Pattou F, Tailleux A, Staels B, Lestavel S. Farnesoid X receptor inhibits glucagon-like peptide-1 production by enteroendocrine L cells. *Nature Communication*. 2015 Jul 2;6:7629. IF 2014: 11.47

Articles en révision:

Valeria Spinelli*, Fanny Lalloyer*, Grégory Baud, Elena Osto, Mostafa Kouach, Mehdi Daoudi, Emmanuelle Vallez, Violeta Raverdy, Jean-François Goossens, Amandine Descat, Thomas A. Lutz, Sophie Lestavel, Bart Staels, François Pattou, Anne Tailleux. Influence of Roux-en-Y gastric bypass on plasma bile acid profiles: a comparative study between rats, pigs and humans. Soumis à *International Journal of Obesity*. *co-auteurs. IF 2014: 5.00

Articles soumis:

Oscar Chávez-Talavera*, Grégory Baud*, **Valeria Spinelli***, Mehdi Daoudi, Mostafa Kouach, Emmanuelle Vallez, Robert Caiazzo, Mohammed Ghunaim, Thomas Hubert, Sophie Lestavel, Anne Tailleux, Bart Staels, François Pattou. Roux-en-Y gastric bypass increases systemic bile acid concentrations by decreasing hepatic bile acid uptake in minipig. Soumis à *Diabetes*, *co-auteurs. IF 2014: 8.09

Valeria Spinelli*, Oscar Chávez-Talavera*, Anne Tailleux, Bart Staels. Metabolic effects of bile acid sequestration. *Current Opinion in Endocrinology and Diabetes*. *co-auteurs. IF 2014: 3.37

Communications

Communications orales:

Valeria Spinelli, Emmanuelle Vallez, Emilie Dorchies, Bart Staels, Anne Tailleux, “Physio-pathological role of the nuclear receptor FXR in the pancreatic β cell: connection between the entero-hepatic axis and the endocrine pancreas via bile acids” Francqui Chair Bart Staels – KU Leuven Campus Kulak Kortrijk, Courtrai, Belgium, 17 Avril 2014

Communications affichées:

Valeria Spinelli, Emmanuelle Vallez, Emilie Dorchies, Bart Staels, Anne Tailleux, “Pathophysiological Role of Nuclear Bile Acid Receptor FXR in the Pancreatic Beta Cell Function”. Spetses Summer School on nuclear receptors in physiology and pathology, Spetses, Grece, 25-30 Août 2013

Valeria Spinelli, Emmanuelle Vallez, Emilie Dorchies, Bart Staels, Anne Tailleux, “Pathophysiological Role of Nuclear Bile Acid Receptor FXR in the Pancreatic Beta Cell Function”. 1^{ère} école thématique EGID, modélisation du diabète, Cap Hornu, 20-22 septembre 2013

Valeria Spinelli, Emmanuelle Vallez, Emilie Dorchies, Bart Staels, Anne Tailleux, “Rôle physiopathologique du récepteur nucléaire FXR dans la cellule bêta-pancréatique: connection entre l’axe entéro-hépatique et le pancréas endocrine via les acides biliaires”. Congrès de la Société Francophone du Diabète, 11-14 mars 2014, Paris

Valeria Spinelli, Céline Martin, Emilie Dorchies, Hélène Dehondt, Mohamed-Sami Trabelsi, Anne Tailleux, Sandrine Caron, Bart Staels, “Pitfalls with Tissue-specific Cre mice: need for a screening strategy to detect non-specific recombination of the floxed alleles. Example of the

RIP-Cre strain". 3rd Symposium EGID (European Genomic Institute for Diabetes), Lille, 02-03 Décembre 2014

Financements

Le financement de cette thèse a été assuré par une Allocation de recherche allouée par le Ministère de la Recherche et de l'Enseignement Supérieur (3 ans). Le financement de la dernière année de thèse a été assuré par la Fondation pour la Recherche Médicale (Grant FDT20140930804) (9 mois) et la Société Francophone du Diabète (6 mois).

Table des matiers

Liste des abréviations	15
AVANT-PROPOS	19
INTRODUCTION.....	25
1. LES ACIDES BILIAIRES, DES MODULATEURS DE L’HOMEOSTASIE METABOLIQUE	27
1.1. Structure et métabolisme des acides biliaires.....	27
1.1.1. Structure des Acides Biliaires	27
1.1.2. Vue d’ensemble du métabolisme des ABs	27
1.1.3. La synthèse des Acides Biliaires	29
1.1.4. Le cycle entero-hépatique des Acides Biliaires.....	33
1.1.5. Le transport des Acides Biliaires dans le cycle entero-hépatique	35
1.2. Les variations physiologiques des acides biliaires	37
1.3. Les récepteurs aux Acides Biliaires	40
1.4. Les variations du pool des acides biliaires dans les altérations pathologiques.....	45
1.5. La modulation du pool des acides biliaires par intervention pharmacologique ou chirurgicale	47
1.5.1. Les séquestrant des ABs.....	47
1.5.2. Les inhibiteurs de l’ASBT.....	49
1.5.3. Roux-and-Y Gastric Bypass	49
1.6. La modulation de l’activité des récepteurs aux Acides Biliaires comme application thérapeutique	50
1.6.1. CDCA.....	51
1.6.2. INT-747	51
1.6.3. L’acide ursodésoxycholique	52
Manuscrit 1: Metabolic effects of bile acid sequestration: impact on cardiovascular risk factors.....	53
2. LE RECEPTEUR NUCLEAIRE FXR.....	66
2.1. Généralités sur les récepteurs nucléaires	66
2.1.1. Classification des récepteurs nucléaires	66
2.1.2. La structure des récepteurs nucléaires	70
2.1.3. Les mécanismes d’activation des récepteurs nucléaires.....	73
2.2. Le Récepteur Nucléaire FXR	76
2.2.1. Découverte et caractéristiques de FXR	76
2.2.2. Les modulateurs de l’activité de FXR.....	78
2.2.3. Les modifications post-traductionnelles de FXR	80
2.3. L’action de FXR sur la régulation métabolique	81
2.3.1. FXR et le métabolisme des acides biliaires	81

2.3.2. FXR et le métabolisme des lipides	85
2.3.1. FXR et le métabolisme du glucose.....	87
2.3.4. Expression et fonction de FXR dans le pancréas endocrine.....	89
2.3.5. Rôle physiopathologique de FXR <i>in vivo</i>	92
3. LE PANCREAS	96
3.1. Le pancréas et sa structure.....	96
3.2. Le développement du pancréas murin.....	98
3.3. Les hormones endocrines pancréatiques	100
3.4. La cellule bêta pancréatique: de la synthèse à la sécrétion de l'insuline.....	101
3.4.1. La découverte et la structure de l'insuline.....	101
3.4.2. La synthèse de l'insuline	104
3.4.3. La sécrétion de l'insuline.....	109
3.5. La régulation du métabolisme du glucose: rythme circadien et pancréas	121
3.5.1. La régulation métabolique.....	121
3.5.2. La régulation circadienne	126
4. L'INVALIDATION CONDITIONNELLE D'UN GENE DANS LA CELLULE BETA PANCREATIQUE	133
4.1. La stratégie Cre-LoxP	133
4.2. Les souches Cre-transgéniques pour le pancréas	134
4.3. Les souches Cre-transgéniques pour la cellule bêta pancréatique.....	135
RESULTATS	139
Rôle physiologique du récepteur nucléaire FXR dans la cellule bêta pancréatique	142
1. Contexte scientifique.....	142
2. Objectifs	143
3. Stratégies expérimentales et résultats.....	143
3.1. Etude du rôle de FXR dans la fonction de la cellule bêta pancréatique et des mécanismes moléculaires associés	143
3.2. Etude de la contribution de FXR dans la cellule bêta pancréatique à la régulation de l'homéostasie métabolique <i>in vivo</i>	148
Manuscrit 2: Screening strategy to generate cell specific recombination: a case report with the RIP-Cre mice.	153
4. Discussion et perspectives.....	202
Influence de la chirurgie bariatrique de type Roux-en-Y gastric bypass sur le cycle entero- hépatique des acides biliaires et leurs concentrations systemiques.....	206
1. Contexte scientifique.....	206
1.1. La technique de Roux-en-Y Gastric Bypass	206
1.2. Les effets métaboliques du Roux-en-Y Gastric Bypass	207
1.3. Les mécanismes à l'origine des effets métaboliques bénéfiques du RYGB	208

2. Partie I	212
2.2. Discussion Partie I.....	213
Manuscrit 3: Influence of Roux-en-Y gastric bypass on plasma bile acid profiles: a comparative study between rats, pigs and humans	213
3. Partie II.....	241
3.1. Contexte.....	241
3.2. Hypothèse.....	241
3.3. Objectif.....	242
3.4. Stratégie expérimentale:	242
3.5 Résultats et Discussion.....	243
Manuscrit 4: Roux-en-Y gastric bypass increases systemic but not portal bile acid concentrations by decreasing hepatic bile acid uptake in minipigs	245
CONCLUSION	263
ANNEXES	267
Annexe 1: isolement d'ARN d'îlot pancréatique par Micro Dissection Laser	269
1. Récupération du pancréas et préparation des coupes à micro-disséquer.....	269
2. La Micro Dissection Laser des îlots pancréatiques	270
3. L'isolement et l'amplification des ARN	271
Annexe 2: Dosage du profil des ABs dans le plasma et dans le pancréas par LC-MS/MS .	274
1) Récupération des échantillons de plasma ou pancréas.....	274
2) Extraction des ABs.....	274
3) Dosage par LC-MS/MS	276
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	279

Liste des abréviations

Les termes anglais sont mis entre guillemets

AB Acides biliaires

ABC « ATP binding cassette »

AC adenylate cyclase

AcétylCoA « acétyl coenzyme A »

Ach acétylcholine

ADN(c) acide désoxyribonucléique
(complémentaire)

AF « activation function »

AGL acides gras libres

Akt « v-akt murine thymoma viral
oncogene homolog 1 »

AMPc adénosine monophosphate cyclique

AMPK « AMP-activated protein kinase »

Apo apolipoprotéine

ARN(m) acide ribonucléique (messenger)

ASBT « Apical Sodium Dependant Bile-
salt Transporter »

ATP adénosine-5'-triphosphate

BAAT « bile acid coenzyme A: amino
acide N-acyltransferase »

BACS « Bile CoA synthetase »

BAS sequestrant des acides biliaires

BDL ligature du canal biliaire

Beta2/NeuroD « neuronal differentiation
1 »

BSEP « Bile-Salt Export Pump »

C4 7 α -hydroxy-cholesten-3-one

CA acide cholique

cAMP adénosine monophosphate
cyclique

CCK cholécystokinine

CD « chow diet »

CDCA acide chénodésoxycholique

CETP « Cholesterol-Ester Transfer
protein »

ChREBP « Carbohydrate Response
Element Binding Protein »

CRE « cAMP Response Element »

CREB « cAMP response Element Binding
Protein »

CYP7A1 cholestérol 7 α -hydroxylase

CYP8B1 stérol 12 α -hydroxylase

DAG diacylglycérol

DBD « DNA binding domain »

DCA acide désoxycholique

Dio2 déiodinase 2

DT1/2 Diabete de type 1/2

ELISA « Enzyme Linked Immunosorbent
Assay »

ER élément de réponse

ERK « extracellular-signal-regulated
kinase »

FAS « Fatty Acid Synthase »

FGF15/19 « fibroblast growth factor
15/19 »

FOXO1 « Forkhead box protein O1 »

FXR « farnesoid X receptor »

FXRE élément de réponse à FXR

GIP « glucose-dependent insulinotropic
peptide »

GK glucokinase
GLP-1 « glucagon-like peptide-1 »
GLUT transporteur au glucose
GPR récepteur couplé à protéine G
GR récepteur des glucocorticoïdes
GSIS sécrétion d'insuline induite par le glucose
GTP Guanosine-5'-triphosphate
HDL « high density lipoprotein »
HDL-C cholestérol associé aux HDL
HFD « high fat diet »
HNF4 α « Hepatocyte nuclear factor 4 α »
I-BABP « Ileal Bile Acid Binding Protein »
IP intra-péritonéale
IP₃ inositol 1,4,5 triphosphate
Jnk c-Jun N-terminal protein kinase
KLF11 « Kruppel-Like Factor 11 »
KO « knock out »
LBD « ligand binding domain »
LCA acide lithocholique
LC-Acyl-coA « Long chain fatty acyl-CoA »
LC-MS/MS chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem
LDL « low density lipoprotein »
LDL-C cholestérol associé aux HDL
lincRNA « long Intergenic Non Coding RNA »
LRH-1 « liver receptor homolog-1 »
MafA « v-maf avian musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog A) »
MAFG « v-Maf Avian Musculoaponeurotic Oncogene Homolog G »
MAPK « Mitogen-activated protein kinases”
MDL micro dissection laser
MDR « Multiple drug resistance pump »
MPT « modification post-traductionnelle »
MRP « Multidrug Resistance-Associated Protein »
MTP « Microsomal Triglyceride Transfer Protein »
NAFLD « non-alcoholic fatty liver disease »
NASH « non-alcoholic steatohepatitis »
Nkx « NK homeobox »
NTCP « Sodium Taurocholate Cotransporting Polypeptide »
OATP « Organic Anion Transporter Polypeptide »
OCA acide obeticholique
OGT « O-linked N-acetylglucosamine transferase »
OST- α/β « Organic Solute Transporter - α/β »
PAX « paired-box »
PC « proprotein convertase »
PCG1 « Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha »
PDX1 « Pancreatic and duodenal homeobox 1 »
PEPCK Phosphoenolpyruvate carboxykinase

PGC-1 α « Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha »
PI3K phosphoinositide 3-kinase
PIP₂ phosphatidyl inositol 4-5 biphosphate
PK protéine kinase
PLC phospholipase C
PPAR α « peroxisome proliferator activated Receptor alpha »
PYY peptide YY
RE récepteur aux estrogènes
RIN « RNA integrity number »
RN récepteur nucléaire
RXR « retinoid X receptor »
RYGB « Roux-en-Y Gastric Bypass »
SHP « small heterodimer partner »
siRNA « short interfering RNA »
SNARE « Soluble NSF Attachment Protein REceptor »
SR-BI « scavenger receptor BI »

SREBP-1c « Sterol Regulatory Binding Protein-1c »
SULT sulfotransférase
TA tissu adipeux
TAB tissu adipeux brun
TG triglycérides
TGR5 « récepteur membranaire aux acides biliaires (M-BAR) »
T α MCA acide tauro- α -muricholique
T β MCA acide tauro- β -muricholique
UDCA acide ursodésoxycholique
UGT glucuronosyltransférase
VAMP « vescicle-associated membrane protein »
VLDL « very low density lipoproteins »
VLDLR récepteur aux VLDLs
VSG « vertical sleeve gastrectomy »
WT « wild type »

AVANT-PROPOS

Avec les processus d'industrialisation et l'essor économique qui ont caractérisé les pays occidentaux pendant les dernières décennies, les habitudes comportementales et alimentaires de l'homme ont changé, avec une augmentation de la sédentarité et de la consommation d'aliments riches en gras et en sucres d'une manière disproportionnée par rapport aux besoins de l'organisme. Ce déséquilibre entre demande d'énergie et quantité de nutriments apportés au quotidien est l'une des causes du syndrome métabolique.

Le syndrome métabolique définit une situation clinique à haut risque cardiovasculaire, qui comprend une série de facteurs de risque et des symptômes qui se produisent simultanément dans l'individu. Ceux-ci sont souvent liés à la vie de la personne (surpoids, sédentarité) ou à des conditions pathologiques préexistantes (predisposition génétique). Selon la définition de l'International Diabetes Federation, on définit un individu affecté par le syndrome métabolique quand il est obèse ($BMI > 30 \text{ Kg/m}^2$) et qu'il présente au moins deux des facteurs suivants : triglycérides élevés ($TG \geq 150 \text{ mg/dL}$), HDL-cholestérol bas ($HDL-C < 40 \text{ mg/dL}$ homme; $< 50 \text{ mg/dL}$ femme), tension artérielle élevée (systolique ≥ 130 ou diastolique $\geq 85 \text{ mm Hg}$), glucose plasmatique à jeun élevé ($\geq 100 \text{ mg/dL}$). Le syndrome métabolique peut conduire à des complications métaboliques (diabète de type 2, DT2), cardiovasculaires (infarctus du myocarde ou accident vasculaire cérébral) et hépatiques (tels que la maladie du foie gras (NAFLD), ou la stéato-hépatite non alcoolique (NASH) et leurs complications en fibrose, cirrhose, et carcinome hépatocellulaire (CHC)).

Il est estimé qu'environ 20-25% de la population mondiale souffre de syndrome métabolique et ces patients sont trois fois plus susceptibles d'avoir un événement cardiovasculaire aigu par rapport aux personnes sans syndrome. De plus, les personnes avec syndrome métabolique ont un risque 5 fois plus grand de développer un DT2 (WHO 2015). En fait, le DT2 est devenu l'un des principales causes de mortalité, principalement par augmentation du risque cardiovasculaire, qui est responsable de ~80% de ces décès. L'ensemble de ces données justifient l'urgence et les efforts de la recherche scientifique pour identifier de nouvelles cibles thérapeutiques et développer un ensemble de médicaments (ou dans l'idéal un médicament) pour traiter cette pathologie.

Parmi les cibles des interventions existantes pour le traitement des dyslipidémies, du DT2 et de leurs complications, les acides biliaires et leurs récepteurs émergent comme cibles thérapeutiques potentielles. La modulation de leur métabolisme dans des conditions d'homéostasie énergétique modifiée peut amener à la correction des altérations et à des effets bénéfiques. C'est le cas par exemple des résines séquestrant les acides biliaires, médicaments approuvés pour le traitement de l'hypercholestérolémie. D'autres éléments ont émergés dans

les dernières années qui mettent en évidence un lien entre les acides biliaires et la régulation du métabolisme énergétique, comme la variation qualitative de la composition du pool d'acides biliaires dans la condition d'insulino-résistance et de diabète, l'augmentation du pool d'ABs plasmatiques associée à l'obésité, l'augmentation des acides biliaires qui suit certaines pratiques de chirurgie bariatrique et qui accompagne leurs améliorations métaboliques, la composition différente du microbiote intestinale (composante active du métabolisme des acides biliaires) dans les différentes conditions pathologiques. Cependant, il est encore difficile de pouvoir conclure sur la causalité de ces associations, leur nature corrélative, les mécanismes impliqués restant encore à être élucidés.

Parmi les hypothèses émises pour expliquer ces altérations, la participation des récepteurs aux acides biliaires, FXR (Farnesoid X Receptor, récepteur nucléaire) et TGR5 (GPBAR1, récepteur membranaire), est une des pistes sur lesquelles les efforts de la recherche sont les plus investis. Ces deux récepteurs sont exprimés dans les tissus clés de la régulation du métabolisme, comme le foie, l'intestin, le pancréas, le tissu adipeux, où leur fonction a été partiellement élucidée par des études d'activation pharmacologique (*in vitro*, *in vivo*) et des études d'inactivation génique sur des modèles de souris knock-out totale ou tissu spécifique. La compréhension de leur mécanisme d'action et de leur rôle dans les différents organes pourrait conduire au développement d'agents pharmacologiques pour le traitement des altérations métaboliques. Ainsi, un agoniste qui module l'action de FXR dans le foie (INT-747) est déjà utilisé dans le traitement de la NASH. Comprendre et expliquer de manière exhaustive leur mécanisme d'action dans l'organisme entier pourrait permettre 1) de concevoir des molécules pour le traitement des composantes et des complications du syndrome métabolique, 2) d'expliquer les corrélations entre "altération du pool d'acides biliaires" et "perturbation métabolique" précédemment mentionnées, ce qui pourrait ouvrir de nouvelles pistes mécanistiques et thérapeutiques.

Dans ce cadre, l'**objectif** de mon travail de thèse se décline en deux points:

1) L'analyse de la fonction de FXR dans la cellule bêta pancréatique, réalisée par:

- a. Une étude d'activation pharmacologique *in vitro* sur une lignée cellulaire bêta pancréatique;
- b. Une étude *in vivo* sur un modèle de souris invalidée pour FXR spécifiquement dans la cellule bêta pancréatique par le système Cre-LoxP, développé et caractérisé au laboratoire au cours de ma thèse, par analyse phénotypique et transcriptomique.

2) L'étude des variations quantitatives et qualitatives des acides biliaries induites par la chirurgie bariatrique, qui comprend deux aspects:

a. Une étude comparative des variations des espèces d'ABs induites par la chirurgie bariatrique dans trois espèces différentes, deux modèles précliniques (minipig et rat) et l'Homme, dans le but d'évaluer le modèle préclinique le plus approprié pour étudier les effets de l'intervention sur le pool des acides biliaries;

b. Une étude visant à déterminer les mécanismes responsables de l'augmentation de la concentration systémique des acides biliaries après RYGB, en utilisant le modèle original du minipig.

Ce manuscrit se compose de 4 parties. La première section présente le contexte scientifique en 4 chapîtres. Le premier chapître est dédié à la description des acides biliaries, à l'état physiologique et dans le contexte pathologique de la maladie métabolique, et leurs voies de signalisation; le deuxième chapître présente le récepteur nucléaire FXR; le troisième chapître porte sur le pancréas, les mécanismes d'insulino-sécrétion et la régulation du métabolisme du glucose; le quatrième chapître fait le point sur les lignées murines transgéniques pour la Cre Recombinase disponibles pour le développement de modèles invalidés spécifiquement dans la cellule bêta pancréatique par stratégie Cre-LoxP.

La section des résultats est présentée en deux parties: une partie concernant l'étude de la fonction de FXR dans la cellule bêta pancréatique, avec les analyses menées sur lignée cellulaire *in vitro*, le développement et la caractérisation métabolique du modèle FXRKO- β cell et les analyse transcriptomiques. La deuxième partie, concernant les études des variations du pool des acides biliaries après chirurgie bariatrique, présente les résultats sous forme d'article, première l'étude de comparaison du profil des acides biliaries inter-espèces, à suivre l'étude des mécanismes responsables de l'augmentation des acides biliaries systémiques.

L'ensemble est suivi par une conclusion générale, suivie par les documents annexes et les references bibliographiques.

INTRODUCTION

1. LES ACIDES BILIAIRES, DES MODULATEURS DE L'HOMÉOSTASIE MÉTABOLIQUE

1.1. Structure et métabolisme des acides biliaires

Les acides biliaires (ABs) constituent une grande famille de molécules amphipatiques à structure stéroïdienne qui ont quatre fonctions principales: 1) faciliter l'absorption intestinale des lipides (premier rôle connu des ABs), 2) éliminer le cholestérol de l'organisme (environ 500 mg de cholestérol sont convertis en ABs chaque jour dans un foie humain adulte), 3) faciliter l'excrétion biliaire des métabolites endogènes et des xénobiotiques, 4) participer au maintien de l'homéostasie énergétique via la modulation tissu-spécifique de leurs récepteurs (rôle le plus récemment découvert des ABs et qui nous intéresse plus particulièrement dans le contexte de notre travail).

1.1.1. Structure des Acides Biliaires

Les ABs sont des molécules dérivées du cholestérol, avec lequel ils ont en commun la structure stéroïdienne et une chaîne latérale de cinq atomes de carbone (à la différence des 8 atomes de carbone du cholestérol) (**Figure 1A**). La diversité des ABs repose sur le nombre et la position des groupes hydroxyles portés par les carbones 6, 7, 12 de la structure stéroïdienne, et par la nature du groupe X sur la chaîne latérale (**Figure 1A-1B**). Dans la structure tridimensionnelle des ABs, la combinaison de ces éléments détermine un côté hydrophobe, dû à la structure stéroïdienne, et un côté hydrophile, dû aux caractéristiques de la chaîne latérale, aux groupes hydroxyle et à leur position sur les deux côtés du plan (**Figure 1C**). En particulier, la chaîne latérale contribue à déterminer le pKa de l'AB et, avec les groupes hydroxyle, à définir la solubilité, le degré d'hydrophobicité de l'AB et, par conséquent, son activité biologique (Russell 2003) (**Figure 1D**).

1.1.2. Vue d'ensemble du métabolisme des ABs

Dans le foie, le cholestérol est converti en ABs primaires par des voies métaboliques complexes. Leur structure varie considérablement entre les différentes espèces de vertébrés. Ainsi, chez l'Homme l'acide cholique (CA) et l'acide chénodéoxycholique (CDCA) sont les ABs primaires (**Figure 2**), tandis que chez les rongeurs les espèces majoritaires sont le CA et l'acide muricholique (α -MCA et β -MCA), dérivé du CDCA. Chez le cochon et chez l'ours, le CDCA est transformé en acide hyocholique (HCA) et acide ursocolique (UCA)

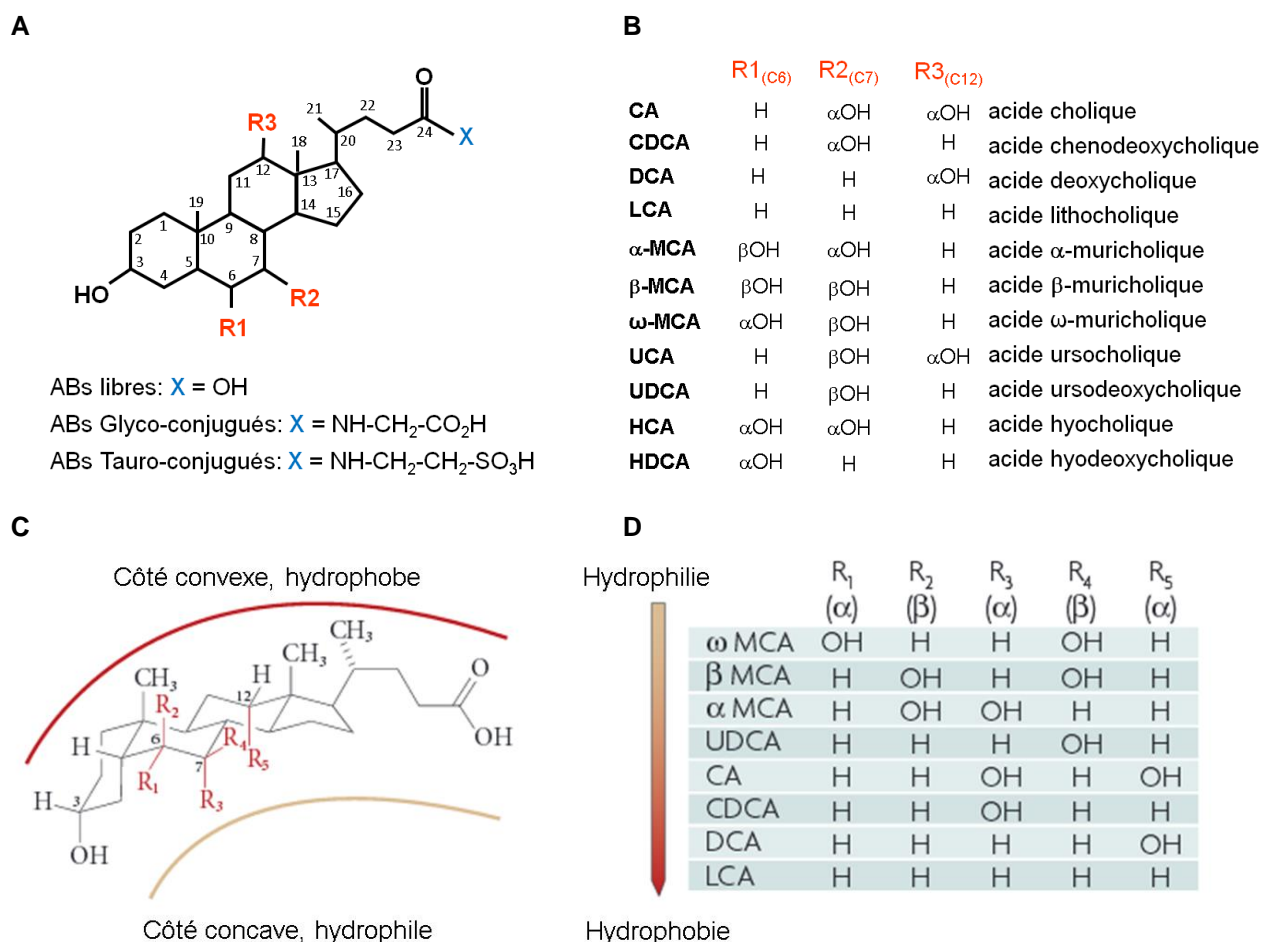


Figure 1. A. Structure commune des ABs, B. Nature et orientation des groupes substituants, C. Structure tridimensionnelle des ABs, D. Classification des ABs selon leur degré d'hydrophobicité (Adaptée de *Thomas 2008*)

respectivement. Toujours dans le foie, ces ABs primaires sont conjugués à la glycine (chez l'humain et chez le cochon), et à la taurine (réaction prédominante chez le rongeur), conduisant à la formation des espèces glyco-conjuguées et tauro-conjuguées: l'acide glycocholique (GCA) et l'acide glycochenodésoxycholique (GCDCA), l'acide taurocholique (TCA) et l'acide taurochenodésoxycholique (TCDCA), plus l'acide tauromuricholique chez le rongeur (TαMCA et TβMCA), l'acide tauroursocholique (TUCA) et l'acide taurohyocholique (THCA) chez le cochon et chez l'ours.

Dans l'intestin, les enzymes du microbiote intestinal convertissent les ABs primaires en ABs secondaires (**Figure 2**). Ceci se traduit par la synthèse de l'acide désoxycholique (DCA) à partir du CA et de l'acide lithocholique (LCA) à partir du CDCA, et de leurs formes conjuguées : l'acide taurodésoxycholique (TDCA), l'acide glycodésoxycholique (GDCA), l'acide tauroolithocholique (TLCA) et l'acide glycolithocholique (GLCA). Chez le rongeur, le TβMCA est converti en TωMCA (Midtvedt 1974; Hylemon et Harder 1998; Ridlon et al. 2006; Swann et al. 2011).

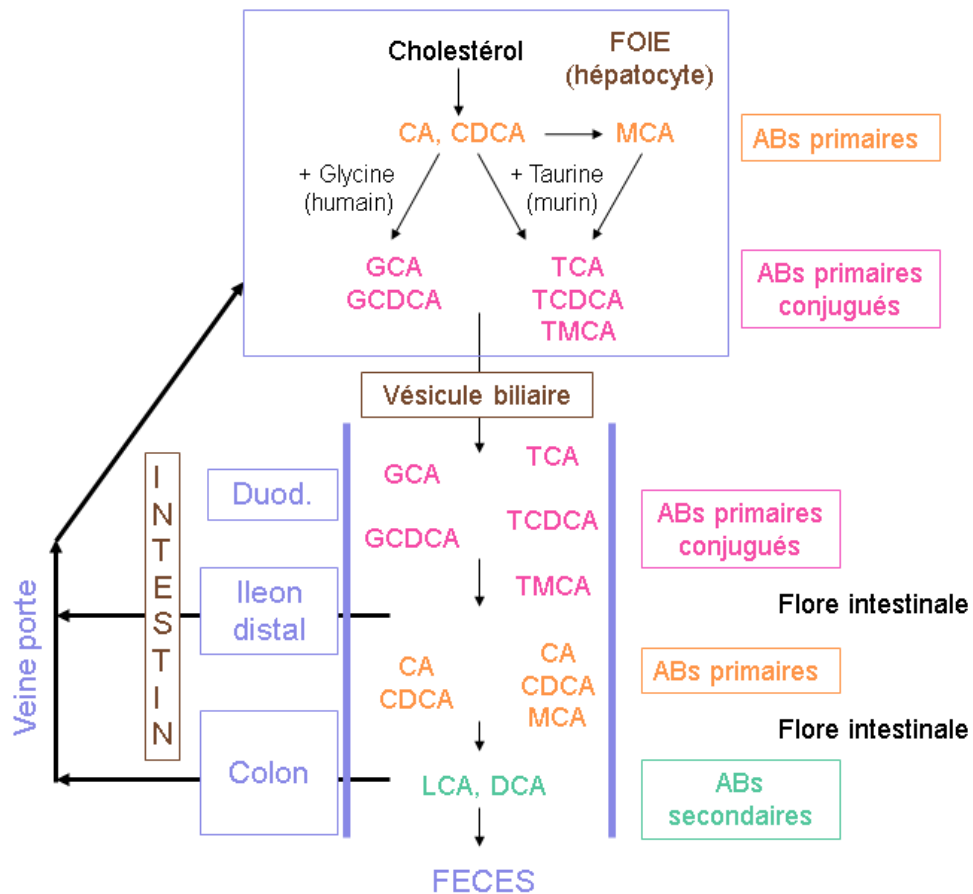


Figure 2. Vue d'ensemble du métabolisme des AB: les AB primaires sont synthétisés dans le foie, conjugués avec la glycine ou la taurine et déversés dans l'intestin, après stockage dans la vésicule biliaire. Les AB primaires sont transformés en AB secondaires dans l'intestin, par les enzymes de la flore intestinale, réabsorbés dans l'intestin et rapportés au foie par la veine porte.

1.1.3. La synthèse des Acides Biliaires

Les AB sont synthétisés dans le foie en plusieurs étapes, chacune catalysée par une enzyme spécifique. Ces enzymes sont localisés dans différents compartiments cellulaires (réticulum endoplasmique, mitochondrie, peroxisome, cytoplasme). Les étapes menant à la synthèse des AB primaires conjugués comprennent:

1. Initiation de la synthèse
2. Modifications de l'anneau stéroïdien
3. Oxydation et raccourcissement de la chaîne latérale
4. Conjugaison de l'acide biliaire avec un acide aminé

L'ensemble des étapes est représenté en **Figure 3** (pag 31) (les principales enzymes sont notées en gras dans le texte).

Il existe deux voies principales pour la synthèse des AB: la **voie classique** (ou neutre) et la **voie alternative** (appelée aussi voie acide pour le caractère acide de certains intermédiaires non présents dans la voie classique). La contribution relative de la voie

alternative pour la synthèse de l'ensemble des ABs dépend de l'espèce considérée. Chez la souris, la voie classique est responsable de la production d'environ 75% des ABs, tandis que la voie alternative est responsable de la synthèse de ~25% des ABs (Schwarz et al. 2001), alors que chez l'Homme la voie alternative semble avoir un rôle marginal (6-10%) à l'état physiologique (Pullinger et al. 2002), même si elle peut devenir prédominante en condition pathologique (Crosignani et al. 2007; Lake et al. 2013).

1. *Initiation de la synthèse:*

- **Voie classique:** le cholestérol est converti en 7α -hydroxycholestérol par l'enzyme **CYP7A1** (cholestérol 7α -hydroxylase), un cytochrome P450 microsomial qui est l'enzyme limitante de la synthèse des ABs.

- **Voie alternative:** elle a comme substrats les oxystérols produits par l'hydroxylation de la chaîne latérale du cholestérol extra-hépatique. L'oxystérol le plus abondant dans le plasma de souris (Li-Hawkins et al. 2000) et humain (Dzeletovic et al. 1995), est le 27-hydroxycholestérol, produit par la **CYP27A1** (cholestérol 27-hydroxylase). Deux autres oxystérols peuvent être formés, le 24-hydroxycholestérol, par l'action de la CYP46A1 (cholestérol 24-hydroxylase), et le 25-hydroxycholestérol, produit par la CH25H (cholestérol 25-hydroxylase).

Plus précisément, la CYP27A1 est un cytochrome P450 mitochondrial exprimé dans plusieurs tissus, et qui dans le foie est impliqué dans la synthèse des ABs à la fois dans la voie alternative et dans la voie classique (voir la suite). La CYP46A1 est un cytochrome P450 microsomial qui contribue pour une faible partie à la synthèse globale des ABs, mais qui est importante pour le turnover du cholestérol dans le cerveau. Elle est exprimée dans les neurones cérébraux et dans une moindre mesure dans le foie chez la souris (Lund et al. 1999). D'autre part, l'enzyme microsomial CH25H n'est pas une P450, mais appartient à une famille d'enzymes métabolisant les lipides. Comme la CYP46A1, cette enzyme joue un rôle sur le métabolisme du cholestérol de manière tissu-spécifique, et chez la souris son ARNm a été identifié surtout dans les poumons (Russell 2003).

Pour être convertis en ABs, les oxystérols ainsi formés doivent être 7α -hydroxylés. Cette étape est catalysée par deux enzymes microsomiales cytochrome P450, la **CYP7B1** (oxystérol 7α -hydroxylase) et la CYP39A1 (oxystérols 7α -hydroxylase II). La CYP7B1 est exprimée à niveaux élevés dans le foie adulte et à plus faibles niveaux dans le rein, le cerveau

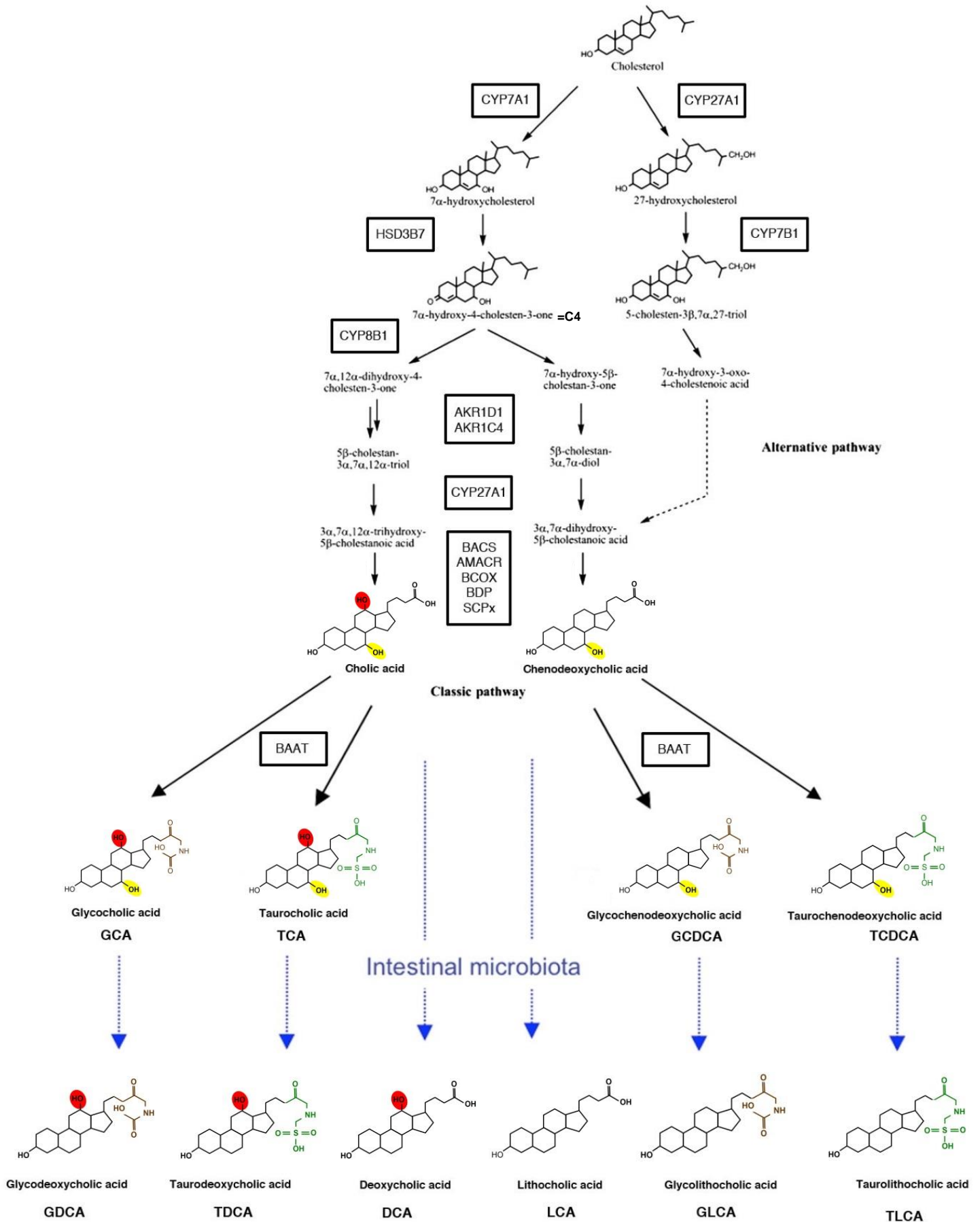


Figure 3. Synthèse des ABs comprenant la voie classique et la voie alternative, les espèces primaires et les espèces secondaires, libres et conjuguées chez l'Homme.

et la prostate. La CYP39A1 est abondamment et constitutivement exprimée dans le foie de souris et humain, ainsi que dans l'épithélium non pigmenté de l'œil (Li-Hawkins et al. 2000; Ikeda et al. 2003). Cette enzyme est impliquée dans la 7 α -hydroxylation du 24-hydroxycholestérol produit dans le cerveau, qui ensuite rejoint le foie après avoir traversé la barrière hémato-encéphalique (Ikeda et al. 2003).

2. Modifications de l'anneau stéroïdien : le 7 α -hydroxycholestérol est converti par la **HSD3B7** (3 β -hydroxy- Δ^5 -C₂₇ stéroïde oxydoréductase microsomale), qui catalyse l'isomérisation de la double liaison en position C4-C5 et l'oxydation du groupe 3 β -hydroxyle dans un groupe 3-oxo, formant le 7 α -hydroxy-cholesten-3-one, ou C4, marqueur de la synthèse des ABs.

Le C4 peut prendre deux voies. Il peut être hydroxylé en position 12 par la **CYP8B1** (cytochrome microsomal P450, stérol 12 α -hydroxylase) et le produit résultant sera au final converti en CA. En absence de 12 α -hydroxylation, le produit sera converti en CDCA. Par conséquent, le niveau de stérol 12 α -hydroxylase dans le foie détermine la quantité relative des deux ABs primaires, CA et CDCA, qui, comme on le verra par la suite, est un indicateur important des altérations pathologiques du métabolisme.

Les étapes suivantes sont catalysées par deux enzymes cytoplasmiques, la **AKR1D1** (Δ^4 -3-oxostéroïde-5 β -réductase) et la **AKR1C4** (la 3 α -hydroxystéroïde déshydrogénase), qui réduisent la double liaison de l'anneau stéroïdien pour obtenir le 5 β -cholestane-3 α ,7 α ,12 α -triol ou le 5 β -cholestane-3 α ,7 α -diol, les précurseurs du CA et du CDCA, respectivement.

3. Oxydation et raccourcissement de la chaîne latérale: Les produits de la modification de l'anneau subissent une oxydation et le raccourcissement de la chaîne latérale. La **CYP27A1** oxyde la chaîne latérale en ajoutant un groupe hydroxyle en position C27, qui est oxydé en aldéhyde, puis en acide carboxylique, pour former l'acide 3 α ,7 α ,12 α -trihydroxy-5 β -cholestanoïque et l'acide 3 α ,7 α -dihydroxy-5 β -cholestanoïque, aussi formé par la voie alternative. A partir de là, les voies alternative et classique sont communes. Ces produits sont activés en esters du coenzyme A par la **BACS** (Bile CoA synthetase) ou par la VLCS (very long-chain acyl-CoA synthetase), localisées dans le réticulum endoplasmique. Les ABs-CoA résultants sont alors transportés dans les peroxysomes, où la chaîne latérale est raccourcie par β -oxydation, par l'action de quatre enzymes (**AMACR**, alpha-méthylacyl-CoA racemase

BCOX, acyl-CoA oxidase 2, **BDP** D-bifunctional protein, **SCPx** Peroxisomal Sterol Carrier Protein X), conduisant à la formation de CA et CDCA.

4. Conjugaison de l'acide biliaire avec un acide aminé: L'étape terminale de la synthèse hépatique des ABs comprend la conjugaison du carbone 24 à un acide aminé. Cette réaction est catalysée par la **BAAT** (bile acid coenzyme A: amino acid N-acyltransferase), qui utilise pour substrat le coenzyme de l'AB (généralisé par les réactions précédentes) et un thioester soit de la glycine soit de la taurine. La BAAT est une enzyme peroxysomiale très efficace, puisque plus de 98% des ABs excrétés par le foie sont conjugués (Solaas et al. 2000).

La conjugaison des ABs augmente leur solubilité. En effet, le groupement sulfate de la taurine et le groupement carboxylique de la glycine sont ionisés à pH physiologique, ce qui, avec la structure plane de l'AB et les groupes hydroxyle sur les anneaux, rend le sel biliaire (la forme ionisée de l'acide biliaire) conjugué très amphipathique.

Les ABs peuvent aussi être transformés par sulfatation par des sulfotransférases, comme la SULT2A1, ou peuvent être conjugués à l'acide glucuronique par la UGT2B4, UDP glucuronosyltransferase. Les ABs qui en dérivent représentent des espèces quantitativement mineures, moins étudiées du fait de leur faible quantité, mais qui pourraient jouer un rôle important. En fait, la conjugaison des ABs avec ces espèces augmente leur hydrophilie, la clairance par voie urinaire et leur élimination lors d'une cholestase.

Les ABs primaires conjugués ainsi produits par le foie sont ensuite transformés dans l'intestin. Les enzymes de la flore bactérienne catalysent des réactions d'hydroxylation, d'oxydation de groupes hydroxyle en C3, C7 et C12 (ce qui conduit aux oxo-acides biliaires, qui peuvent subir la réduction de ces groupes avec formation d'isomères de configuration alpha ou bêta), et de déhydroxylation en $7\alpha/7\beta$, qui quantitativement représente la biotransformation bactérienne la plus importante. La déconjugaison des espèces conjuguées, c'est-à-dire l'hydrolyse du lien N-acylamide entre l'AB et la glycine ou la taurine en position C24, permet la reconversion des espèces conjuguées en espèces libres. L'action combinée de la déconjugation et de la déhydroxylation augmente l'hydrophobicité des ABs, ce qui permet leur absorption passive au niveau de l'épithélium du colon.

1.1.4. Le cycle entero-hépatique des Acides Biliaires

Les ABs, avec le cholestérol, les phospholipides et la bilirubine, représentent les constituants principaux de la bile. Ils sont synthétisés dans les hépatocytes qui entourent la veine hépatique centrolobulaire (Twisk et al. 1995) et sont sécrétés par transport passif ou par

des transporteurs spécifiques selon leurs propriétés chimiques dans les canalicules biliaires, qui se jettent dans le canal biliaire et puis dans la vésicule biliaire. La vésicule biliaire représente le lieu de stockage des ABs, où ils s'accumulent entre les repas. Au pH alcalin de la bile, ils se trouvent à l'état de sel de sodium et de potassium. Après un repas, la bile est relarguée dans le duodénum par le canal cholédoque, sous l'effet de la cholecystokinine (CKK), hormone intestinale sécrétée au moment du repas qui déclenche la contraction de la vésicule biliaire. Dans le lumen duodénal, les micelles de cholestérol, phospholipides et ABs, agissent comme émulsifiants des lipides et des vitamines liposolubles alimentaires, favorisant leur absorption intestinale. Dans l'intestin distal, les ABs sont réabsorbés par diffusion passive ou transport actif au niveau de la portion terminale de l'iléon et/ou du colon, et ils retournent au foie via la veine porte, pour passer à nouveau dans la bile avec les ABs synthétisés *de novo*, et être re-sécrétés dans le lumen intestinale. De cette manière, la majeure partie des ABs cyclent entre l'intestin et le foie, processus appelé *circulation entero-hépatique des acides biliaires* (**Figure 4**). A chaque cycle, environ 95% des ABs sont réabsorbés au niveau intestinal, tandis que 5% sont excrétés dans les fèces. Les ABs ainsi éliminés sont remplacés par une nouvelle synthèse dans le foie. Une faible partie n'est pas recaptée par le foie et passe dans la circulation systémique.

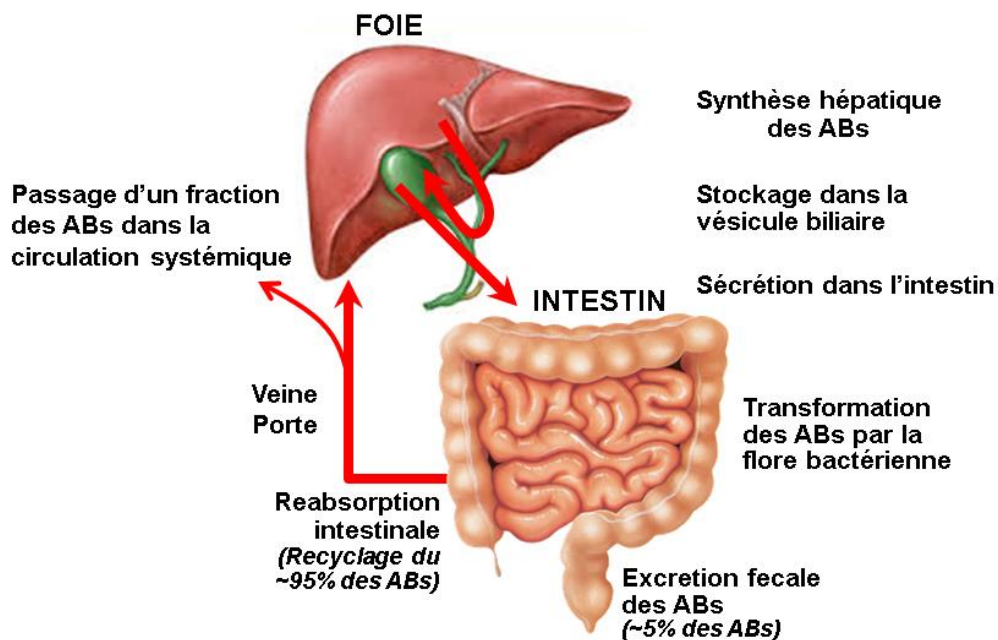


Figure 4. Cycle entero-hépatique des ABs.

Ainsi, la majeure partie des ABs se trouve dans le foie, la vésicule biliaire, l'intestin et la veine porte, et une concentration mineure dans le sang systémique et dans les fèces. La

concentration des ABs dans la bile et la lumière intestinale est de l'ordre du mM, tandis qu'elle est de l'ordre des μ M dans la circulation systémique.

1.1.5. Le transport des Acides Biliaires dans le cycle entero-hépatique

Au niveau hépatique, les ABs hydrophiles, conjugués, ont besoin d'un système de transport actif constitué par un ensemble de pompes et de transporteurs (représenté en **Figure 5**, les transporteurs en gras dans le texte). Ainsi, les ABs tauro- et glyco-conjugués sont excrétés dans les canalicules biliaires par la **BSEP** (*Bile-Salt Export Pump*, ABCB11), tandis que les ABs avec deux charges négatives, comme les ABs-sulfatés ou glucuronidés, conjugués avec une taurine ou glycine, traversent la membrane par la **MRP2** (*Multidrug Resistance-Associated Protein 2*, ABCC2), un membre des transporteurs à ATP Binding Cassette (ABC). D'autres transporteurs à ABC sont impliqués dans l'excrétion des ABs dans les canalicules biliaires, comme la **MDR1A** (*Multidrug Export Pump 1a*, ABCB1A), la **MDR3** (*Multidrug Resistance 3*, ABCB4) et l'**ABCG5/ABCG8**, qui facilitent aussi la sécrétion dans la bile des phospholipides et du cholestérol, pour protéger le système biliaire de l'action détergente des hautes concentrations d'ABs (Meier et Stieger 2002; Trauner et Boyer 2003).

Au niveau intestinal, la diffusion passive des ABs à travers la membrane cellulaire est limitée aux espèces libres, en fonction du gradient de concentration ((Dietschy 1968). Les ABs conjugués sont largement absorbés par l'iléon terminal via le transporteur **ASBT** (*Apical Sodium Dependant Bile-salt Transporter*, SLC10A2) et excrétés du côté basolatéral dans la circulation portale par le transporteur **OST- α/β** (*Organic Solute Transporter*), la **MRP3** (*Multidrug Resistance-Associated Protein 3*, ABCC3) est une forme tronquée d'ASBT (t-ASBT) (Trauner et Boyer 2003; Kullak-ublick et al. 2004; Ballatori et al. 2009). Dans l'entérocyte, le transport des ABs est assuré par **I-BABP** (*Ileal Bile Acid Binding Protein*, FABP6), qui, en favorisant l'excrétion des ABs, protège l'ileocyte des effets toxiques des ABs.

Une fois réabsorbés, la majorité des ABs transportés dans le sang portal sont recapturés par l'hépatocyte *via* les transporteurs localisés sur la membrane sinusoidale, notamment **NTCP** (*Sodium Taurocholate Cotransporting Polypeptide*), spécifique des ABs conjugués, et dans une moindre mesure les transporteurs **OATP1** (*Organic Anion Transporter 1*, SLCO1A1) et **OATP4** (SLCO1B2), qui ont une spécificité multiple pour les ABs conjugués et non conjugués, les stéroïdes, les stéroïdes sulfatés et les cations organiques

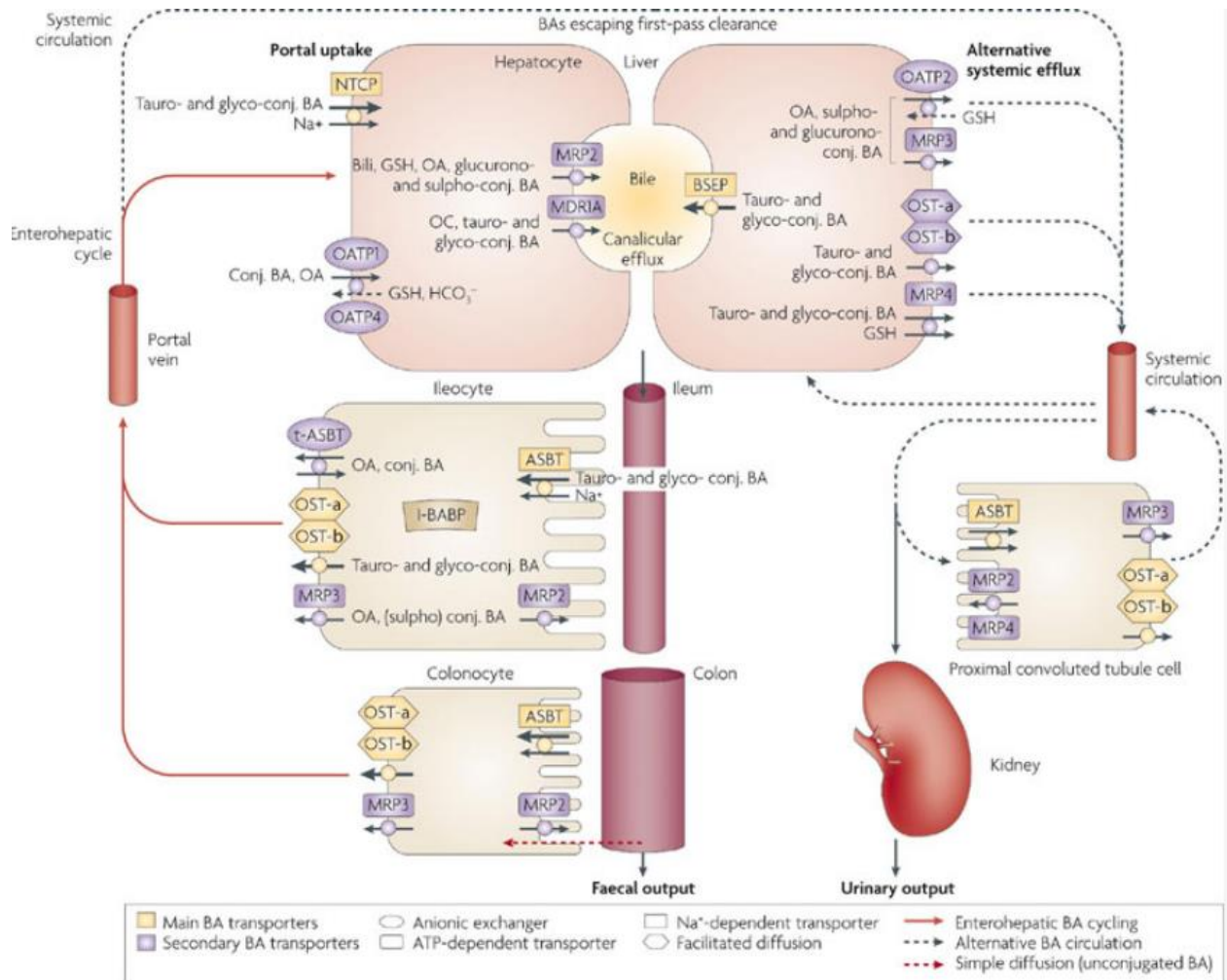


Figure 5. Transport des ABs dans le cycle entéro-hépatique (Thomas 2008)

(Trauner et Boyer 2003). Une petite fraction des ABs échappe à la captation par les hépatocytes et passe dans la circulation systémique (LaRusso et al. 1978; Angelin et al. 1982). Les ABs hépatiques peuvent aussi, de façon marginale à l'état physiologique, être sécrétés directement de l'hépatocyte dans la circulation systémique par **MRP3** (ABCC4), **MRP4** (ABCC4), **OATP2** (*Organic Anion Transport Polypeptide 2*, SLCO1A4) et OST- α / β .

Les ABs systémiques sont filtrées par le glomérule rénal et réabsorbés par les cellules épithéliales des tubules rénaux, via les mêmes transporteurs présents sur l'entérocyte, pour minimiser les pertes urinaires des ABs, qui peuvent toutefois devenir détectables lors d'une cholestase (Zollner et al. 2005).

Une petite partie (5%) des ABs échappe à la réabsorption intestinale et est excrétée dans les fèces.

1.2. Les variations physiologiques des acides biliaires

L'arrivée du chyme dans l'intestin stimule la sécrétion de l'hormone cholécystokinine (CCK) par le duodénum. Plus le chyme est riche en lipides, plus la quantité de CCK sécrétée est élevée. La CCK active les récepteurs CCK-1R sur les cholangiocytes, ce qui induit la contraction de la vésicule biliaire avec excrétion des ABs dans l'intestin, réabsorption par l'intestin et passage d'une fraction dans la circulation systémique. En conséquence, les concentrations circulantes d'ABs sont fortement influencées par la prise des repas. Ainsi, chez le rongeur, espèce nocturne, les concentrations d'ABs circulants sont à leur plus faible niveau au milieu de la phase diurne, pendant leur jeûne physiologique, puis augmentent rapidement dès le début de la phase obscure et aussi au milieu de cette phase, en cohérence avec les deux épisodes majeurs de prise de nourriture pendant la nuit (Zhang et al. 2011). En revanche, chez l'Homme, qui a un rythme diurne, les concentrations d'ABs circulants sont les plus élevées environ deux heures après l'ingestion de la nourriture, avec un pic vers 1 pm et un deuxième pic vers 9 pm (Gälman et al. 2005). Un troisième pic "indépendante du repas" apparaît dans les premières heures du matin (6am-8am), reflet du rythme diurne plutôt que l'effet post-prandial (Steiner et al. 2011). L'analyse du profil d'ABs chez l'Homme a mis en évidence que les pics de 1pm et 9pm correspondent à une élévation des espèces conjuguées (GCA, GUDCA, GCDCA, GDCA, GLCA pour les glyco-conjuguées et TCA, TUDCA, TCDCA, TDCA, TLCA pour les tauro-conjuguées), alors que le pic du matin est dû à une augmentation des espèces libres (CA, UDCA, CDCA, DCA, LCA) (Steiner et al. 2011). Chez l'Homme, la majeure partie de la biosynthèse des ABs a lieu pendant la période post-prandiale (Duane et al. 1983). Il reste à déterminer si l'augmentation des ABs non-conjugués observée le matin correspond une augmentation dans la biosynthèse hépatique ((Duane et al. 1983; Pooler et Duane 1988; Steiner et al. 2011).

La variation circadienne des ABs dans le plasma est accompagnée par un profil aussi circadien de la synthèse des ABs. L'expression de la Cyp7a1 est régulée par des récepteurs nucléaires qui agissent comme senseurs nutritionnels, et par des facteurs de transcription appartenant à la famille de l'horloge (**Figure 6**). Ainsi, FXR (*Farnesoid X Receptor*) réprime la synthèse de la Cyp7a1 par l'induction du corepresseur transcriptionnel SHP (*Small Heterodimer Partner*). PPAR α (*Peroxisome Proliferator-Activated Receptor alpha*) réprime l'expression de la Cyp7a1 en diminuant HNF4 α (*Hepatocyte Nuclear Factor 4 α*), régulateur positif de la transcription de la Cyp7a1 (Crestani et al. 1998; Marrapodi et Chiang 2000; Patel

et al. 2000; Post et al. 2001). LXR α (*Liver X Receptor alpha*) promeut la transcription de la Cyp7a1 en réponse à l'activation par les oxystérols (Lehmann et al. 1997; Gupta et al. 2002). D'autre part, la Cyp7a1 est régulée par les acteurs de l'horloge (**Figure 6**). D'une manière générale, la rythmicité circadienne est conférée par la régulation des gènes de l'horloge. Tous les processus physiologiques qui présentent une rythmicité circadienne sont régulés par l'horloge centrale située dans le noyau supra chiasmatique de l'hypothalamus antérieur. Les signaux externes, tels que le cycle lumière-obscurité, mais aussi alimentation-jeûne, réinitialisent l'horloge centrale, qui se synchronise avec les horloges périphériques (Bass et Takahashi 2010). En conséquence, la régulation de l'horloge dans le cerveau affecte la régulation des horloges dans les tissus clés du métabolisme et influence ainsi le métabolisme énergétique (Froy 2010; Asher et Schibler 2011). Clock et Bmal sont les premiers produits de l'horloge. Leur hétérodimère régule la transcription de Rev-erb α et ROR α en leur conférant une expression circadienne (pour détails sur la régulation du rythme circadien, voir §3.5.2). A la fois Rev-erb α et ROR α régulent le rythme circadien de l'expression de la Cyp7a1 et de la Cyp8b1 (Le Martelot et al. 2009; Pathak et al. 2013). La souris déficiente pour Rev-erb α présente un taux de synthèse des ABs réduit et une diminution de l'expression de la Cyp7a1, alors que l'expression de SHP et E4BP4 (*E4 promoter A-binding protein 4*, un *basic leucine zipper (bZIP) transcription factor* qui a action de répresseur) est augmentée. Il a été suggéré que Rev-erb α induit la Cyp7a1 par l'inhibition de E4BP4 et SHP (Duez et al. 2008; Le Martelot et al. 2009). La Cyp7a1 est également induite par le régulateur positif de l'horloge

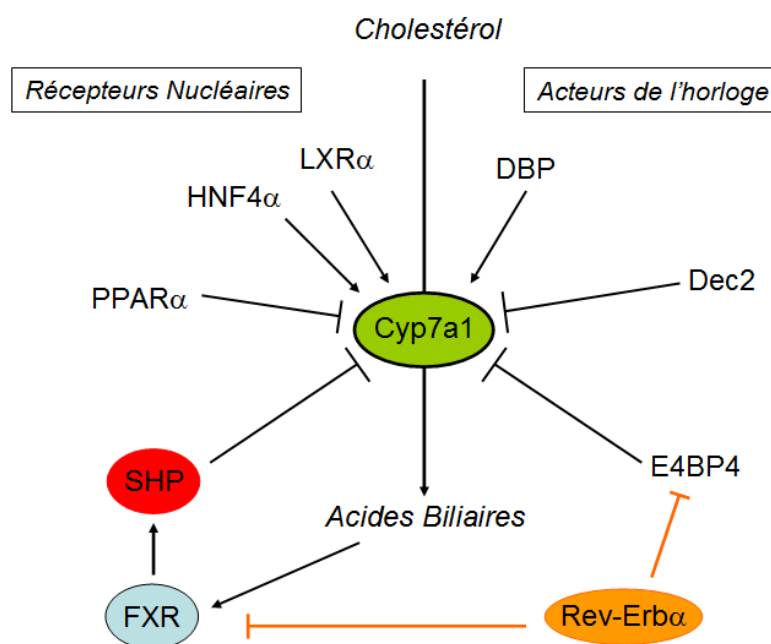


Figure 6. Régulation de l'expression de la Cyp7a1 par les récepteurs nucléaires (FXR en particulier) et les régulateurs du rythme circadien.

DBP (*albumin gene D-site-binding protein*, un *leucine zipper transcription factor*, cible de BMAL) (Lavery et Schibler 1993; Preitner et al. 2002) et d'une façon négative par le régulateur de l'horloge DEC2 (*basic helix-loop-helix (bHLH) transcription factor*) (Noshiro et al. 2004, 2007).

Chez la souris, en cohérence avec son comportement nocturne et avec les profils des ABs circulants, l'expression de la Cyp7a1 hépatique est fortement augmentée avec le déclenchement de la phase obscure, pour descendre graduellement jusqu'à son niveau minimale à 10am (**Figure 7**). Au contraire, et en cohérence avec l'effet répressif de SHP sur la Cyp7a1, l'expression de SHP atteint son maximum à 10am et son minimum à 10pm (Zhang et al. 2011). La répression de la Cyp7a1 est aussi le résultat final d'une cascade de

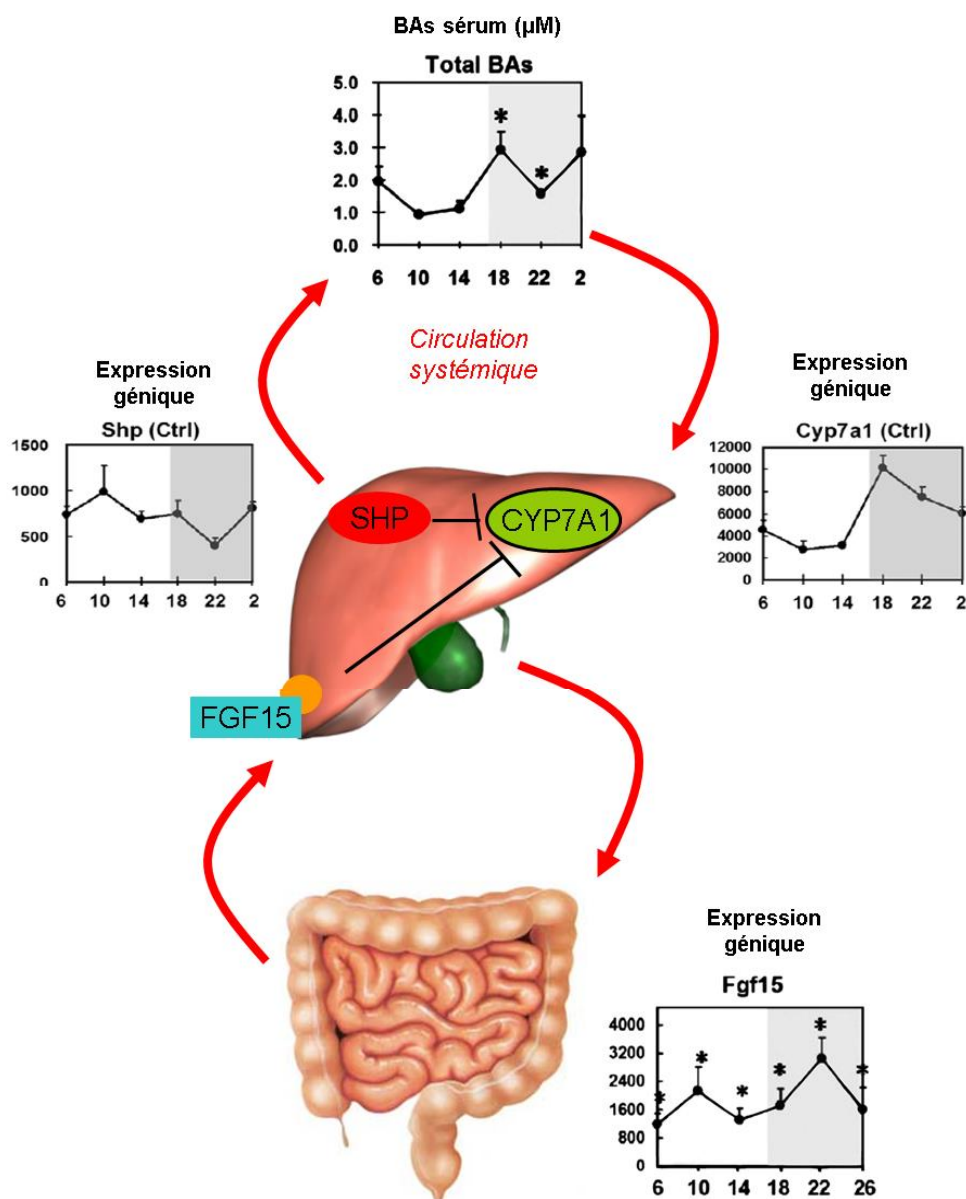


Figure 7. Oscillations de la concentration d'ABs circulants et de l'expression génique de SHP et de Cyp7a1 dans le foie et FGF15 dans l'intestin, chez la souris au cours du nyctémère (Adaptée de Zhang 2011)

signalisation hépatique qui suit l'activation du récepteur membranaire FGFR4 (*Fibroblast Growth Factor Receptor 4*). Ce récepteur est activé par le FGF15/19 (*Fibroblast Growth Factor 15* chez la souris, 19 chez l'Homme), une hormone intestinale induite par l'activation de FXR intestinale (§1.3). L'expression intestinale de FGF15 atteint son maximum à 10pm et son minimum à 10am (Zhang et al. 2011). Toutefois la rythmicité de la synthèse des ABs semble être attribuable à la rythmicité de SHP plus qu'à celle de FGF15. En effet, dans la souris FXRKO-intestin, l'expression de la Cyp7a1 est comparable à celle d'une souris sauvage, même si les niveaux d'expression de FGF15 sont réduits et ne montrent plus de rythmicité circadienne (Stroeve et al. 2010). L'expression du gène de SHP et de FGF15 est régulée par FXR, qui chez la souris présente une rythmicité circadienne dans le tissu adipeux blanc, mais pas dans le foie, où la rythmicité de son activation est due plutôt aux variations dans le flux de ses ligands et par la rythmicité circadienne de ses modifications post-traductionnelles (Yang et al. 2006; Yang 2010).

Chez l'Homme, les taux de FGF19 circulants présentent également un rythme circadien prononcé avec des pics à 90-120 minutes après l'augmentation post-prandiale des ABs (Lundåsen et al. 2006). Le pic de FGF19 précède la chute de la synthèse des ABs. Le jeûne abolit le rythme circadien de FGF19. En effet, le rythme de FGF19 circulant est régulé par le flux d'ABs qui traverse l'intestin. Une relation inverse entre FGF19 sérique à jeun et les niveaux du C4, marqueur de synthèse hépatique des ABs, est compatible avec la fonction de contrôle négatif de FGF19 sur l'expression génique de la Cyp7a1 (Gälman et al. 2011).

1.3. Les récepteurs aux Acides Biliaires

L'association entre altérations du métabolisme et variations du pool d'ABs indique que ceux-ci peuvent avoir un rôle déterminant dans la régulation de l'homéostasie énergétique. Cette vision a été confortée durant les dernières années, avec la découverte et la compréhension de l'action des récepteurs aux ABs dans les différents tissus métaboliques et des effets de leur modulation sur l'homéostasie énergétique.

Les ABs sont les ligands naturels de plusieurs récepteurs, qui peuvent être localisés sur la membrane cellulaire comme le récepteur couplé aux protéines G **TGR5** (GPBAR1), ou être nucléaires, comme le **FXR** (*Farnesoid X Receptor*), le **VDR** (*Vitamin D Receptor*), le **CAR** (*Constitutive Androstane Receptor*) et le **PXR** (*Pregnane X Receptor*). Ces trois derniers sont exprimés principalement dans le foie, où ils régulent le métabolisme et le transport des

xénobiotiques (médicaments et substances toxiques), tandis que FXR et TGR5 sont exprimés dans plusieurs tissus métaboliques (foie, intestin, pancréas, tissu adipeux, cerveau), où ils régulent le métabolisme des ABs, du glucose et des lipides dans un système inter-organes intégré.

Les différentes espèces d'ABs activent FXR et TGR5 avec des puissances différentes. FXR est activé avec des puissances décroissantes par le CDCA>DCA>LCA>CA (Parks et al. 1999), tandis que les ligands de TGR5 l'activent avec une puissance décroissante dans l'ordre LCA>=DCA>CDCA>CA (Kawamata et al. 2003). En conséquence, la composition du pool des ABs, comme sa variation qualitative et/ou quantitative, peuvent affecter l'homéostasie énergétique par modification de l'état d'activation de ces récepteurs et en conséquence la modulation des voies de signalisation associées.

La régulation par les ABs de leur propre métabolisme dans l'espace entéro-hépatique:

Les ABs exercent un contrôle sur la régulation de leur propre métabolisme, régulation jouée principalement par l'activation du récepteur nucléaire FXR (**Figure 8**). Dans le foie et dans l'intestin FXR a un rôle protecteur contre l'excès d'ABs, qui aurait des effets délétères.

→ FXR inhibe la synthèse des ABs:

- Dans le foie, il diminue l'expression de Cyp7a1 et de Cyp8b1 par induction de SHP, qui

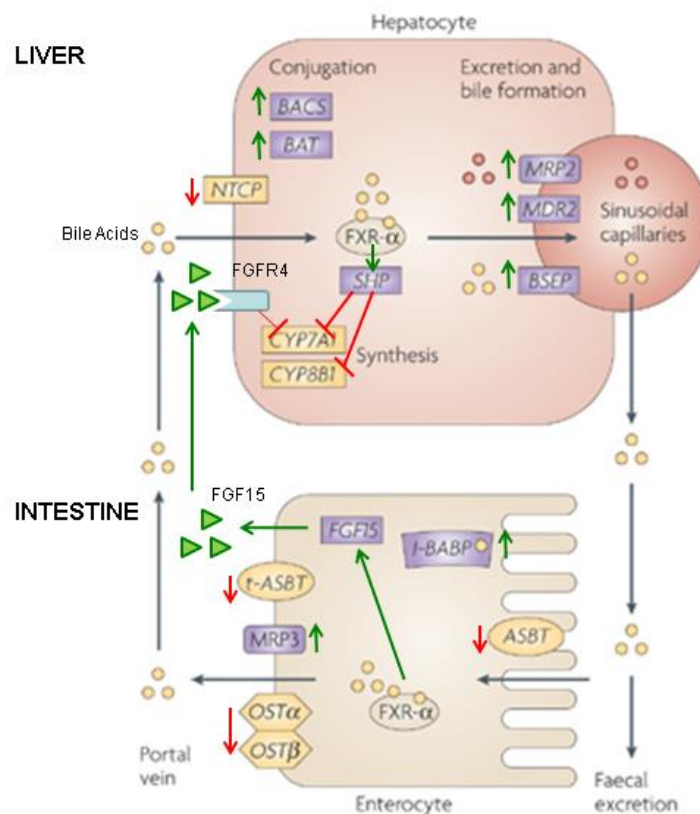


Figure 8. Régulation par FXR des gènes de la synthèse et du transport des ABs dans le cycle entéro-hépatique. (Adaptée de Thomas 2008)

empêche la fixation du facteur de transcription LRH-1 (*liver receptor homolog-1*) sur le promoteur de ces gènes.

- Dans l'intestin, il induit l'expression de FGF15/19, qui réprime la transcription de Cyp7a1 à résultat de la signalisation du récepteur hépatique de FGF15/19, FGFR4.

→ FXR favorise l'excrétion cellulaire des ABs:

- Dans le foie, FXR diminue l'entrée des ABs dans les hépatocytes en diminuant l'expression de Ntcp. Il favorise la conjugaison des ABs par l'induction de l'expression de UGT et BAAT. Il régule la sortie des ABs en augmentant l'expression de MRP2, MDR2 et BSEP;

- Dans l'intestin, il diminue l'entrée et la sortie des ABs par répression de ASBT, t-ASBT, OST α/β , et il favorise le transport intracellulaire par induction de I-BABP (**Figure 8**).

Bien que TGR5 ne régule pas le métabolisme des ABs à proprement parler, ce récepteur est exprimé dans les cellules canalaire et les cholangiocytes, et il participe au remplissage de la vésicule biliaire (Vassileva et al. 2006; Keitel et al. 2009; Li et al. 2011).

La régulation par les ABs de l'homéostasie métabolique dans un système inter-organes intégré:

Les ABs contrôlent l'homéostasie du glucose et des lipides en modulant l'action de FXR et TGR5 dans les tissus clé du métabolisme (**Figure 9**). Au **niveau hépatique**, les ABs régulent la néoglucogenèse (**1**) (Yamagata et al. 2004; Cariou et al. 2005; Stayrook et al. 2005; Ma et al. 2006), la glycolyse (**2**) (Duran-Sandoval et al. 2005; Caron et al. 2013), et la résistance à l'insuline (Cariou et al. 2006; Zhang et al. 2006) grâce à l'action de contrôle que FXR exerce sur ces voies. FXR régule le métabolisme des lipoprotéines (**3**) et la lipogenèse (**4**). Ainsi, les variations du pool des ABs se traduisent aussi par la régulation du métabolisme lipidique.

Les ABs participent au maintien de l'homéostasie glycémique *via* un "**crosstalk**" **intestin-pancréas** : au niveau intestinal, ils régulent la synthèse et la sécrétion de l'incrétine GLP-1 dans les cellules enteroendocrines L, d'une part *via* l'activation de TGR5 (**5**) (Thomas et al. 2008; Harach et al. 2012; Potthoff et al. 2013; Bala et al. 2014), et d'autre part par la modulation de FXR (**6**) (Trabelsi et al. 2015). Plus particulièrement, les ABs lient TGR5 dans la lumière intestinale, ce qui active des voies de signalisation conduisant d'une part à l'activation de la transcription du gène du proglucagon d'une manière AMPc/PKA/CREB dépendante, et d'autre part à l'augmentation de la concentration de Ca²⁺ cytosolique et à la dégranulation des vésicules de GLP-1. Il a été montré récemment que la sécrétion de GLP-1 médiée par TGR5 se fait majoritairement par une activation du récepteur en baso-latéral plutôt

qu'en apical, en suggérant que la stimulation à la sécrétion de GLP-1 pourrait impliquer des mécanismes post-absorptifs (Brighton et al. 2015). En même temps, les ABs atteignent et activent FXR, qui réduit l'expression du gène du proglucagon en interférant avec le facteur de transcription ChREBP (*Carbohydrate Response Element Binding Protein*) sur le promoteur de son gène et inhibe la sécrétion de GLP-1 (par un contrôle négatif sur la glycolyse) (Trabelsi et al. 2015). De plus, au niveau intestinal, FXR module l'absorption du glucose (7) (suggéré par le fait que chez la souris déficiente pour FXR dans l'organisme entier (FXRKO) dans

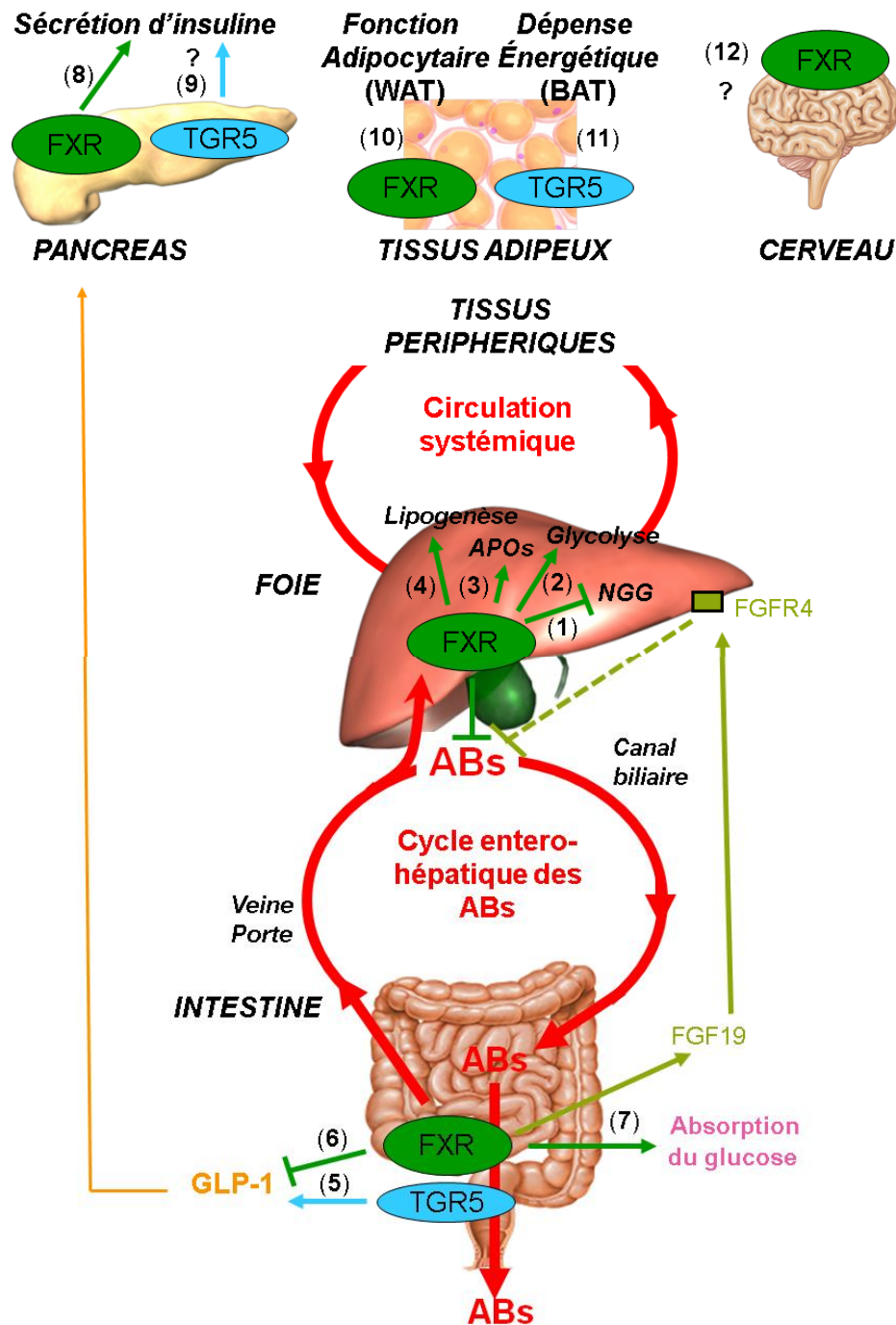


Figure 9. Les ABs, FXR et TGR5, orchestrent la régulation du métabolisme du glucose, des lipides et des ABs dans un système inter-organes intégré.

l'organisme entier présente une diminution de l'absorption intestinale du glucose, (van Dijk et al. 2009). La modulation de la sécrétion de GLP-1 affecte la sécrétion de l'insuline en réponse au glucose, qui s'ajoute aux effets directs des ABs sur l'îlot pancréatique. Ici, l'activation de FXR-bêta pancréatique augmente la production de l'insuline (8) par des effets transcriptionnels sur la synthèse (Popescu et al. 2010; Renga et al. 2010) et par des effets non-transcriptionnels sur la sécrétion (Düfer et al. 2012). De plus, TGR5 dans l'îlot pancréatique a été montré comme activateur de la sécrétion d'insuline (9) (Kumar et al. 2012).

Les ABs sont également médiateurs d'un **“crosstalk” foie-pancréas**. Cette connexion a été montrée par une étude d'inactivation du transporteur au glucose GLUT2 (Slc2a2, solute carrier family 2) dans le foie chez la souris, avec des répercussions sur la composition du pool d'ABs. Ces altérations influencent la capacité de sécrétion d'insuline en réponse au glucose de la souris GLUT2-liver KO, par des mécanismes qui ont été attribués à FXR bêta pancréatique (Seyer et al. 2013). Les ABs qui échappent à la recaptation hépatique lors de leur passage veine porte-foie sont retrouvés dans la circulation systémique, qui les délivre aux organes périphériques, comme les tissus adipeux. Dans le tissu adipeux blanc, les ABs modulent via FXR la fonction adipocytaire (10) (Cariou et al. 2006; Rizzo et al. 2006; Abdelkarim et al. 2010). Dans le tissu adipeux brun, ils participent au maintien de l'homéostasie énergétique via l'action de TGR5 (11), impliqué dans la régulation de la dépense énergétique (Maruyama et al. 2002; Watanabe et al. 2006). Ici, l'activation de TGR5 induit la transcription du gène Dio2 (déiodinase 2), enzyme qui convertit la prohormone thyroxine (T4) inactive en 3,5,3'-tri-iodothyronine active (T3). La T3 active le TR (*thyroid hormone receptor*), qui induit l'expression de gènes qui régulent la bêta-oxydation (PCG-1 α , PGC-1 β) et la thermogénèse (UCP-1, Dio2) dans le tissu adipeux brun, mécanisme montré chez la souris (Watanabe et al. 2006). Chez l'Homme, l'administration de CDCA active le TAB, comme il a été prouvé par PET-Scan, montrant que le concept connu chez la souris est aussi présente chez l'Homme (Broeders et al. 2015). FXR est également exprimé dans le cerveau, où il pourrait jouer un rôle dans le maintien de l'homéostasie énergétique, mais dans cet organe ses fonctions sont encore à élucider (12) (Bookout et al. 2006; Huang et al. 2015).

L'ensemble de ces éléments confirme et fournit une base d'hypothèses pour expliquer comment les altérations dans les concentrations et la composition du pool des ABs ont le potentiel d'affecter plusieurs aspects de l'homéostasie métabolique. Toutefois, il reste à comprendre le lien de cause/conséquence de ces altérations sur la régulation métabolique, ce qui demandera des études plus approfondies sur la mécanistique des événements qui conduisent aux variations métaboliques.

1.4. Les variations du pool des acides biliaires dans les altérations pathologiques

L'homéostasie métabolique est maintenue par l'orchestration des réactions cataboliques/anaboliques rythmées par l'état nutritionnel et par la régulation neuro-hormonale inter-organe. Les ABs participent à cette régulation en tant que ligands pour leurs récepteurs FXR et TGR5, et, simultanément, leur propre métabolisme est également régulé par FXR et par les changements métaboliques. De plus, il existe des associations entre altération du pool des ABs et perturbation du métabolisme, même si la nature de ces corrélations reste encore à élucider. Ainsi, la triade ABs/FXR/TGR5, et l'état métabolique ont une influence réciproque dans un système inter-organe intégré.

Dans la suite je présente des exemples d'association de l'altération du pool des ABs à l'état pathologique, avec le lien à l'activité des récepteurs FXR et TGR5, quand celle-ci est connue.

- Condition d'insulino-résistance: Il a été montré une association entre insulino-résistance (IR) et la variation qualitative du pool des ABs. Cette variation est représentée par un déséquilibre dans le rapport des espèces d'ABs hydroxylés en position C12 (ABs 12 α -hydroxylés : CA, GCA, TCA, DCA, TDCA, GDCA) sur les non-hydroxylés en position C12 (ABs 12 α -non-hydroxylés: CDCA, TCDCA, GCDCA, LCA, TLCA, GLCA) en faveur d'une augmentation des espèces 12 α -hydroxylés. Cette association directe entre IR et niveaux d'ABs 12 α -hydroxylés, a été montrée par plusieurs études de modèles murins de diabète (Uchida et al. 1985, 1996; Akiyoshi et al. 1986; Biddinger et al. 2008; Li et al. 2012) et chez des sujets insulino-résistants non-diabétiques (Haeusler et al. 2013). Le mécanisme moléculaire expliquant le lien entre IR et rapport 12 α /non-12 α a été au moins en partie expliqué et attribué à la Cyp8b1, qui, comme précédemment dit, est l'enzyme qui dans la biosynthèse des ABs détermine la production du CA, chef de file des ABs 12 α -hydroxylés. A l'état physiologique, l'insuline inhibe la transcription du gène de la Cyp8b1. En effet, l'insuline, *via* la phosphorylation d'Akt, conduit à l'exclusion moléculaire du facteur de transcription FOXO1 et à la diminution de la transcription de son gène cible, Cyp8b1. A l'état d'IR, la diminution de la phosphorylation d'Akt permet la migration au noyau de FOXO1 et la transcription de Cyp8b1. La conséquence fonctionnelle est une augmentation de la synthèse des ABs hydroxylés en position 12 α et donc une augmentation du ratio des ABs 12 α -hydroxylés/12 α non-hydroxylés (Haeusler et al. 2012).

Bien que des études aient relié cette perturbation à l'altération des voies de signalisation de l'insuline, il reste à élucider si celle-là est un marqueur d'IR ou un acteur dans la pathogenèse. Des études indiquent que l'altération dans le pool d'ABs est à la base de la perturbation métabolique: en effet une étude dans un modèle de souris invalidée pour Cyp8b1 montre que l'impossibilité de produire le CA et ses dérivés entraîne une amélioration de la tolérance au glucose, de la sensibilité à l'insuline et de la fonction β -pancréatique (Kaur et al. 2015). De plus, en absence de CA, l'absorption intestinale des graisses est réduite, avec en conséquence une augmentation des acides gras libres qui atteignent les cellules L de l'iléon. Cela se traduit par une augmentation de la sécrétion de l'hormone GLP-1 qui à son tour augmente la sécrétion d'insuline et améliore la tolérance au glucose (Kaur et al. 2015).

En outre, l'augmentation des espèces 12α -hydroxylés se traduit par une diminution des ligands les plus puissants de FXR et TGR5, le CDCA et le LCA respectivement (Maruyama et al. 2002; Lew et al. 2004). Ce déséquilibre pourrait donc avoir des répercussions sur l'état d'activation des récepteurs FXR et TGR5, avec les conséquences sur le métabolisme induites par l'altération de voies de signalisation qu'ils contrôlent.

- Condition de DT2: Chez l'Homme, des études cliniques montrent que la taille du pool d'AB plasmatiques n'est pas globalement perturbée en condition de DT2 (Cariou et al. 2011; Haeusler et al. 2013; Wewalka et al. 2014). Les sujets diabétiques présentent une augmentation dans la proportion de CA (due à une synthèse accrue) et une augmentation dans la proportion de DCA (espèce secondaire dérivée du CA), ce qui indiquerait un changement dans la composition de la flore bactérienne (Brufau et al. 2010).

Chez la souris, le pool d'ABs totaux est augmenté dans un modèle murin de diabète et d'obésité génétique (ob/ob), et expliquée par l'induction de l'expression de la Cyp7a1 par les effets épigénétiques de l'hyperglycémie (Li et al. 2012).

- Condition d'obésité: La concentration d'ABs totaux plasmatique est plus élevée chez des sujets obèses par rapport aux sujets minces et aux sujets anorexiques, ce que se reflète dans une corrélation positive avec l'indice de masse corporelle (Halmy et al. 1986; Prinz et al. 2015). Il est possible que cette différence soit au moins en partie due à la différence de composition du microbiote intestinale, qui est fortement altéré dans l'obésité (Tilg et al. 2009; DeWeerd 2014).

Toutefois, les sujets souffrant d'obésité morbide ont une réponse en ABs postprandiaux plus basse par rapport aux sujets minces, ce qui pourrait en partie justifier l'atténuation de la

réponse post-prandiale en GLP-1 qui caractérise la condition d'obésité (Glicksman et al. 2010).

- Condition de NASH: Une autre condition pathologique récemment mise en relation avec des variations dans le métabolisme des ABs est la stéatohépatite non alcoolique (NASH). L'analyse transcriptomique sur biopsies hépatiques provenant de personnes classées comme "normales", "steatosées" ou "NASH", a mis en évidence une variation dans le métabolisme hépatique des ABs avec un changement vers la voie alternative de leur synthèse. En particulier, les patients affectés par la NASH présentaient une réduction de l'expression de la Cyp8b1 et de HSD3B7 (enzymes de la voie classique), et une augmentation de l'expression de la Cyp7b1 (voie alternative) et de la BAAT (conjugaison). L'ensemble de ces variations peut être interprété comme la tentative du foie de diminuer la toxicité hépatique dans la progression de la NASH, mais ce qui en dérive est une variation qualitative des ABs. En fait, cette dérégulation génique se traduit par une diminution de CA et GDCA et une augmentation des ABs tauro-conjugués comme le TCA et TDCA (Lake et al. 2013), en cohérence avec l'augmentation de taurine observée dans les patients affectés par la NASH (Li et al. 2011).

1.5. La modulation du pool des acides biliaires par intervention pharmacologique ou chirurgicale

1.5.1. Les séquestrant des ABs

Les séquestrants des ABs (BAS) sont des macromolécules polymériques anioniques non digestibles qui favorisent l'élimination des ABs de l'organisme par la formation de complexes avec les ABs au niveau intestinal, ce qui empêche leur absorption et en augmente l'excrétion fécale (Einarsson et al. 1991). Ces médicaments ont été conçus pour le traitement des hypercholestérolémies. En effet, l'augmentation de l'excrétion fécale des ABs entraîne une augmentation de leur production hépatique à partir du cholestérol. Suite à la diminution du contenu hépatique de cholestérol (dérivé de la transformation du cholestérol en ABs), l'expression du récepteur aux LDL (LDLR) est augmentée, ce qui entraîne une diminution des concentrations en LDL-C (Hou et Goldberg 2009). Outre leur action sur le métabolisme du cholestérol, les BAS se sont révélés être bénéfiques aussi pour l'amélioration du contrôle glycémique chez les patients atteints de DT2 (Garg et Grundy 1994; Fonseca et al. 2010; Handelsman 2011). En effet, en 2008, le colesevelam a été approuvé par la Food and Drug

Administration pour le traitement de l'hyperglycémie dans le DT2, et récemment il a été inclus dans l'algorithme de gestion du diabète, en association à la metformine ou d'autres thérapies de première ligne (Hansen et al. 2014).

Les mécanismes par lesquels les BAS influencent le métabolisme du glucose ne sont pas encore totalement élucidés. Cependant les deux pistes les plus plausibles font intervenir l'augmentation de la sécrétion de GLP-1 et l'augmentation de l'utilisation du glucose splanchnique par le foie (Prawitt et al. 2014). L'augmentation de la sécrétion de GLP-1 a été montré *in vivo* par administration de cholestyramine aux rats obèses diabétiques Zucker (Chen et al. 2010), ou administration de colesevelam aux rats obèses (Shang et al. 2010). Elle est due d'une partie à l'action du récepteur membranaire TGR5 dans la cellule entéroendocrine L, activable par les complexes AB/séquestrant (comme montré par des études *in vitro* et *in vivo*: activation de TGR5 par un agoniste synthétique dans deux lignées cellulaires enteroendocrines GLUTag et STC-1 en présence ou pas de siRNA-TGR5 et étude de la production de GLP-1 chez la souris invalidée pour TGR5 dans l'organisme entier (TGR5KO) et WT obèse diabétique traitée avec colesevelam (Harach et al. 2012); étude de la réponse en GLP-1 chez la souris TGR5KO et étude de la production de cAMP dans la lignée cellulaire HEK exprimant TGR5 en présence de complexes AB-colesevelam (Potthoff et al. 2013) et d'autre part, par l'inactivation du récepteur nucléaire FXR dans la cellule entéroendocrine L, dont la diminution des agonistes disponibles neutralise son activité répressive sur la production et la sécrétion de GLP-1 (Trabelsi et al. 2015). L'augmentation de l'utilisation du glucose par le foie, qui représente la résultante du métabolisme hépatique du glucose et de l'utilisation du glucose portal, est conséquence de l'absorption intestinale du glucose et de la sensibilité du foie à l'insuline. Il est connu que la déficience de FXR retarde l'absorption intestinale du glucose (van Dijk et al. 2009), du coup la diminution de ses ligands dans les cellules intestinales par les BAS pourrait reproduire cet effet d'inactivation de FXR intestinal et retarder l'apparition du glucose dans la veine porte. D'autre part, un autre acteur de la modulation de l'absorption intestinale du glucose est TGR5, dont l'activation augmente la motilité intestinale, ce qui peut accélérer le flux des nutriments et du glucose dans l'intestin et ainsi diminuer son absorption (Alemi et al. 2013). Par conséquent l'activation de TGR5 par les complexes AB-BAS peut participer à la diminution du glucose dans la veine porte.

En parallèle, l'utilisation des BAS induit un changement dans la composition du pool des ABs avec une diminution des espèces agonistes de FXR (Brufau et al. 2010) ce qui pourrait réduire la répression de FXR sur la glycolyse et la lipogenèse hépatique (Duran-

Sandoval et al. 2005; Caron et al. 2013) amener à l'augmentation de l'utilisation du glucose par le foie.

Un ensemble de considérations sur la modulation de FXR et TGR5 dans l'utilisation des BAS en relation avec le traitement de la maladie métabolique et la diminution du risque cardiovasculaire a fait l'objet d'une revue soumise pour publication dans *Current Opinion in Endocrinology and Diabetes*.

1.5.2. Les inhibiteurs de l'ASBT

Sur le même principe, un autre moyen pour augmenter l'excrétion fécale des ABs est de diminuer leur absorption intestinale en bloquant le transport actif des ABs par le pôle apical des cellules épithéliales intestinales *via* un inhibiteur de l'ASBT. Il en résulte une augmentation de la conversion du cholestérol hépatique en ABs pour compenser leur perte fécale (Root et al. 2002). Ces molécules ont été montrées efficaces dans l'amélioration de l'hypoglycémie chez le rat diabétique Zucker (Chen et al. 2012), avec augmentation de la production de GLP-1, par analogie avec les effets des BAS (Chen et al. 2012; Wu et al. 2013b). Ainsi, les efforts de l'industrie pharmaceutique visent à identifier un composé qui optimise leurs propriétés hypocholestérolémiantes et hypoglycémiantes chez l'Homme (Kramer et Glombik 2006; Wu et al. 2013b). Cependant, ces molécules pourraient présenter l'effet collatéral de la diarrhée, conséquence de l'altération du transit des ABs dans le colon. En effet, L'Elobixibat, un inhibiteur de l'ASBT, est en phase clinique pour le traitement de la constipation chronique, pathologie associée au DT2 et à l'augmentation du risque cardiovasculaire (Bytzer et al. 2001; Talley et al. 2003). Une étude chez l'Homme a prouvé la capacité de l'Elobixibat à diminuer les LDL-C plasmatiques, avec une augmentation de la synthèse des ABs (dosage C4), et une diminution de FGF19 plasmatique (Simrén et al. 2011). Une étude clinique plus récente a confirmé ces résultats et a montré aussi une augmentation du GLP-1 chez les patients traités avec Elobixibat (Rudling et al. 2015). Cela prouve la capacité d'un inhibiteur de l'ASBT à améliorer les facteurs de risque cardiovasculaires chez des patients dyslipidémiques et souffrants de constipation chronique.

1.5.3. Roux-and-Y Gastric Bypass

Le Roux-en-Y Gastric Bypass (RYGB) est une des procédures chirurgicales couramment utilisées dans le traitement de l'obésité sévère morbide. Cette technique est très efficace pour induire une forte perte de poids corporel et, par rapport à d'autres techniques de chirurgie bariatrique, induit une amélioration du profil métabolique qui précède la perte de

poids, ce qui implique ainsi des mécanismes “perte-de-poids-indépendants”. Ces effets comprennent l’amélioration du diabète, de l’hypercholestérolémie, du NAFLD, du risque cardiovasculaire, de l’apnée du sommeil et du cancer et seraient donc reliés à l’altération du flux de nutriments après le RYGB et à un ensemble de variations métaboliques et hormonales qui suivent la réorganisation anatomique du tractus gastro-intestinal. Parmi ces variations, l’altération quantitative et qualitative du pool des ABs plasmatiques pourrait être un des acteurs responsables des améliorations métaboliques qui suivent le RYGB, et des études sont en cours pour clarifier le rôle des ABs, les dynamiques et les mécanismes moléculaires en jeu.

Actuellement il n’y a pas d’éléments concrets pour attribuer à l’activation de FXR les effets bénéfiques du RYGB. Toutefois, une étude conduite sur souris soumises à “Vertical Sleeve Gastrectomy” (VSG), qui induit les mêmes effets bénéfiques comme la perte de poids et l’amélioration du profil glycémique, impute à FXR les effets du RYGB, en montrant que la masse corporelle et le profil glycémique chez une souris WT après VSG ne sont plus retrouvées chez la souris FXRKO (Ryan et al. 2014).

Nous reviendrons plus en détails sur le RYGB dans la “partie 2” de la section “Résultats”.

1.6. La modulation de l’activité des récepteurs aux Acides Biliaires comme application thérapeutique

Puisque les AB participent au contrôle du métabolisme par leur action sur les récepteurs FXR et TGR5, ces deux protéines représentent de potentielles cible d’intérêt dans le développement des traitements pharmacologiques pour l’hyperlipidémie, le NAFLD/NASH, le diabète de type2, les désordres cardiovasculaires (CVD), la cholestase.

Néanmoins, l’utilisation pharmacologique des ABs exogènes est limitée pour plusieurs raisons: a) les ABs ont une fenêtre thérapeutique très étroite dû à leurs effets toxiques ; b) ils peuvent avoir des effets collatéraux (comme le CDCA, voir la suite); c) dans les études de l’activation de FXR *in vivo* pour tester l’efficacité thérapeutique de ces molécules, l’administration des espèces qui l’activent avec la plus forte puissance (CDCA, CA) se traduit dans la formation d’espèces secondaires moins puissantes et qui ont une spécificité plus réduite, ce que complique l’interprétation des résultats.

Ces limitations ont conduit au développement de ligands synthétiques ou semi-synthétiques des récepteurs aux ABs. Si des ligands de FXR se révèlent prometteurs dans le traitement de certaines pathologies chez l’Homme, ce n’est pas encore le cas pour les ligands

de TGR5 qui, à différence des ligands pour FXR, n'ont pas encore atteint la phase d'expérimentation clinique, mais ils pourraient avoir des applications intéressantes dans le traitement du DT2 (Herbert et al. 2010) et des composantes inflammatoires du DT2 et du risque cardiovasculaire grâce à la fonction de FXR dans les monocytes et les macrophage (Pols et al. 2011; Högenauer et al. 2014). Dans la suite, les composés naturels ou semi-synthétiques qui ont été ou sont utilisés en clinique ou se trouvent dans des phases avancés de l'expérimentation clinique.

1.6.1. CDCA

La première utilisation thérapeutique du CDCA remonte aux années 1970s et est liée au traitement des calculs biliaires (Poupon 2012). Des études sur de petites cohortes ont montré que son utilisation est associée à une diminution des TG plasmatiques, sans changement de cholestérol plasmatique. Par contre, une étude sur plus grande échelle a mis en évidence une augmentation de LDL-C après CDCA, ce que, en plus des autres effets secondaires tels que le niveau d'enzymes hépatiques élevé et la diarrhée, a conduit à son abandon en thérapeutique (Porez et al. 2012).

1.6.2. INT-747

Le composé le plus avancé en développement clinique est un agoniste semi-synthétique de FXR. C'est un dérivé du CDCA, obtenu par introduction d'un groupement alkyle en position 6 qui augmente sa puissance d'un facteur 10. Son nom est INT-747, ou 6-ethyl-CDCA ou obeticholic acid (OCA) (Pellicciari et al. 2002). Ce composé est prometteur pour ses effets dans le traitement de la cholestase (Fiorucci et al. 2005), de la fibrose (Fiorucci et al. 2004) et pour ses propriétés protectrices contre l'IR et la stéatose hépatique, comme prouvé dans des rats génétiquement obèses (Cipriani et al. 2010). Les applications thérapeutiques de l'INT-747 chez l'Homme et leur avancement clinique sont les suivantes:

- INT-747 dans le traitement de la cirrhose biliaire primitive: La cirrhose biliaire primitive (CBP) est une maladie auto-immune inflammatoire du foie qui détruit progressivement les canalicules biliaires et qui conduit à la cholestase, la fibrose, et la cirrhose, et pour laquelle le seul traitement actuellement efficace est l'UDCA (voir la suite). Une étude de phase II a montré que le INT-747 a un effet protecteur contre la CBP, avec une diminution des paramètres diagnostiques (PAL, ALAT, γ -GT, CRP) chez les patients traités. Ces résultats ont été confirmés dans une récente étude de phase III qui a montré une diminution significative des marqueurs de lésions hépatiques (PAL, ALAT, γ -GT) dans des

patients souffrant de CBP qui ne répondaient pas au traitement par l'UDCA (Hirschfield et al. 2015).

- INT-747 dans le traitement de la NAFLD chez les patients avec T2D: Une étude de phase II a montré que le traitement avec le INT-747 (25 mg ou 50 mg pendant 6 semaines) conduit à une légère mais significative perte de poids, proportionnelle à la dose administrée (1-2%), avec une sensibilité accrue à l'insuline et une amélioration du profil glycémique. D'autres effets bénéfiques ont été observés, comme la diminution des marqueurs de l'inflammation du foie (ALT, γ -GT) et des TG plasmatiques. Toutefois, de faibles, mais significatives, diminution du HDL-C et une augmentation du LDL-C ont aussi été observées, suggérant des effets négatifs similaires à ceux du CDCA (Mudaliar et al. 2013).

- INT-747 dans le traitement de la NASH: Les résultats d'un essai clinique de phase III chez 283 patients avec NASH traités par 25 mg d'OCA par jour pendant 72 semaines ont été rapportés (étude FLINT). L'OCA améliore les lésions hépatiques, y compris l'inflammation et la fibrose. Cependant, 23% des patients présentaient un prurit et une augmentation des taux de cholestérol total et LDL, et une diminution modeste des HDL (Neuschwander-Tetri et al. 2015).

1.6.3. L'acide ursodésoxycholique

L'acide ursodésoxycholique (UDCA) est largement utilisé dans le traitement de la cirrhose biliaire primitive, pour la dissolution des calculs biliaires de cholestérol (Hofmann 1999; Paumgartner et Beuers 2002; Lindor et al. 2009) et dans la cholestase intrahépatique gestationnelle (Chappell et al. 2012). Des preuves expérimentales et cliniques suggèrent au moins quatre mécanismes d'action, indépendants de l'activité des récepteurs aux ABs, dans les effets thérapeutiques de l'UDCA pour les troubles cholestatiques: a) une augmentation de l'indice d'hydrophilie du pool d'AB circulants; b) la stimulation de la sécrétion des ABs par l'hépatocyte et par les cellules des canalicules biliaires; c) une cytoprotection contre les ABs et les dommages induits par les cytokines; d) l'immunomodulation et les effets anti-inflammatoires. Le mécanisme d'action prédominant de l'UDCA peut varier en fonction de la physiopathologie de la cholestase en question (revue Poupon 2012).

De plus, une étude récente a montré que l'UDCA peut avoir des effets bénéfiques sur la dysfonction adypocitaire et l'état d'inflammation chronique en réduisant le ER stress en agissant comme chaperon (Mališová et al. 2013).

Outre que dans le traitement d'un grand éventail de troubles hépatobiliaires, l'UDCA s'est montré efficace pour améliorer la stéatose et l'inflammation chez la souris (Trauner et

Graziadei 1999). Des données récentes ont montré que chez des patients avec NAFLD l'UDCA a des effets comparables à ceux d'un antagoniste pour FXR, avec une diminution de LDL-C hépatiques mais augmentation des TG hépatiques (Mueller et al. 2015). Chez ces patients, l'UDCA stimule la synthèse des AB par la diminution de FGF19 circulant et l'inactivation de FXR dans le foie, ce que se traduit par l'activation de la Cyp7a1 et de la synthèse des ABs, comme en témoigne l'augmentation du marqueur C4 circulant (Mueller et al. 2015). L'UDCA a été montré comme antagoniste partiel capable d'inhiber l'activation par le CDCA (Campana et al. 2005), donc il est possible qu'une partie des effets observés soient dus à FXR. La compréhension du/des mécanisme/s d'action de l'UDCA pourrait permettre le développement de thérapies basées sur les ABs efficaces pour le traitement de NAFLD/NASH.

Manuscrit 1: Metabolic effects of bile acid sequestration: impact on cardiovascular risk factors

METABOLIC EFFECTS OF BILE ACID SEQUESTRATION: IMPACT ON CARDIOVASCULAR RISK FACTORS

Valeria Spinelli^{1, 2, 3, 4}, Oscar Chávez-Talavera^{1, 2, 3, 4}, Anne Tailleux^{1, 2, 3, 4}, Bart Staels*^{1, 2, 3, 4}

¹ Univ Lille, UMR1011, EGID, F-59000 Lille, France

² Inserm, UMR1011, F-59000 Lille, France

³ CHU Lille, F-59000 Lille, France

⁴ Institut Pasteur de Lille, U1011, F-59000 Lille, France

* Corresponding author:

Prof Bart STAELS

Institut Pasteur de Lille, 1 rue du professeur Calmette, BP245, 59019 LILLE - France

Tel : +33320877388 - Fax : +33320877360

e-mail : Bart.Staels@pasteur-lille.fr

Acknowledgments

B.S. is a member of the Institut Universitaire de France.

Financial support and sponsorship

V.S. was supported by a grant from the Fondation pour la Recherche Médicale (FRM) Grant FDT20140930804. This work was supported by Grants from Région Nord-Pas de Calais, FEDER, A.N.R. (FXREn), the Société Francophone du Diabète (SFD), the EFSD/Novo Nordisk 2015 Programme, the European Genomic Institute for Diabetes (EGID, ANR-10-LABX-46) and European Commission.

Conflicts of interest

The authors declare no conflict of interests.

ABSTRACT

Purpose of review: To discuss the impact of bile acid sequestrants (BAS) on cardiovascular risk factors (CVRFs), on the basis of recent (pre)clinical studies assessing the metabolic impact of modulation of entero-hepatic bile acid (BA) signalling via the BA receptors FXR and TGR5.

Recent findings: BAS decrease LDL-C by stimulating *de novo* hepatic BA synthesis and lowering intestinal lipid absorption, and improve glucose homeostasis in T2D, at least in part by increasing GLP-1 production, via intestinal TGR5- and FXR-dependent mechanisms. Intestinal and peripheral FXR and TGR5 modulation also affects peripheral tissues, which can contribute to the reduction of CVRFs.

Summary: BA are regulators of metabolism acting in an integrated inter-organ manner via FXR and TGR5. Modulation of the BA pool size and composition, and selective interference with their receptors could therefore be a therapeutic approach to decrease CVRFs. Even though clinical CV outcome studies using BAS are still lacking, the existing data point to BAS as an efficacious pharmacological approach to reduce CVRFs.

Keywords: bile acid sequestrants, bile acids, cardiovascular risk, metabolism, FXR, TGR5, GLP-1, FGF15/19

Introduction

Cardiovascular disease (CVD) is the first cause of death worldwide (WHO 2015). CVD is precipitated by cardiovascular risk factors (CVRFs), such as dyslipidemia (high low density lipoprotein-cholesterol (LDL-C), low high density lipoprotein-cholesterol (HDL-C), high triglycerides (TG)), type 2 diabetes (T2D) and non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD)/non-alcoholic steatohepatitis (NASH). Statins are the first line treatment for dyslipidemia [1], but they do not completely eliminate CVR, increase the risk of T2D and are not tolerated by all patients [2]. Among the current non-statin lipid-lowering therapies are the bile acid sequestrants (BAS), which are positively charged resins that bind and sequester BA in the intestine to form an insoluble complex, hence disrupting the entero-hepatic cycle by interfering with intestinal BA reabsorption. BAS exert beneficial effects on LDL-C by enhancing hepatic cholesterol turnover for *de novo* synthesis of BA, to compensate for BAS-induced fecal BA loss. BAS were initially used to manage hypercholesterolemia, but were recently found to improve glucose homeostasis in T2D patients [3,4]. This beneficial effect of BAS on glucose homeostasis led to the repositioning of Colesevelam and Colestimide for the treatment of diabetes (in the USA and Japan, respectively).

BA act also as signaling molecules regulating metabolism by activating at least two receptors, FXR and TGR5, which are expressed in metabolic tissues where they control energy homeostasis. Since the different BA species activate these receptors with different potencies, changes in their pool size and composition can impact on metabolic regulation. Hence, variations of the BA pool following the use of BAS [5] can also contribute to the beneficial effects of BAS. In this review, we discuss recent findings on BA acting as signaling molecules in an integrated inter-organ metabolic system via their receptors, with a particular focus on entero-hepatic organs. We propose the hypothesis that BAS impact on CVRFs, and potentially on CVD, by modulating the BA pool size and composition.

Bile acids are signalling molecules regulating energy homeostasis

BA are synthesized in the hepatocytes from cholesterol by the action of at least 17 enzymes. The end products are primary BA, which are conjugated with taurine (mainly in rodents) or glycine (mainly in humans) generating tauro-conjugated or glyco-conjugated BA, respectively. BA are stored in the gallbladder in the fasting state and secreted in the duodenum after a meal. In the intestine, the primary BA are metabolized to secondary BA by the action of gut bacterial enzymes. After facilitating intestinal lipid absorption, about 95% of the BA pool is absorbed and 5% of intestinal BA are excreted in the feces and replaced by *de novo* synthesis. Absorbed BA are transported back to the liver through the portal vein, where the majority is recaptured by the hepatocytes. However, detectable amounts of BA escape the hepatic reuptake and reach the peripheral organs. Hence, a steep BA concentration gradient exists between portal and peripheral blood under normal physiological conditions. The cycling of BA from the liver to the intestine is known as the entero-hepatic circulation (Figure 1A).

BA modulate metabolism by activating several receptors, including the nuclear farnesoid X receptor (FXR) and the membrane G-protein coupled receptor TGR5 (GPBAR1). FXR, which is widely expressed (liver, intestine, pancreas, adipose tissue (AT), kidney, brain and immune cells) is a transcription factor regulating genes controlling lipid, glucose, BA metabolism and inflammation (for review: [6]). TGR5 is expressed in AT, muscle, intestine, pancreas, gallbladder, lung, immune cells, brain, spinal cords and the enteric nervous system (in mice). TGR5 regulates energy expenditure and body weight and exerts anti-inflammatory actions (for review: [7]). Not all BA activate FXR and TGR5 with the same potency. Thus, quantitative and/or qualitative changes of the BA pool can modify metabolism and inflammatory control by differential FXR and TGR5 activation. Since animal models are required for genetic studies, it is important to note that specific differences in the composition of the BA pool exist among species. Indeed, whereas certain BA species exclusively present in rodents have been recently identified as FXR antagonists [8], extrapolation of these findings in animals to humans is difficult.

Quantitative and qualitative changes in the bile acid pool: impact on CVRFs

Several CVRFs are modified in association with alterations in the BA pool (Figure 1B). Obese individuals display increased plasma BA concentrations, which positively correlate with the body mass index [9]. Insulin resistance is associated with alterations in the 12 α -hydroxylated/non-12 α -hydroxylated BA ratio, due to a lack of insulin repression of Cyp8b1 induction by Foxo1 [10]. Type 2 diabetic patients display increased synthesis of the primary BA cholic acid (CA), increased input rate and pool size of the secondary BA deoxycholic acid (DCA) [5]. Patients with NASH display deregulated hepatic BA metabolism, with decreased hepatic CA and increased hepatic tauro-conjugated BA levels [11].

Systemic BA concentrations increase after Roux-and-Y Gastric Bypass (RYGB) surgery in preclinical models [12] and humans [13•,14•]. BA are candidates to explain the body weight-independent metabolic improvements seen after surgery (ex. remission from T2D and NASH) [14•]. RYGB surgery has cardiovascular protective effects in rats [15•] and humans [16], and reduces CV and overall mortality in humans [17]. Interestingly, BA diversion alone reproduces the metabolic effects of RYGB on glucose metabolism in rats and mice [18•,19•] and has beneficial effects on insulin sensitivity and cholesterol levels in T2D patients [20•] pointing to bile and/or BA as modulators of glycaemic control after RYGB.

Action mechanisms of bile acids on CVRFs

BA, glucose metabolism and GLP-1

BA regulate glucose homeostasis through effects via FXR in the liver, which controls glycolysis and neoglucogenesis during nutritional transition periods [6]. Perturbations in hepatic BA metabolism also alter the secretion of insulin in response to glucose by pancreatic islets [21] revealing that BA connect also the liver and pancreas. Indeed, changes in BA pool composition result in different activation patterns of FXR and TGR5 in the pancreas, both regulators of insulin secretion [22,23].

BA regulate intestinal GLP-1 production and secretion by enteroendocrine L cells. TGR5 activation in the colon induces proglucagon gene expression [4] and GLP-1 secretion [24]. Recent data indicate that this induction of GLP-1 secretion is due to basolateral rather than apical activation of the receptor, hence requiring BA absorption via the intestinal BA transporter [25]. These findings are at odds with a previous study showing that BA sequestrants, by forming BA-BAS complexes, induce GLP-1 secretion by binding to and activating apical TGR5 in enteroendocrine L cells of the colon [26]. More recently, however, FXR activation has been shown to repress proglucagon gene expression and GLP-1 secretion in the ileum [27●●]. Hence, chronic BAS treatment increases proglucagon gene expression by de-activating intestinal FXR, due to lower decreased intracellular levels of absorbed BA. In line, treatment of ob/ob mice with Colesevelam improves glucose metabolism in an FXR-dependent manner [27●●]. Since GLP-1 regulates glucose homeostasis, islet hormone secretion, appetite and body weight, gut motility and immune function (for review: [28]), BA and their sequestration may influence T2D, at least in part, via GLP-1. BA can also modulate glucose homeostasis (and subsequently T2D) via the action of intestinal FXR on the kinetics of glucose absorption, which is delayed in FXR-deficient mice [4], and hepatic FXR on glucose handling by the liver [4].

BA, intestinal FXR signaling and the gut microbiota

Treatment with antibiotics or tempol increases the levels of conjugated T β MCA, an FXR antagonist, in the intestine by decreasing *Lactobacillus*, a genus which produces a BA deconjugation enzyme [29]. Inhibition of intestinal FXR activity by T β MCA in tempol-treated wild-type mice is associated with lower high fat diet-induced obesity and insulin resistance [29]. Moreover, intestinal FXR inhibition also inhibits intestinal ceramide biosynthesis, decreasing the levels of ceramides reaching the liver through the portal vein, subsequently inhibiting SREBP-1c, lipogenesis and steatosis, a process reversed by ceramide administration [30●●]. In line with these studies inducing microbiota changes, intestine-specific FXR deficiency also leads to lower body weight gain and insulin-resistance [29] and to decreased intestinal ceramide synthesis and hepatic steatosis [30●●]. Thus, inhibiting intestinal FXR either by microbiota-mediated changes of BA profiles and the subsequent T α MCA increase, or by genetic intestine-specific FXR disruption, protects against NAFLD, obesity and glucose-intolerance and thus decreases CVRFs.

Moreover, recent data show that HFD-induced body weight gain, liver steatosis and adipose inflammation are promoted by the gut microbiota in a FXR-dependent manner [31●●]. These effects of the HFD are related to alterations in intestinal flora composition in FXRKO mice. Hence, on the one hand the microbiota regulate FXR activation, whereas, on the other hand, FXR modulates the microbial composition, impacting on obesity and CVRFs [31●●]. The use of antibiotics to modulate the microbiota and metabolic phenotype has also been

tested in humans [32]. A single blind randomized controlled trial in 20 obese male subjects with metabolic syndrome treated with vancomycin for 7 days showed that antibiotic treatment decreased gram-positive bacteria (mainly *Firmicutes*) and increased gram-negative bacteria (mainly *Proteobacteria*). This change in microbiota composition translated into changes in BA pool composition, with an increase in primary BA. Interestingly, the microbiote alterations induced by vancomycin decreased peripheral insulin sensitivity, indicating a link between gut microbiota and metabolic effects in humans [32]. These observations point to important relationships between BA, the microbiote, FXR and CVRFs.

BA, adipose tissue and energy expenditure

By contrast, intestine-specific activation of FXR with Fexaramine increased energy expenditure and improved metabolism in obese mice through the induction of the expression of genes regulating mitochondrial biogenesis, fatty acid oxidation, thermogenesis, browning of WAT, and overall protecting against diet-induced weight gain [33•]. These effects were ascribed to changes in plasma BA pool composition, secondary to FXR-induced of intestinal epithelium FGF15 expression, a FXR target gene and key mediator of the intestinal control of hepatic BA synthesis. This increase of FGF15 in mice induces a shift to a BA pool enriched in TGR5 agonists, resulting in enhanced energy expenditure via TGR5-dependent BAT activation [33•]. Interestingly, a recent study in healthy humans showed that oral administration of CDCA for two days increases BAT activity and energy expenditure likely via TGR5 activation in brown adipocytes [34••].

BA, FXR and FGF15/19 signaling

Enterocytic FXR induced expression of FGF15/19 represses hepatic BA synthesis through the cell surface receptor complex FGFR4/ β Klotho. FGF19 levels are reduced in patients with NAFLD [35]. High plasma levels of FGF19 are associated with T2D remission following RYGB [36], suggesting FGF19 as a candidate participating in the BW loss-independent metabolic improvements following RYGB surgery. Hence, FXR activation by promoting FGF15/19 secretion may result in additional metabolic effects. Treatment of mice with FGF19, the human ortholog of mouse FGF15, reduces plasma glucose by regulating postprandial glucose homeostasis, suppressing hepatic gluconeogenesis and inducing protein and glycogen synthesis, without stimulating lipogenesis [37]. Moreover, FGF19 directly acts on the brain by beneficially impacting on systemic glucose control in rodents [38]. FGF19 also reduces liver fat content, total cholesterol (TC) and TG concentrations and protects from NAFLD/NASH in rodents [39,40]. BA and FGF19 repress the expression of apo(a), a highly atherogenic lipoprotein [41], as well as hepatic expression of paraoxonase 1 [42], an anti-atherogenic component of HDL. If these results are confirmed in humans, the BA-induced FXR-dependent FGF15/19 pathway could also modulate CVRFs (T2D, obesity, NASH and inflammation) impacting on these metabolic functions. However, the homology between FGF15 and FGF19 being relatively low, translational studies in humans and primates are necessary required. Moreover, studies are necessary to determine whether the results obtained in rodent models with FGF19 are specific to the FGFR4/ β Klotho pathway. Furthermore, in humans, FGF19 levels are positively correlated with tumor size of hepatocellular carcinomas [43], and siRNA knock-down of FGF19 or FGFR4 inhibits proliferation of human hepatocellular carcinoma cell lines [44]. These observations question the suitability of targeting FGF19 for the treatment of cardiometabolic diseases. In humans, FGF19 levels rather decrease upon BAS treatment [5,45], the consequences of which are currently unclear (both on potential positive metabolic, as on negative pro-mitogenic effects).

BA, FXR and lipoprotein metabolism

BA affect CVRFs by modulating hepatic FXR activity, thereby regulating lipid metabolism. FXR regulates plasma lipid and lipoprotein metabolism by decreasing the expression of apolipoprotein (apo) CIII and apo(a), by increasing apoCII [6] and apoF, an inhibitor of CETP (Cholesteryl Ester Transfer Protein) [46]. Moreover, FXR also influences lipoprotein remodelling by controlling the expression of the PLTP (Phospholipid Transfer Protein), HL (Hepatic Lipase) and CETP. FXR diminishes hepatic lipid content by increasing PPAR α and repressing Srebp-1c gene expression, thus inhibiting lipogenesis and consequently lowering TG plasma concentrations (for review: [6]). In line, a phase III clinical study has shown that administration of obeticholic acid, a FXR agonist, improves NASH [47●●]. By contrast, BAS increase plasma TG levels [48] and worsen steatosis. These effects could be related to decreased FGF19 levels, and/or the de-activation of hepatic FXR. In fact, BAS administration decreases systemic plasma CDCA (the most potent BA FXR activator), whereas CA and DCA (less potent FXR activators) increase [5]. Lower FXR activation could in turn lead to lower lipogenesis repression.

BA protect from atherosclerosis via TGR5, whose activation decreases pro-inflammatory cytokine production and induces anti-atherosclerotic effects [49]. In line, dual activation of FXR and TGR5 with INT-767 has protective effects from atherosclerosis in mice [50]. The effects of FXR on murine atherosclerosis are less clear, with different responses depending on the model [51].

The effects of BAS on CVRFs via action on FXR and TGR5 in entero-hepatic tissues are represented in Figure 1C.

Clinical evidence of BAS on cardiovascular risk factors and cardiovascular disease

BAS improve the lipid profile in hypercholesterolemic patients, in mono- or combination therapy, by decreasing TC, LDL-C and apo B. The effect of BAS on plasma HDL-C is less consistent, with some, but not all studies reporting an increase. Moreover, BAS may increase plasma TG, which limits their use in hypertriglyceridemic patients at risk for pancreatitis [48]. In patients with NASH, colesvelam administration induces a small but measurable increase in liver fat [52]. There is only one multicenter randomized double blind clinical trial testing the efficacy of a BAS (i.e. cholestyramine) on CVD. The LRC CPPT trial showed a significant reduction of CHD death and non-fatal myocardial infarction, without change in deaths from all causes [48]. In T2D patients, BAS decrease HbA1c and fasting glycaemia, which are CVRF [3,48], but studies testing the effects of BAS on cardiovascular morbi-mortality in T2D patients, on top of current standard of care treatment, are still lacking. A prospective, longitudinal, double-blind clinical trial is required to assess the impact of BAS on CVD.

Conclusion

BAS reduce CVRFs by regulating lipid and glucose metabolism as well as inflammation control. Analysis of their systemic effects indicates that inactivating FXR in the intestine and activating FXR in the liver could represent a good strategy to modulate CVRFs. Mechanistic studies of the effects of BA on entero-hepatic organs and their cross-talk with peripheral tissues identify BAS as a useful pharmacological option to reduce CV risk through decreased plasma LDL-C concentrations and improved glucose metabolism. Since BAS do not directly act on the liver, but could interfere with the action of hepatic FXR on lipid metabolism via the

changes in BA pool composition (enhancing hepatic steatosis), it would be of interest to assess the effects of co-administration of BAS with a hepatic FXR agonist on metabolic control.

References

1. Greenland P, Lauer MS. Cholesterol Lowering in 2015: Still Answering Questions About How and in Whom. *JAMA* 2015, 314:127–128.
 2. Aiman U, Najmi A, Khan RA. Statin induced diabetes and its clinical implications. *J. Pharmacol. Pharmacother.* 2014, 5:181–185.
 3. Hansen M, Sonne DP, Knop FK. Bile acid sequestrants: glucose-lowering mechanisms and efficacy in type 2 diabetes. *Curr. Diab. Rep.* 2014, 14:482.
 4. Prawitt J, Caron S, Staels B. Glucose-lowering effects of intestinal bile acid sequestration through enhancement of splanchnic glucose utilization. *Trends Endocrinol. Metab. TEM* 2014, 25:235–244.
 5. Brufau G, Stellaard F, Prado K et al. Improved glycemic control with colesevelam treatment in patients with type 2 diabetes is not directly associated with changes in bile acid metabolism. *Hepatology. Baltim. Md* 2010, 52:1455–1464.
 6. Mazuy C, Helleboid A, Staels B, Lefebvre P. Nuclear bile acid signaling through the farnesoid X receptor. *Cell. Mol. Life Sci.* 2014, 72:1631–1650.
 7. Duboc H, Taché Y, Hofmann AF. The bile acid TGR5 membrane receptor: From basic research to clinical application. *Dig. Liver Dis.* 2014, 46:302–312.
 8. Sayin SI, Wahlström A, Felin J et al. Gut microbiota regulates bile acid metabolism by reducing the levels of tauro-beta-muricholic acid, a naturally occurring FXR antagonist. *Cell Metab.* 2013, 17:225–235.
 9. Prinz P, Hofmann T, Ahnis A et al. Plasma bile acids show a positive correlation with body mass index and are negatively associated with cognitive restraint of eating in obese patients. *Neuroendocr. Sci.* 2015, 9:199.
 10. Haeusler RA, Astiarraga B, Camastra S et al. Human insulin resistance is associated with increased plasma levels of 12 α -hydroxylated bile acids. *Diabetes* 2013, 62:4184–4191.
 11. Lake AD, Novak P, Shipkova P et al. Decreased hepatotoxic bile acid composition and altered synthesis in progressive human nonalcoholic fatty liver disease. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2013, 268:132–140.
 12. Bhutta HY, Rajpal N, White W et al. Effect of Roux-en-Y Gastric Bypass Surgery on Bile Acid Metabolism in Normal and Obese Diabetic Rats. *PloS One* 2015, 10:e0122273.
 13. Dutia R, Embrey M, O'Brien S et al. Temporal changes in bile acid levels and 12 α -hydroxylation after Roux-en-Y gastric bypass surgery in type 2 diabetes. *Int. J. Obes.* 2015, 39:806–813.
- This clinical study in obese T2D patients shows the temporal changes of BA concentrations and pool composition after RYGB in the fasted and postprandial states, with a particular focus on the ratio 12 α hydroxylated/non-12 α hydroxylated BA. This study shows the crucial importance of the time after surgery, with changes in BA occurring 2 years but not 1 month after surgery.
14. Penney NC, Kinross JM, Newton RC, Purkayastha S. The role of bile acids in reducing the metabolic complications of obesity after bariatric surgery: A systematic review. *Int. J. Obes.* 2015, 39:1565-74.
- Using a systematic search on literature databases, this review analyses the role of BA in humans and animals in bariatric surgery-induced metabolic effects. This review also discusses the possible involvement of BA in the decrease in cancers after surgery in relation to potential carcinogenic properties of high BA levels.

15. Osto E, Doytcheva P, Corteville C et al. Rapid and Body Weight-Independent Improvement of Endothelial and High-Density Lipoprotein Function After Roux-en-Y Gastric Bypass: Role of Glucagon-Like Peptide-1. *Circulation* 2015, 131:871–881.
- The mechanism of action of RYGB on cardioprotection is studied in rats and humans, showing beneficial effects of surgery on endothelial function and protective properties of HDL via GLP-1 by mechanisms independent of the GLP-1 receptor pathway. This study links lipoproteins, incretins and BA in the RYGB-induced improvement of cardiovascular risk.
16. Tailleux A, Rouskas K, Pattou F, Staels B. Bariatric surgery, lipoprotein metabolism and cardiovascular risk. *Curr. Opin. Lipidol.* 2015, 26:317-24.
17. Eliasson B, Liakopoulos V, Franzén S, Näslund I et al. Cardiovascular disease and mortality in patients with type 2 diabetes after bariatric surgery in Sweden: a nationwide, matched, observational cohort study. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2015, 3:847–854.
18. Goncalves D, Barataud A, De Vadder F et al. Bile Routing Modification Reproduces Key Features of Gastric Bypass in Rat. *Ann. Surg.* 2015, 262:1006-15.
- This study, performed in rats, and the following [19], performed in mice, provide the proof-of-concept that RYGB-induced BA changes are involved in the metabolic improvements occurring after surgery.
19. Flynn CR, Albaugh VL, Cai S et al. Bile diversion to the distal small intestine has comparable metabolic benefits to bariatric surgery. *Nat. Commun.* 2015, 6:7715.
- This study, performed in mice, and the previous [18], performed in rats, provide the proof-of-concept that RYGB-induced BA changes are involved in the metabolic improvements occurring after surgery
20. Ferrannini E, Camastra S, Astiarraga B et al. Increased Bile Acid Synthesis and Deconjugation after Biliopancreatic Diversion. *Diabetes* 2015, 64:3377-85.
- This clinical study compares the effects of biliopancreatic diversion (BPD) and Roux-en-Y gastric bypass (RYGB) on BA synthesis and pool composition of circulating BA. Despite that both interventions increase plasma BA, BPD vs RYGB increases vs decreases BA synthesis markers, preferentially modulates unconjugated vs conjugated BA, and induces sustained vs normalized changes after 1 year, suggesting the existence of different mechanisms upon BPD vs RYGB-induced changes in BA pool composition.
21. Seyer P, Vallois D, Poitry-Yamate C et al. Hepatic glucose sensing is required to preserve β cell glucose competence. *J. Clin. Invest.* 2013, 123:1662–1676.
22. Düfer M, Hörth K, Krippeit-Drews P, Drews G. The significance of the nuclear farnesoid X receptor (FXR) in β cell function. *Islets* 2012, 4:333–338.
23. Kumar DP, Rajagopal S, Mahavadi S et al. Activation of transmembrane bile acid receptor TGR5 stimulates insulin secretion in pancreatic β cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2012, 427:600–605.
24. Bala V, Rajagopal S, Kumar DP et al. 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.* 2014, 5:420-431.
25. Brighton CA, Rievaj J, Kuhre RE et al. Bile Acids Trigger GLP-1 Release Predominantly by Accessing Basolaterally Located G Protein-Coupled Bile Acid Receptors. *Endocrinology* 2015, 156:3961–3970.
26. Potthoff MJ, Potts A, He T et al. Colesevelam suppresses hepatic glycogenolysis by TGR5-mediated induction of GLP-1 action in DIO mice. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 2013, 304:G371–380.

27. Trabelsi MS, Daoudi M, Prawitt J et al. Farnesoid X receptor inhibits glucagon-like peptide-1 production by enteroendocrine L cells. *Nat. Commun.* 2015, 6:7629-7642.
- This study identifies a role of FXR in L-cell regulation of proglucagon gene expression and GLP-1 secretion via mechanisms involving the ChREBP pathway. This complements the previously reported role of TGR5, the membrane BA receptor, in the control of incretin synthesis in the intestine.
28. Campbell JE, Drucker DJ. Pharmacology, physiology, and mechanisms of incretin hormone action. *Cell Metab.* 2013, 17:819–837.
29. Li F, Jiang C, Krausz KW et al. Microbiome remodelling leads to inhibition of intestinal farnesoid X receptor signalling and decreased obesity. *Nat. Commun.* 2013, 4:2384-2394.
30. Jiang C, Xie C, Li F et al. Intestinal farnesoid X receptor signaling promotes nonalcoholic fatty liver disease. *J. Clin. Invest.* 2015, 125:386–402.
- Altering gut microbiota with either tempol or antibiotics in mice modulates FXR activity in the intestine, and subsequently liver lipid metabolism through interference with intestinal ceramide synthesis and hepatic lipogenesis. In this context, inhibition of FXR in the intestine has beneficial hepatic effects.
31. Parseus A, Sommer N, Sommer F et al. Microbiota-induced obesity requires farnesoid X receptor. *Gut.* 2015 In press
- Using germ-free/conventional, FXR-KO/FXR-WT mice and microbiota transfer, this study shows that FXR is necessary for maintaining gut microbiota composition, which promotes obesity and associated disorders, and that this phenotype is transferable between mice.
32. Vrieze A, Out C, Fuentes S et al. Impact of oral vancomycin on gut microbiota, bile acid metabolism, and insulin sensitivity. *J. Hepatol.* 2014, 60:824–831.
33. Fang S, Suh JM, Reilly SM et al. Intestinal FXR agonism promotes adipose tissue browning and reduces obesity and insulin resistance. *Nat. Med.* 2015, 21:159–165.
- Intestine-specific pharmacological FXR activation confers beneficial metabolic effects in the liver (glucose production) and adipose tissue browning. The authors propose that activation of FXR in the intestine has beneficial metabolic effects.
34. Broeders EPM, Nascimento EBM, Havekes B et al. The Bile Acid Chenodeoxycholic Acid Increases Human Brown Adipose Tissue Activity. *Cell Metab.* 2015, 22:418-26.
- TGR5 activation by CDCA treatment rapidly increases brown adipose tissue activity and promotes energy expenditure in healthy humans via mitochondrial uncoupling in adipocytes. This clinical study provides a proof of concept that energy expenditure can be stimulated by BA in humans, as previously shown in the mouse.
35. Reue K, Lee JM, Vergnes L. Regulation of bile acid homeostasis by the intestinal Diet1-FGF15/19 axis. *Curr Opin Lipidol.* 2014, 25:140-7.
36. Gerhard GS, Styer AM, Wood GC et al. A role for fibroblast growth factor 19 and bile acids in diabetes remission after Roux-en-Y gastric bypass. *Diabetes Care* 2013, 36:1859–1864.
37. Kir S, Beddow SA, Samuel VT et al. FGF19 as a postprandial, insulin-independent activator of hepatic protein and glycogen synthesis. *Science* 2011, 331:1621–1624.
38. Morton GJ, Matsen ME, Bracy DP et al. FGF19 action in the brain induces insulin-independent glucose lowering. *J. Clin. Invest.* 2013, 123:4799–4808.

39. Liu WY, Xie D-M, Zhu GQ et al. Targeting fibroblast growth factor 19 in liver disease: a potential biomarker and therapeutic target. *Expert Opin. Ther. Targets* 2015, 19:675–685.
40. Rysz J, Gluba-Brzózka A, Mikhailidis DP, Banach M. Fibroblast growth factor 19-targeted therapies for the treatment of metabolic disease. *Expert Opin. Investig. Drugs* 2015, 24:603–610.
41. Chennamsetty I, Claudel T, Kostner KM et al. FGF19 signaling cascade suppresses APOA gene expression. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2012, 32:1220–1227.
42. Gutierrez A, Ratliff EP, Andres AM et al. Bile acids decrease hepatic paraoxonase 1 expression and plasma high-density lipoprotein levels via FXR-mediated signaling of FGFR4. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2006, 26:301–306.
43. Hyeon J, Ahn S, Lee JJ et al. Expression of fibroblast growth factor 19 is associated with recurrence and poor prognosis of hepatocellular carcinoma. *Dig. Dis. Sci.* 2013, 58:1916–1922.
44. Miura S, Mitsushashi N, Shimizu H et al. Fibroblast growth factor 19 expression correlates with tumor progression and poorer prognosis of hepatocellular carcinoma. *BMC Cancer* 2012, 12:56-71.
45. Beysen C, Murphy EJ, Deines K 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* 2012, 55:432–442.
46. Li L, Liu H, Peng J et al. Farnesoid X receptor up-regulates expression of lipid transfer inhibitor protein in liver cells and mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2013, 441:880–885.
47. Neuschwander-Tetri BA, Loomba R, Sanyal AJ et al. Farnesoid X nuclear receptor ligand obeticholic acid for non-cirrhotic, non-alcoholic steatohepatitis (FLINT): a multicentre, randomised, placebo-controlled trial. *Lancet Lond. Engl.* 2015, 385:956–965.
- Obeticholic acid treatment of NASH patients for 72 weeks significantly decreases the NAFLD Activity Score (NAS) assessed by histological analysis of liver biopsies, without inducing the resolution of NASH. However, increased total cholesterol, LDL-cholesterol and insulin resistance, which are CVRFs, were observed also.
48. Out C, Groen AK, Brufau G. Bile acid sequestrants: more than simple resins. *Curr. Opin. Lipidol.* 2012, 23:43–55.
49. Pols TWH, Nomura M, Harach T et al. TGR5 activation inhibits atherosclerosis by reducing macrophage inflammation and lipid loading. *Cell Metab.* 2011, 14:747–757.
50. Miyazaki-Anzai S, Masuda M, Levi M et al. Dual activation of the bile acid nuclear receptor FXR and G-protein-coupled receptor TGR5 protects mice against atherosclerosis. *PLoS One* 2014, 9:e108270.
51. Porez G, Prawitt J, Gross B, Staels B. Bile acid receptors as targets for the treatment of dyslipidemia and cardiovascular disease. *J Lipid Res.* 2012, 53:1723-37.
52. Le TA, Chen J, Changchien C et al. Effect of colessevelam on liver fat quantified by magnetic resonance in nonalcoholic steatohepatitis: a randomized controlled trial. *Hepatology* 2012, 56:922–932.

Figure legends

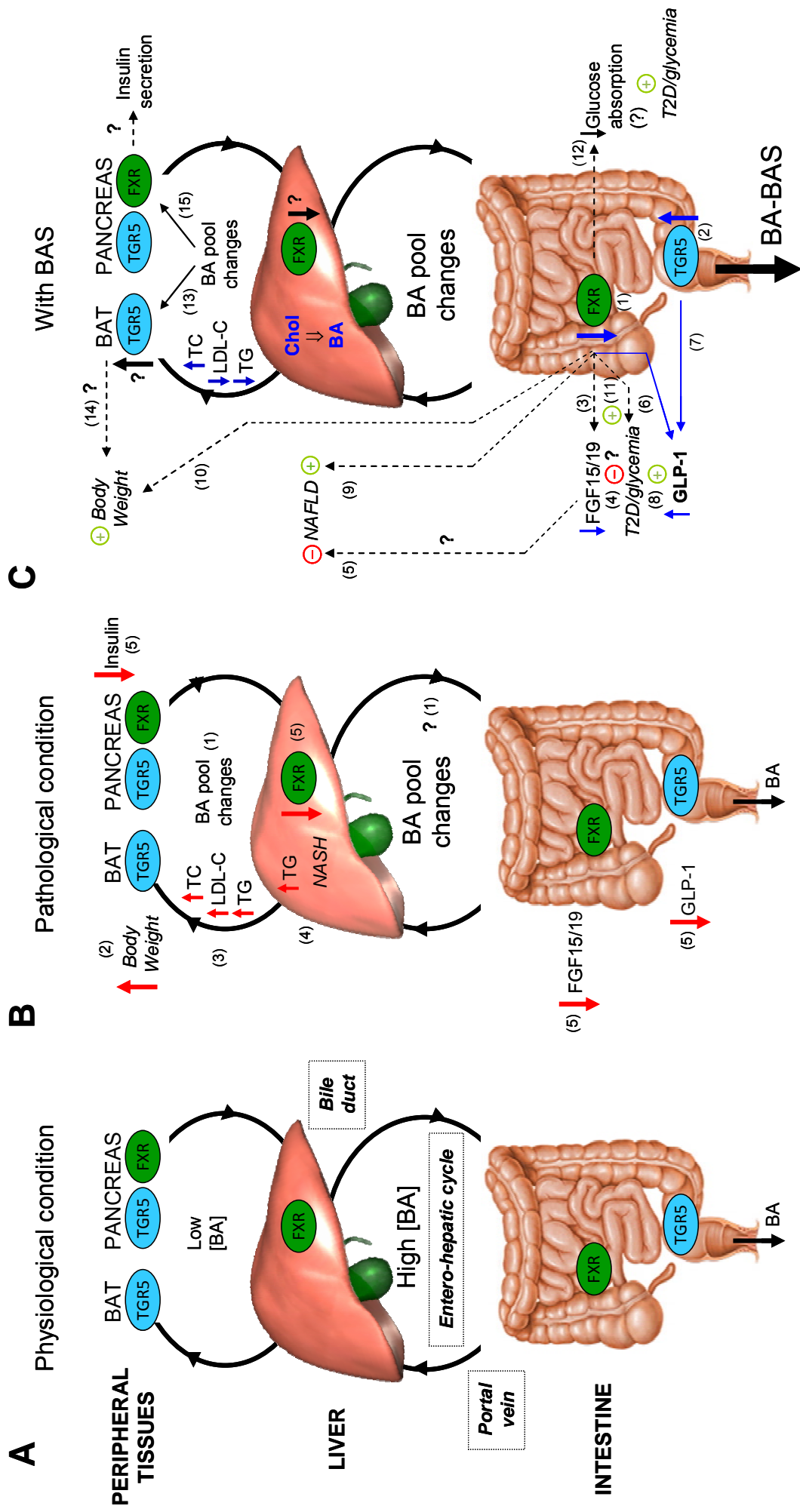
Figure 1. A. Entero-hepatic circulation of BA. BA are synthesized and conjugated in the liver, stored in the gallbladder, and secreted in the duodenum via the bile duct after meal ingestion. They are modified by the intestinal gut flora, reabsorbed in the intestine and transported back to the liver by the portal vein. A small

fraction of BA escapes and reaches peripheral organs. BA concentrations within the entero-hepatic cycle are in the order of mM in bile and μM in portal vein, whereas only in the low μM in systemic blood. In physiological conditions, BA control the energy balance via FXR and TGR5 in entero-hepatic and peripheral organs. **B. Alterations of BA metabolism and metabolic parameters in the pathological condition of the metabolic syndrome.** Metabolic alterations are associated with quantitative/qualitative perturbations of the BA pool (1), obesity (2), dyslipidemia (high TC, LDL-C and TG plasma concentrations) (3), NAFLD/NASH (increased hepatic TG and NASH) (4), diabetes (insulin resistance and decreased insulinemia, decreased GLP-1 and FGF19, and decreased hepatic FXR expression in mice) (5). **Red Arrows:** alterations characterising metabolic pathological conditions. **C. Effect of BAS on CVRFs via action on FXR and TGR5 in entero-hepatic tissues.** BA sequestration inactivates FXR (1) and may activate TGR5 (2) in the intestine. FXR inactivation decreases the production of FGF15/19 (3), which may limit potential positive metabolic effects of FGF19 on T2D (4) and NAFLD (5). Both FXR inactivation (6) and TGR5 activation (7) increase GLP-1 production, improving glucose control (8). Intestinal FXR inactivation protects from NAFLD (9), body weight gain (10), glucose intolerance (11) and may retard intestinal glucose absorption (12). BAS treatment changes systemic BA pool composition and hence likely FXR and TGR5 activity. This may impact on BAT energy expenditure via TGR5 activation (13) improving body weight control (14), and insulin secretion from the pancreas (15) in addition to the stimulation of insulin secretion due to the increased GLP-1. **Blue arrows:** BAS known effects. **Dotted arrows:** putative effects of intestinal action of BAS on CVRFs, based on animals studies. **Black arrows:** putative consequences of BAS treatment on peripheral tissues. **Question marks:** hypothetical action which would need further studies.

Key bullet points

- BAS exert beneficial effects on cardiovascular risk factors by decreasing LDL-C, total cholesterol and improving glucose control in T2D.
- The beneficial effects on T2D are at least in part due to increased BAS-induced GLP-1 production by enteroendocrine intestinal cells, occurring through combined FXR repression in the ileum and TGR5 activation in the colon.
- BAS could also control metabolism by deactivating FXR in the liver, which may enhance glucose utilization, lipogenesis and steatosis.
- FXR and/or TGR5 activity in the intestine impacts on BA pool composition resulting in metabolic effects not only in entero-hepatic tissues, but also in peripheral organs, especially adipose tissues, thus impacting whole body metabolism.
- BAS decrease cardiovascular events in hypercholesterolemic patients, while their effects on morbidity and mortality in type 2 diabetic patients remain to be established.

Figure 1



2. LE RECEPTEUR NUCLEAIRE FXR

2.1. Généralités sur les récepteurs nucléaires

Les récepteurs nucléaires (RNs) sont des protéines intracellulaires qui agissent comme médiateurs de la traduction des signaux métaboliques ou hormonaux pour la régulation de l'expression génique. Leur action est fondamentale dans le développement embryonnaire, le maintien du phénotype des cellules différenciées, la reproduction, la détoxification, les processus inflammatoires, le métabolisme, la prolifération cellulaire et la mort cellulaire programmée. Pour ces raisons, les dysfonctions dans les voies de signalisation des RNs peuvent conduire aux troubles prolifératifs, reproductifs et métaboliques tels que le cancer, l'infertilité, l'obésité et le diabète.

2.1.1. Classification des récepteurs nucléaires

L'ensemble des RNs constitue une super-famille de facteurs de transcription activés par des ligands, comprenant 48 membres pour lesquels différentes classifications existent.

➤ Classification phylogénétique

La classification la plus couramment utilisée a été adoptée par l' *International Union of Basic and Clinical Pharmacology Committee on Receptor Nomenclature and Drug Classification* (NC-IUPHAR) en 1999 pour faciliter l'identification de nouveaux RNs au niveau mondial, et représente la nomenclature officielle (Germain et al. 2006). Ce système est basé sur l'existence de 6 classes, de taille différente, établies sur l'évolution du domaine de fixation à l'ADN et du domaine de fixation au ligand. Chaque récepteur nucléaire est décrit par les lettres "NR" suivies par le numéro de la superfamille d'appartenance, le groupe (une lettre majuscule) et le numéro du gène dans le groupe.

Sous-famille 1: RNs qui forment des hétérodimers avec RXR

Groupe A: Récepteur des hormones thyroïdiennes (Hormone thyroïdienne)

1: Récepteur des hormones thyroïdiennes- α (TR α ; NR1A1)

2: Récepteur des hormones thyroïdiennes- β (TR β ; NR1A2)

Groupe B: Récepteur de l'acide rétinoïque (Vitamine A et composants associés)

1: Récepteur de l'acide rétinoïque- α (RAR α ; NR1B1)

2: Récepteur de l'acide rétinoïque- β (RAR β ; NR1B2)

3: Récepteur de l'acide rétinoïque- γ (RAR γ ; NR1B3)

Groupe C: Peroxisome proliferator-activated receptor

1: Peroxisome proliferator-activated receptor- α (PPAR α ; NR1C1)

2: Peroxisome proliferator-activated receptor- β (PPAR β ; NR1C2)

3: Peroxisome proliferator-activated receptor- γ (PPAR γ ; NR1C3)

Groupe D: Rev-erb

1: Rev-erba (Rev-erba; NR1D1)

2: Rev-erb β (Rev-erb β ; NR1D2)

3: E75 (E75; NR1D3)

Groupe E: Récepteur de la drosophile

1: E78 (E78; NR1E1)

Groupe F: Retinoid-related orphan receptor

1: Retinoid-related orphan receptor- α (ROR α ; NR1F1)

2: Retinoid-related orphan receptor- β (ROR β ; NR1F2)

3: Retinoid-related orphan receptor- γ (ROR γ ; NR1F3)

4: HR3 et CNR3 (NR1F4)

Groupe G: Récepteur de Caenorhabditis elegans

1: CNR14 (CNR14; NR1G1)

Groupe H: Liver X receptor-like

1: Récepteur de l'ecdysone (EcR; NR1H1)

2: Liver X receptor- β ou Récepteur β à l'oxystérol (LXR β ; NR1H2)

3: Liver X receptor- α ou Récepteur α à l'oxystérol (LXR α ; NR1H3)

4: **Farnesoid X receptor (FXR; NR1H4)**

Groupe I: Récepteur de la famille vitamine D

1: Récepteur de la vitamine D (VDR; NR1I1) (vitamine D)

2: Pregnane X receptor (PXR; NR1I2)

3: Constitutive androstane receptor (CAR; NR1I3)

Groupe J: Récepteur de la drosophile

1: DHR96 (DHR96; NR1J1)

Sous famille 2: Retinoid X Receptor-like

Groupe A: Hepatocyte nuclear factor-4 (HNF4)

1: Hepatocyte nuclear factor-4- α (HNF4 α ; NR2A1)

2: Hepatocyte nuclear factor-4- γ (HNF4 γ ; NR2A2)

Groupe B: Retinoid X receptor (RXR α)

- 1: Retinoid X receptor- α (RXR α ; NR2B1)
- 2: Retinoid X receptor- β (RXR β ; NR2B2)
- 3: Retinoid X receptor- γ (RXR γ ; NR2B3)
- 4: Ultraspiracle (Usp; NR2B4)

Groupe C: Récepteur testiculaire

- 1: Récepteur testiculaire 2 (TR2; NR2C1)
- 2: Récepteur testiculaire 4 (TR4; NR2C2)

Groupe E: TLX/PNR

- 1: Homologue humain du gène de Drosophile tailless (TLX; NR2E1)
- 2: Gène de drosophile tailless (TLL; NR2E2)
- 3: Photoreceptor-Specific Nuclear Receptor (PNR; NR2E3)

Groupe F: COUP/EAR

- 1: Chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factor I (COUP-TFI; NR2F1)
- 2: Chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factor II (COUP-TFII; NR2F2)
- 6: ERBA-related 2 (EAR2; NR2F6)

Sous Famille 3: Récepteur des hormones stéroïdes

Groupe A: Récepteur des œstrogènes (hormone sexuelle: Œstrogènes)

- 1: Récepteur des œstrogènes- α (ER α ; NR3A1)
- 2: Récepteur des œstrogènes- β (ER β ; NR3A2)

Groupe B: Estrogen related receptor

- 1: Estrogen related receptor- α (ERR α ; NR3B1)
- 2: Estrogen related receptor- β (ERR β ; NR3B2)
- 3: Estrogen related receptor- γ (ERR γ ; NR3B3)

Groupe C: Récepteurs des 3-ketostéroïdes

- 1: Récepteur des glucocorticoïdes (GR; NR3C1) (Cortisol)
- 2: Récepteur des minéralocorticoïdes (MR; NR3C2) (Aldostérone)
- 3: Récepteur de la progestérone (PR; NR3C3) (hormone sexuelle: Progestérone)
- 4: Récepteur des androgènes (AR; NR3C4) (hormone sexuelle: Testostérone)

Sous Famille 4: Nerve Growth Factor IB-like

Groupe A: NGFIB/NURR1/NOR1

- 1: Nerve Growth factor IB (NGFIB; NR4A1)

- 2: Nuclear receptor related 1 (NURR1; NR4A2)
- 3: Neuron-derived orphan receptor 1 (NOR1; NR4A3)

Sous Famille 5: Steroidogenic Factor-like

Groupe A: SF1/LRH1

- 1: Steroidogenic factor 1 (SF1; NR5A1)
- 2: Liver receptor homolog 1 (LRH1; NR5A2)

Groupe B: Récepteur de la drosophile

- 1: DHR39 (DHR39; NR5B1)

Sous Famille 6: Germ Cell Nuclear Factor-like

Groupe A: GCN1

- 1: Germ cell nuclear factor (GCN1; NR6A1)

Sous Famille 0: Miscellanées, comprends deux RNs qui manquent du DBD et ont donc une activité constitutivement négative.

Groupe B: DAX/SHP

- 1: DAX-1 (NR0B1)
- 2: Short heterodimer partner (SHP; NR0B2)

➤ **Classification de Mangelsdorf**

Cette classification ordonne les RNs sur la base de leur interaction avec l'ADN.

Classe I: RNs endocrines, récepteurs pour les hormones liposolubles et les vitamines qui activent la transcription en se dimérisant avec eux-mêmes (homodimères); ils agissent par fixation sur les régions d'ADN qui présentent une répétition inverse (palindrome) de la séquence AGGTCA séparée par un nombre variable de nucléotides (jusqu'à 5).

Classe II: RNs endocrines, récepteurs pour les hormones liposolubles et les vitamines qui se fixent à l'ADN sous forme d'hétérodimère avec le récepteur nucléaire Retinoid X Receptor (RXR); ils reconnaissent sur l'ADN la répétition directe de la séquence AGGTCA. Le RN **FXR** appartient à cette classe.

Classe III: RNs adoptés, récepteurs initialement identifiés par homologie de séquence avec les RNs endocrines et définis comme récepteurs orphelins, mais "de-orphanisés" après la découverte d'un ligand naturel; ils activent la transcription via la liaison à des séquences répétées d'ADN.

Classe IV: RNs orphelins, les récepteurs pour lesquels aucun ligand naturel ou synthétique n'a été encore identifié; ils agissent sous forme de monomère en reconnaissant des séquences d'ADN simples (TCAAGGTCA).

➤ **Classification physiologique**

Une autre façon de classer les RNs est basée sur leur fonction et leur profil d'expression. Sur la base de ces critères, deux grands groupes existent, chacun divisé en trois sous-groupes:

Groupe I: RNs impliqués dans la régulation des fonctions du système nerveux central et de la reproduction:

Groupe IA: différenciation sexuelle et biosynthèse des stéroïdes

Groupe IB: reproduction et développement

Groupe IC: régulation du métabolisme basal au niveau du SNC (système nerveux central), horloge circadienne

Groupe II: RNs impliqués dans la régulation du métabolisme et de l'homéostasie énergétique:

Groupe IIA: métabolisme des acides biliaires, des xénobiotiques et absorption des nutriments. Le RN **FXR** appartient à ce groupe.

Groupe IIB: métabolisme des lipides et de l'homéostasie énergétique

Groupe IIC: métabolisme du cholestérol et du glucose, stockage des lipides

2.1.2. La structure des récepteurs nucléaires

Tous les RNs ont en commun une structure modulaire composée de quatre régions (**Figure 10**):

- le domaine A/B, situé dans la partie N-term et contenant un site de transactivation indépendant du ligand, AF-1 (*activation function 1*);
- le domaine C, qui représente le site de liaison à l'ADN (DBD, *DNA Binding Domain*);
- le domaine D, qui sert de région charnière;
- le domaine E/F, qui constitue le site de liaison au ligand (LBD, *Ligand Binding Domain*) et de dimérisation, et qui contient un deuxième domaine de transactivation dépendant du ligand AF-2 (*activation function 2*).

La région A/B: Ce domaine est la région moins conservée parmi les RNs, avec une grande variabilité en termes de séquence primaire mais aussi de longueur. Plusieurs RNs présentent des différences de séquence en N-term spécifiques pour chaque isoforme, ce qui

pourrait induire différentes affinités de liaison aux éléments de réponse ou aux membres du complexe d'initiation de la transcription. Cette région contient un des sites d'activation de la transcription (AF-1), qui participe à l'activation du récepteur indépendamment de la présence du ligand. Cette région est le lieu de nombreuses modifications post-traductionnelles qui conditionnent la capacité du RN à répondre aux ligands, à transloquer au noyau et à interagir avec d'autres cofacteurs, ce qui en module l'activité (Onate et al. 1998; Hittelman et al. 1999; Tremblay et al. 1999).

La région C, site de liaison à l'ADN (DBD): Le DBD est le domaine le mieux conservé dans les RNs et c'est le responsable de la propriété des RNs de reconnaître et de se fixer à l'ADN sur des séquences nucléotidiques spécifiques du promoteur de leurs gènes cibles appelées éléments de réponse (ER) (Rastinejad et al. 1995). Le DBD est un domaine globulaire d'environ 66 acides aminés constitué par une paire d' α -hélices perpendiculaires (stabilisées par deux domaines de liaison au zinc (module à doigt de zinc)), un court feuillet- β et quelques acides aminés (Freedman et al. 1988; Härd et al. 1990) (**Figure 10**). L' α -hélice en N-term établit des contacts spécifiques avec l'ADN (spécificité jouée par un motif particulier appelé P box, (Pawlak et al. 2012), tandis que l' α -hélice en C-term participe à la stabilisation de la structure du DBD, et elle établit des contacts faibles et moins spécifiques avec l'ADN. Un *loop* de 5 acides aminés définit une surface de dimérisation (appelée D box). Le DBD peut être le lieu de modifications post-traductionnelles telle que la phosphorylation, modification qui peut avoir des effets sur la fixation à l'ADN et le recrutement des cofacteurs

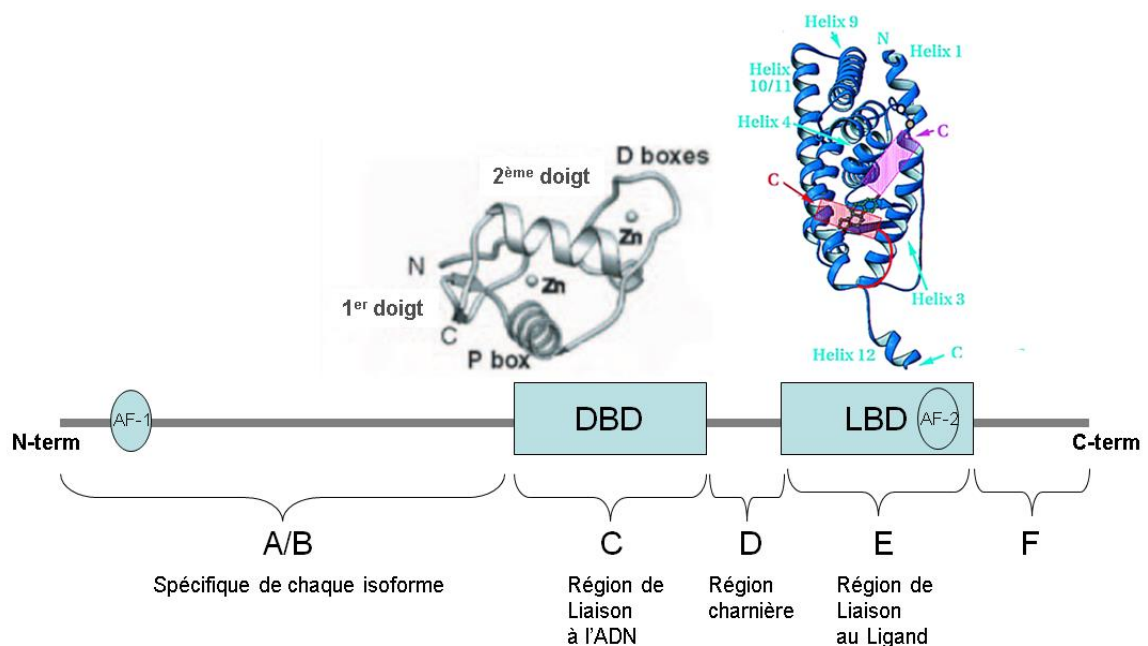


Figure 10. Représentation schématisée de la structure commune des récepteurs nucléaires (structures 3D adaptée de Tanenbaum 1998 et Germain 2006)

La région D, région charnière: Il s'agit d'une région très variable dans la superfamille des RNs. Elle correspond à la région située entre le DBD et le LBD, et est aussi appelée CTE, pour extension C-terminal du DBD. Sa structure est dotée d'une grande flexibilité car elle doit permettre la rotation du DBD afin qu'il puisse se lier aux éléments de réponse à la fois directs et inverses (Glass et McDonnell 2004). Outre ces propriétés structurales, cette région peut avoir des propriétés fonctionnelles impliquées dans la régulation de la localisation subcellulaire du RN, dans l'interaction avec les co-répresseurs, dans l'activité transcriptionnelle, la dimérisation des RNs et la sensibilité au ligand qui suivent les modifications post-traductionnelles de cette région (Pawlak et al. 2012).

La région E, site de liaison au ligand (LBD): Ce domaine est bien conservé dans les différents RNs, et comme son nom l'indique, il représente le site de fixation du ligand. Il est organisé en 12 α -hélices disposées en trois couches antiparallèles, dans lesquelles est inséré un β feuillet (S1- S2) (**Figure 10**) (Bain et al. 2007). Le LBD interagit avec le ligand par des acides aminés localisés dans les hélices 3, 5 ou 10/11 dans la plupart des RNs. Le ligand est stabilisé par des interactions de type hydrophobes, des liaisons hydrogène et sur la base de la forme et de la dimension du LBD (Germain et al. 2004). Ces paramètres varient en fonction des isoformes, ce qui permet de développer des ligands spécifiques pour chaque isoforme (de Lera et al. 2007). La liaison du ligand induit des modifications conformationnelles avec une réorganisation spatiale des hélices H3, H4, et H12. L'hélice 12 est stabilisée contre le "core" du LBD, ce qui conduit à la formation d'une poche hydrophobe avec les hélices H12, H3, H4 et H5 (conformation en rouge, **Figure 10**). C'est cette structure qui permet l'interaction du LBD avec une séquence peptidique spécifique appelée "NR box" retrouvée dans de nombreux coactivateurs des RNs, qui se compose d'un motif Leu-X-X-Leu-Leu (LXXLL) (Heery et al. 1997). La région E est aussi impliquée dans la dimérisation du récepteur (grâce à la présence de l'interface de dimérisation, ou DD, impliquée dans l'interaction avec les LBDs d'autres protéines) et l'interaction avec les cofacteurs. Cette dernière fonction implique la deuxième séquence d'activation transcriptionnelle (AF-2), localisée dans la partie C-terminale du LBD, qui, à la différence de l'AF-1, est dépendante de la présence du ligand. Le ligand induit une variation conformationnelle dans le LBD, ce qui est considéré comme la manifestation structurelle de la fonction de transactivation des RNs. La transactivation dépendante du ligand implique le recrutement de coactivateurs, et le AF-2 joue un rôle fondamental dans ce processus. La liaison avec des molécules agonistes crée la formation d'une interface favorisant l'interaction avec les coactivateurs, tandis que la liaison avec des

antagonistes induit la formation d'une interface non fonctionnelle qui empêche l'interaction avec les coactivateurs et favorise la fixation des corépresseurs.

La région F: Ce domaine suit le LBD et représente la région C-terminale du RN. Sa structure et sa fonction sont peu connues car il présente une très grande variabilité de longueur (peut varier de 0 à 80 acides aminés) et de séquence. Il n'a pas une activité propre et il n'est pas indispensable pour la liaison au ligand ou l'activité transcriptionnelle, par contre il semble moduler l'activité du récepteur et l'interaction avec les corégulateurs (Pawlak et al. 2012). Les modifications post-traductionnelles de type phosphorylation et O-GlcNAcylation sur ce domaine modulent l'activité du récepteur.

2.1.3. Les mécanismes d'activation des récepteurs nucléaires

Comme précédemment mentionné, les RNs agissent comme modulateurs de la transcription en reconnaissant et en se fixant sous forme de monomère ou de (homo- ou hétéro-)dimères sur des ERs spécifiques. Les ERs sont des séquences géniques composées de un ou deux motifs de 6 nucléotides séparés par une séquence nucléotidique variable. Leur unicité est dictée par la composition nucléotidique de la séquence des deux héli-sites, leur orientation, la longueur et la composition de la séquence séparatrice. Il existe ainsi des ERs composés de séquences répétées palindromes, directes, inversées, éversées, séparées par un nombre variable de nucléotides, qui peuvent être localisées dans les alentours du promoteur du gène cible, mais aussi dans l'*enhancer* du gène à quelques kilobases en amont du site d'initiation de la transcription, ou encore dans les régions introniques (Pawlak et al. 2012). Les RNs peuvent avoir un effet de régulation positive (transactivation) ou négative (transrépression), de concert avec des complexes transcriptionnels multiprotéiques spécifiques de chaque type cellulaire, connus sous le nom de *cofacteurs*, plus spécifiquement coactivateurs ou corepresseurs, recrutés sur la base des changements conformationnels du RN induits par le ligand.

La transactivation: La transactivation est la propriété d'un RN d'induire la transcription génique, qui pour être effective exige la formation d'un complexe de transcription dont font partie l'ARN polymérase II et les coactivateurs (CoAs). A l'heure actuelle, plus de 350 CoAs différents ont été identifiés, connus pour leur activité enzymatique qui comprend un spectre de fonctions: de la régulation de la modification des histones et de la chromatine, à la régulation de l'initiation de la transcription, l'élongation des transcrits

d'ARN ou de l'épissage des ARN messenger, l'adressage au protéasome des complexes de RNs. Ils sont divisés en CoAs primaires, qui interagissent directement avec les RNs par leurs régions AF-1 et AF-2 (tels que les coactivateurs du complexe HAT, voir la suite), et CoAs secondaires, qui se fixent sur les CoAs primaires (Métivier et al. 2003). Leur influence sur le contrôle de l'activité d'un RN est modulée par les niveaux d'expression cellule-spécifiques et par les modifications post-transcriptionnelles qu'ils peuvent subir (Han et al. 2009; Lonard et al. 2010). La liaison des CoAs avec les RNs se fait suite à la variation conformationnelle induite par la fixation du ligand. Actuellement, trois complexes principaux de CoAs ont été identifiés:

- Le **complexe HAT** (*Histone Acetyl Transferase*), conduit à l'acétylation des histones par recrutement des coactivateurs SRC (*Steroid Receptor Coactivator*), CBP (*cAMP Response Element-Binding Protein*) et p300 (McKenna et O'Malley 2002) qui ont une activité acétyl transférase, ce qui décompacte la chromatine en permettant ainsi au complexe d'initiation de la transcription de se fixer au promoteur. Ces enzymes se fixent aux RNs par l'interaction du "NR box" au LBD du RN (Heery et al. 1997), interaction possible après la liaison du ligand à son RN.

- Le **complexe SWI/SNF** (*Switch/Sucrose Nonfermentable*), qui joue un rôle important dans le remodelage de la chromatine. Il modifie les interactions entre les histones et l'ADN en augmentant l'accessibilité du promoteur aux facteurs de transcription et à l'ARN polymérase (Xi et al. 2008; Hargreaves et Crabtree 2011).

- Le **complexe TRAP/DRIP** (*Thyroid Hormone Receptor-associated Proteins/Vitamin D Receptor Interacting Protein*) qui permet le recrutement et la modulation de la machinerie transcriptionnelle. Il catalyse la formation du complexe de pré-initiation (PIC) de la transcription sur le promoteur activé, et il interagit directement avec l'ARN polymérase II, certains facteurs de transcription (TFIID, TFIIH) ou d'élongation (Ito et Roeder 2001; Conaway et Conaway 2013).

La transrepression: En absence de ligand, les RNs peuvent soit être localisés dans le cytoplasme, associés à des protéines HSPs (Heat Shock Proteins, (Pratt et Toft 1997), soit être liés à leurs ERs sur le génome, associés à des corépresseurs (coRs) transcriptionnels qui empêchent la formation du complexe de transcription. Dans la classe des coRs on retrouve SMRT (pour *Silencing Mediator for Retinoid and Thyroid hormon receptor*), et les NCoR (*Nuclear Receptor Corepresseur*) 1 et 2. Ces protéines fixent le RN grâce à l'interaction d'une séquence particulière appelée "coRNR box" (similaire à la "NR box" des coAs) (Hu

et Lazar 1999; Hu et al. 2001) avec la poche hydrophobe du LBD du RN, tandis que les séquences flanquant la “CoRNR box” déterminent la spécificité du coR pour le RN. Sur les corépresseurs SMRT/NCoR s’assemblent les coRs HDAC3, GPS2, TBL1 avec formation du complexe de corepression. La formation de ce complexe n’a pas lieu quand le RN fixe son ligand: la modification conformationnelle du RN se traduit alors par le changement du positionnement de l’hélice 12 et avec le masquage de l’interface du site de fixation du coR. Le RN passe alors de son état d’inactivation par liaison aux corépresseurs à son état d’activation dépendante du ligand (Hu et Lazar 1999).

La liaison d’un RN à ses coRs en absence de ligand n’est pas la seule façon par laquelle les RNs peuvent exercer une action de contrôle négatif de la transcription. En effet, il existe des RNs qui répriment la transcription de leurs gènes cibles par fixation à des éléments de réponse négatifs, après liaison à leurs ligands, comme montré pour le récepteur aux glucocorticoïdes et à l’hormone thyroïdienne (Sakai et al. 1988; Chatterjee et al. 1989).

Il existe un troisième mécanisme de régulation négative de la transcription, définie comme “*tethered transrepression*”. Cela implique un *crosstalk* négatif entre la forme du RN activé par le ligand et d’autres facteurs de transcription tels que NF- κ B, AP-1 (*Activator Protein-1*) ou STAT (*Signal Transducers and Activators of Transcription*) (Delerive et al. 1999a, 1999b; Yang et al. 2000).

Les effets non-génomiques des récepteurs nucléaires: Il a été démontré que certains RNs peuvent exercer leur activité par une action rapide et transitoire d’activation de cascades de kinases, ce qui serait en cohérence avec une localisation à proximité de la membrane cellulaire, même si ce dernier point est encore l’objet de discussions. Parmi les exemples de ce type d’activité on retrouve l’interaction du récepteur aux oestrogènes (RE) avec les complexes Src/p21ras/Erk et PI3K/Akt, mécanismes observés dans la prolifération cellulaire du cancer du sein et dans la fonction vasculaire (Pawlak et al. 2012). Autres exemples, la voie de signalisation du récepteur aux glucocorticoïdes (GR) passe par l’activation de la phospholipase A2 (Croxtall et al. 2000), ou encore le récepteur à l’acide rétinoïque (RAR), qui est localisé au niveau de la membrane plasmique en association à PI3K ou Src (Rochette-Egly et Germain 2009).

Plus récemment, il a été montré que FXR régule la sécrétion d’insuline dans les îlots pancréatiques par des effets non génomiques (Düfer et al. 2012). Cet aspect sera traité dans le paragraphe 2.3.4.

La régulation post-transcriptionnelle des RNs: Une modification post-traductionnelle (MPT) est une modification chimique d'une protéine après sa traduction, qui représente souvent la dernière étape de sa biosynthèse. Des exemples de MPT sont le clivage d'une partie de la protéine grâce à l'action d'une protéase, la formation de pont disulfures, ou l'addition de groupes fonctionnels de différente nature chimique (groupes hydroxyles, acétyles, alkyles, groupes phosphate, groupes glucidiques (O-GlucNAcyl), lipidiques) ou d'un groupe peptidique (sumoylation, ubiquitination et neddylation). La fonction de ces modifications est d'augmenter la stabilité de la protéine, de l'adresser à un compartiment cellulaire spécifique, comme aussi au protéasome en favorisant sa dégradation, de modifier son état d'activation et de sa capacité d'interaction avec d'autres protéines et, dans le cas des RNs, avec l'ADN. L'ensemble de ces fonctions rend nécessaire une régulation fine des MPTs, impliquées dans nombreuses voies de signalisation et particulièrement dans la régulation des RNs.

2.2. Le Récepteur Nucléaire FXR

2.2.1. Découverte et caractéristiques de FXR

La toute première identification du RN FXR remonte à la recherche des protéines qui interagissent avec le domaine de liaison au ligand du récepteur humain RXR α , ce que lui a conféré un premier nom de RIP-14 (RXR interacting protein number 14) (Seol et al. 1995). Plus tard, *Forman et al.* ont montré que le FXR chez le rat pouvait être activé par des concentrations supraphysiologiques de farnésol (un intermédiaire dans la voie de biosynthèse du cholestérol) (Forman et al. 1995), ce qui lui a conféré le nom de Farnesoid X Receptor. La véritable dé-orphanisation du récepteur a eu lieu en 1999, quand les acides biliaires ont été montrés pour être les ligands endogènes de FXR (Makishima et al. 1999; Parks et al. 1999; Wang et al. 1999a), qui à partir de ce moment là est connu aussi sous le nom de Bile Acid Receptor (BAR), même s'il a conservé le nom plus commun de FXR.

Chez les rongeurs (souris, rat, hamster) et chez l'Homme, FXR est codé par un gène unique (FXR α , NR1H4) dont l'épissage alternatif conduit à la formation de quatre isoformes notées FXR α 1, FXR α 2, FXR α 3, FXR α 4 (**Figure 11**). Un deuxième gène codant pour FXR génère un produit activé par le lanostérol (FXR β , NR1H5). Il s'agit d'un récepteur fonctionnel chez la souris, le rat, le lapin et le chien, mais qui est un pseudogène chez l'Homme et les primates (Otte et al. 2003).

Le gène de FXR se compose de 11 exons et de 10 introns (**Figure 11A**). Son expression est sous la dépendance de deux promoteurs: le premier, situé en amont de l'exon 1, régule l'expression des isoformes FXR α 1 et FXR α 2, et le deuxième, localisé en amont de l'exon 3, régule l'expression des isoformes FXR α 3 et FXR α 4 (**Figure 11B**). A la différence des isoformes α 2 et α 4, les isoformes α 1 et α 3 contiennent, au niveau de la région charnière, une insertion de 4 résidus d'acides aminés (Met-Tyr-Thr-Gly, (Huber et al. 2002), due à la présence d'un site d'épissage alternatif localisé en aval de l'exon 5. Les 4 isoformes sont assez conservées dans les différentes espèces (souris, rat, hamster, Homme).

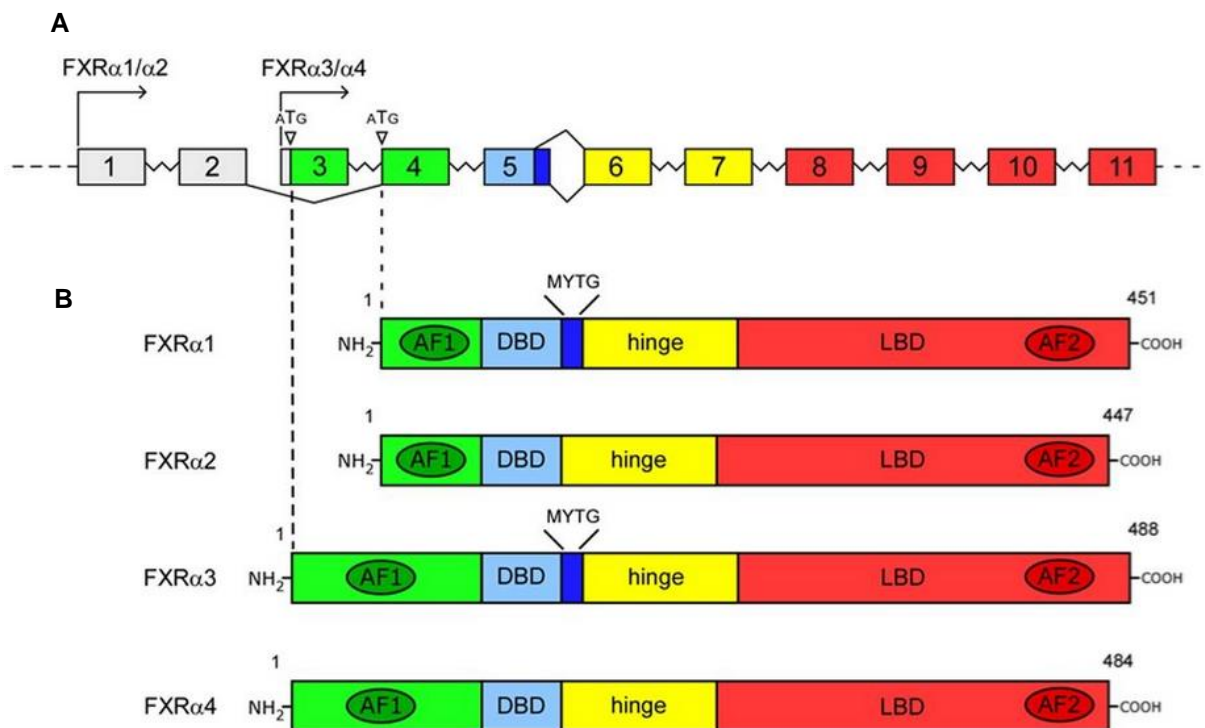


Figure 11. A. Structure du gène codant pour FXR **B.** Représentation schématique des isoformes de FXR classées en fonction de la présence (FXR α 3, FXR α 4) ou pas (FXR α 1, FXR α 2) des exons 1 et 2 dans la région initiale de l'ARN messager, et sur la présence (FXR α 1, FXR α 3) ou pas (FXR α 2, FXR α 4) de la séquence d'acides aminés MYTG dans l'exon 5. AF1 et AF2: domaines de transactivation indépendant et dépendant du ligand, respectivement; DBD: DNA binding domain; Hinge: région charnière, LBD: ligand binding domain (Modica 2010).

Les organes où FXR est le plus exprimé sont le foie et l'intestin, les glandes surrénales et les reins, mais il est aussi présent dans le pancréas, et dans une moindre mesure le tissu adipeux, le cœur, les poumons, l'estomac et le cerveau. Le profil d'expression des isoformes de FXR varie en fonction des organes. Ainsi, dans le foie, les isoformes FXR α 1 et α 2 sont les plus exprimées, tandis que dans l'intestin on retrouve plutôt les isoformes FXR α 3 et α 4.

Après liaison d'un agoniste sur le LBD, la forme activée de FXR exerce son activité de transactivation en se liant à des éléments de réponse spécifiques (FXRE) soit en forme hétérodimerique avec le récepteur nucléaire RXR (Retinoic X Receptor) soit en forme monomérique (Claudel et al. 2005). La plupart des FXRE sont des séquences répétées directes (DR: AGGTCA ou AGAACA) ou répétées inversées (ex. IR-1: AGGTCA-N-TGACCT) (Laffitte et al. 2000).

2.2.2. Les modulateurs de l'activité de FXR

Les ligands naturels, les acides biliaires: Les ligands naturels de FXR sont les ABs. Toutes les espèces ne l'activent pas avec la même puissance. La capacité d'un AB à activer FXR dépend de ses caractéristiques chimiques, en particulier de ses propriétés d'hydrophobicité, car les ABs interagissent par leur face convexe hydrophobe avec la poche hydrophobe du LBD du récepteur (Mi et al. 2003).

La capacité d'un AB à induire le recrutement des coactivateurs au niveau du LBD définit ses propriétés agoniste ou antagoniste. Ainsi, le CDCA (**Figure 12**) est l'AB avec la plus grande capacité d'activation de FXR ($EC_{50}=50\mu\text{M}$ chez la souris et $10\mu\text{M}$ chez l'Homme selon des études de transactivation *in vitro*), suivi par le DCA, le CA et le LCA (Makishima et al. 1999; Parks et al. 1999). Selon les auteurs, les formes tauro- et glyco-conjuguées de ces espèces ont la même capacité ou une capacité plus forte d'activer FXR que leurs formes libres. Des plasmides composés par une séquence codante après un FXRE (plasmide "reporter"), ont été transfectés dans une lignée cellulaire pour tester la capacité de chaque AB à induire la transcription du gène. Certaines analyses ont indiqué que le CDCA est le ligand avec la capacité majeure d'activer FXR (Makishima et al. 1999), mais des tests de co-transfection du plasmide "reporter" avec un plasmide codant le transporteur aux ABs ont montré que les espèces conjuguées sont plus actives que les formes libres (Parks et al. 1999; Wang et al. 1999). Ce résultat indique que dans les premiers tests, l'incapacité des espèces conjuguées à activer FXR était causée par leur impossibilité à rentrer dans la cellule.

A l'inverse, le T α MCA et le T β MCA (espèces d'AB primaires exclusivement présentes chez le rongeur) et l'UDCA, ont une action antagoniste sur FXR, car ils diminuent l'activation des gènes cibles de FXR tels que SHP, FGF15, IBABP et Ost β en présence du ligand (Campana et al. 2005; Sayin et al. 2013; Hu et al. 2014; Mueller et al. 2015).

D'autres ligands naturels: Outre les ABs, il a été montré que l'**androstérone** et l'**éthiocholanolone**, catabolites de l'androgène, sont capables d'activer FXR (Howard et al.

2000; Wang et al. 2006a). De plus, certains **acides gras polyinsaturés** comme l'acide arachidonique, l'acide linoléique et l'acide docasahexaénoïque peuvent aussi activer FXR, avec une EC₅₀ chez l'humain comprise entre 0.9 et 4.7 μM (Zhao et al. 2004). Pour ces dernières molécules, il a été observé une capacité d'induire une activation sélective de certains gènes cibles de FXR, ce qui leur a attribué le nom de SBARMs (modulateur sélectifs des récepteurs des ABs).

Une autre molécule capable de moduler l'activité de FXR est le **guggulstérone**, un mélange de E- et Z-4,17 (20)-pregnadiene-3,16-dione, qui est le principe actif du guggulipide, un extrait de résine de *Commiphora mukul*, arbre utilisé depuis des siècles dans la médecine traditionnelle indienne pour améliorer un ensemble de désordres métaboliques, comme l'obésité et l'hyperlipidémie (Shishodia et al. 2008). Le guggulstérone interagit aussi avec des RNs endocriniens comme le AR (Androgen Receptor), le GR (Glucocorticoid Receptor), le PR (Progesteron Receptor), le MR (Mineralcorticoid Receptor), ERα (Estrogen Receptor α) et PXR (Urizar et al. 2002; Wu et al. 2002; Cui et al. 2003; Brobst et al. 2004; Burris et al. 2005). Initialement, cette substance a été montrée pour antagoniser l'activation de différents gènes cibles de FXR après activation par le CDCA *in vitro*, et il a été donc considéré comme un antagoniste de FXR. Cependant, d'autres études ont montré qu'il peut agir comme agoniste partiel de FXR (Cui et al. 2003).

Les ligands synthétiques et semi-synthétiques: La faible puissance des ABs sur FXR a rendu nécessaire le développement d'agonistes spécifiques et puissants, utilisables comme outils pharmacologiques *in vitro* et *in vivo* et potentiellement comme candidats-médicaments. L'agoniste synthétique de FXR par excellence est le **GW4064 (Figure 12)**, de structure non stéroïde, synthétisé à partir du TTNPB ([E]-4-4[2-(5, 6, 7, 8,-tetrahydro-5,5, 8,8-tetramethyl-2-naphthalenyl) propen-1-yl]-benzoic acid). Le GW4064 est un agoniste puissant actif sur FXR *in vitro* et *in vivo* (EC₅₀ ~90 nM pour FXR murin et humain) (Maloney et al. 2000), pour lequel une seule étude a montré une sélectivité autre que pour FXR (ERRα, estrogen receptor-related receptor α, (Dwivedi et al. 2011). Il est l'agoniste le plus utilisé dans les études de la fonction de FXR, mais sa faible biodisponibilité en a exclu l'utilisation en phase clinique (Lefebvre et al. 2009).

D'autres ligands synthétiques de FXR de structure non stéroïde sont la **fexaramine (Figure 12)**, hautement puissant dans l'activation de FXR humain avec une EC₅₀ de 38 nM

(Downes et al. 2003), et le **WAY-362450** (**Figure 12**), ligand spécifique et puissant pour FXR (EC50=4nM pour FXR humain) (Flatt et al. 2009).

Un autre agoniste de FXR, obtenu par introduction d'un alkyle en position 6 du CDCA, donc ligand semi-synthétique, est le composé **INT-747** (6-ECDCA, 6 α -ethyl-CDCA, acide obéticholique) (EC50=99 nM) (**Figure 12**) (Pellicciari et al. 2002) (§1.6.2).

Comme discuté dans le chapitre précédent, l'activité de FXR peut être aussi modulée par les **séquestrant des Acides Biliaires**. Leurs effets sont détaillés au paragraphe 1.5.1).

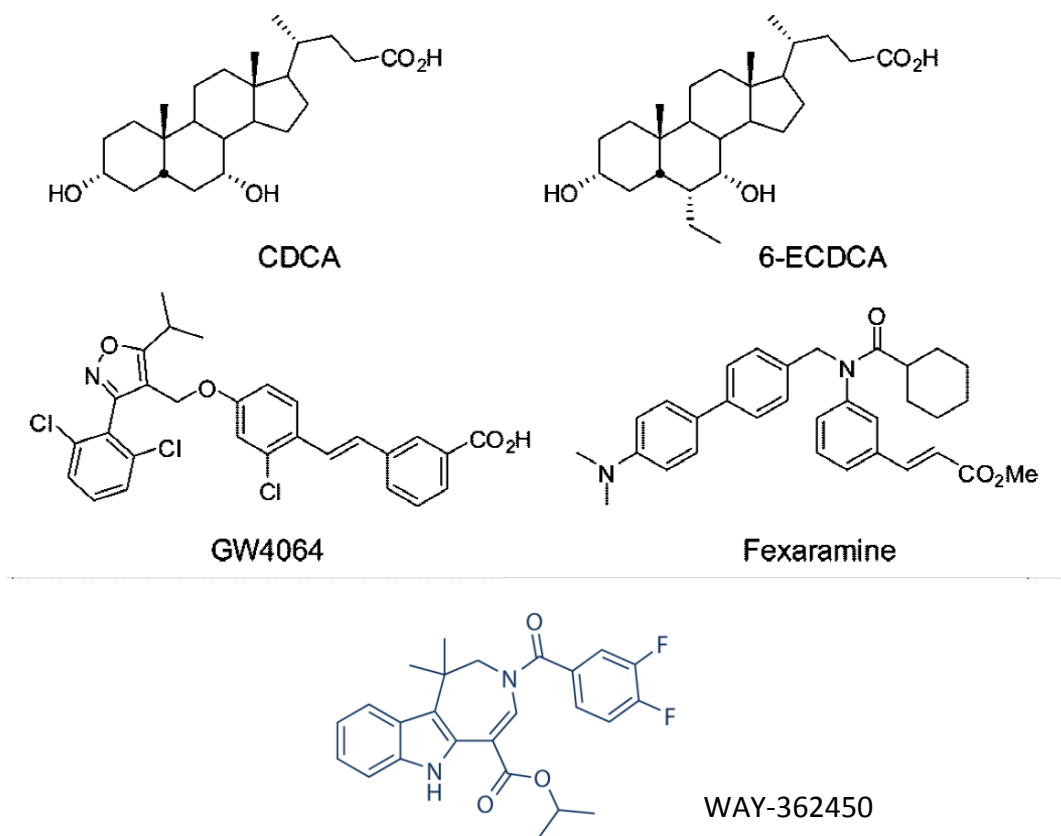


Figure 12. Exemples de ligands naturels (CDCA), semi-synthétiques (6-ECDCA) et synthétiques (GW4064, Fexaramine et WAY) de FXR (Adaptée de Flatt 2009)

2.2.3. Les modifications post-traductionnelles de FXR

L'activité de FXR peut être régulée par les nutriments et par l'état énergétique de la cellule *via* des modifications post-traductionnelles.

- **Phosphorylation**: en condition d'apport énergétique bas, l'activation de la voie de l'AMPK, dans l'ensemble des effets visant la production d'énergie, diminue l'activité transcriptionnelle de FXR. La phosphorylation de FXR sur la serine 250 par l'AMPK diminue la capacité de FXR à recruter les coAs, et donc son activité transcriptionnelle (Lien et al. 2014).

D'autre part, FXR est activé par la PKC α (protéine kinase C alpha dépendante du calcium) sur les sérines 135 et 154 du DBD (Gineste et al. 2008), et par la PKC ζ (protéine kinase zeta) sur la thréonine 422 (Frankenberg et al. 2008).

- **GlucNAcylation**: le glucose, en alimentant la voie de biosynthèse des hexosamine, active l'enzyme OGT (*O-linked N-acetylglucosamine transferase*), qui modifie le domaine AF-1 de FXR en catalysant sa GlcNAcylation (Berrabah et al. 2014) ce qui stabilise FXR, et augmente son activité.

- **Acétylation**: cette modification, induite par l'acétylase p300, augmente l'activité de FXR, et est nécessaire pour l'induction de SHP par FXR (Fang et al. 2008).

- **Sumoylation**: cette modification a lieu sur les lysines 122 et 275 dans le AF-1 et LBD respectivement. Elle inhibe la transcription en stabilisant le complexe de répression sur le promoteurs de certains gènes cibles, notamment ceux des cytokines (Balasubramaniyan et al. 2013).

2.3. L'action de FXR sur la régulation métabolique

2.3.1. FXR et le métabolisme des acides biliaires

Les ABs représentent la voie d'excrétion du cholestérol de l'organisme. Cependant, de part leur propriétés physico-chimiques de détergents, ils peuvent devenir toxiques pour la cellule et pour l'organisme s'ils sont produits en quantité excessive. Les étapes conduisant à leur synthèse nécessitent donc une régulation très contrôlée, qui est assurée par les ABs eux-mêmes *via* l'action de FXR.

Le rôle fondamental de FXR dans la régulation du métabolisme des ABs est prouvé par la souris FXRKO, qui présente un pool élevé d'ABs (Sinal et al. 2000). Il a été prouvé que la contribution de FXR au métabolisme des ABs se fait au niveau de la synthèse et au niveau de leur transport dans le cycle entero-hépatique.

Synthèse des ABs: FXR régule négativement la synthèse des ABs par une action hépatique et une action intestinale.

- Au **niveau hépatique**, la répression de la **Cyp7a1** par FXR est indirecte et régulée par:

A. L'induction de l'expression du gène de **SHP**, qui en formant un hétérodimère avec LRH-1 (facteur de transcription indispensable pour la synthèse des ABs) déstabilise sa

fixation et empêche ainsi le recrutement du complexe de transcription sur le promoteur du gène de la Cyp7a (Chiang et Stroup 1994; Stroup et al. 1997) (**Figure 13**);

B. L'induction de l'expression du gène de **MAFG** (pour v-Maf Avian Musculoaponeurotic Fibrosarcoma Oncogene Homolog G), récemment identifié comme cible directe de FXR (de Aguiar Vallim et al. 2015), qui code pour un facteur de transcription qui reconnaît ses éléments de réponse MARE (Maf Recognition Element) sur le promoteur des gènes de la biosynthèse des ABs et réprime leur expression, avec une diminution du pool des ABs et une variation de sa composition (de Aguiar Vallim et al. 2015) (**Figure 13**).

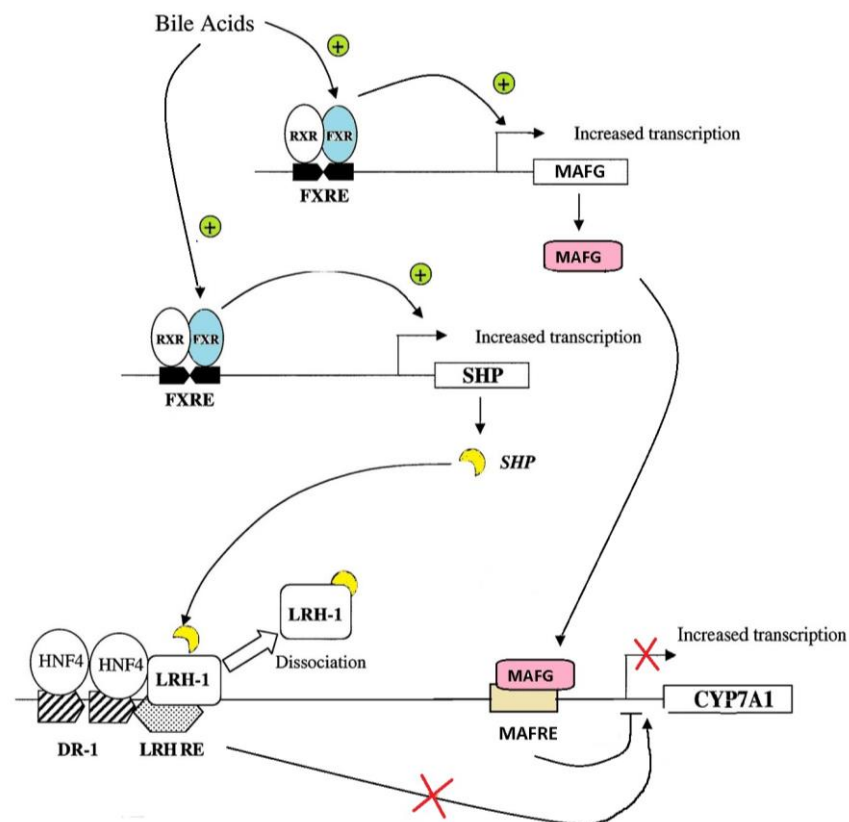


Figure 13. Mécanisme de contrôle de FXR sur l'expression de la Cyp7a1 par induction de SHP et de MAFG (Adaptée de Davis 2002)

Dans les étapes de synthèse des ABs, FXR réprime l'expression de la **Cyp8b1**, par la répression de HNF4α (*Hepatocyte nuclear factor 4α*) via SHP (Zhang et Chiang 2001) et par l'induction de MAFG (de Aguiar Vallim et al. 2015). D'autre part, FXR active la conjugaison des ABs par l'induction des deux enzymes BACS et BAAT (Pircher et al. 2003).

L'action de detoxification de FXR est obtenue aussi par son contrôle positif sur certaines des enzymes impliquées dans le métabolisme des xénobiotiques et des endobiotiques tels que la **Cyp3a4** et **Cyp3a11**, qui hydroxylient les ABs, ainsi que la **Sult1a2** et la **Sult2a1** (sulfotransférases) et **Ugt1a1** et **Ugt2b4** (glucuronosyltransférases), qui sulfatent

et glucuronident les ABs, respectivement (Song et al. 2001; Gnerre et al. 2004; Lee et al. 2010), augmentant leur hydrophilie et ainsi leur excrétion.

- Au **niveau intestinal**, FXR induit l'expression du gène codant **FGF15/19**, hormone transportée au foie par la veine porte, où il active le récepteur FGFR4 (Fibroblaste Growth Factor Receptor 4), en présence du corécepteur β Klotho. L'activation de FGFR4 conduit à l'inhibition de l'expression de la Cyp7a1. Cette régulation est assurée par la formation d'un complexe FRS2a/Shp2, qui, active d'une part la cascade de signalisation MAPK/ERK/Jnk (Song et al. 2009; Kong et al. 2012a; Li et al. 2014), et d'autre part des voies pas encore totalement élucidées mais qui impliquent, au moins en partie, la PKC (Li et al. 2014). Ces voies de signalisation augmentent la transcription de FXR et de SHP et entraînent ainsi la diminution de la Cyp7a1 (**Figure 14**).

En lien avec ce mécanisme, la déficience de FXR spécifiquement dans l'intestin cause une augmentation de la production d'ABs chez la souris (Stroeve et al. 2010).

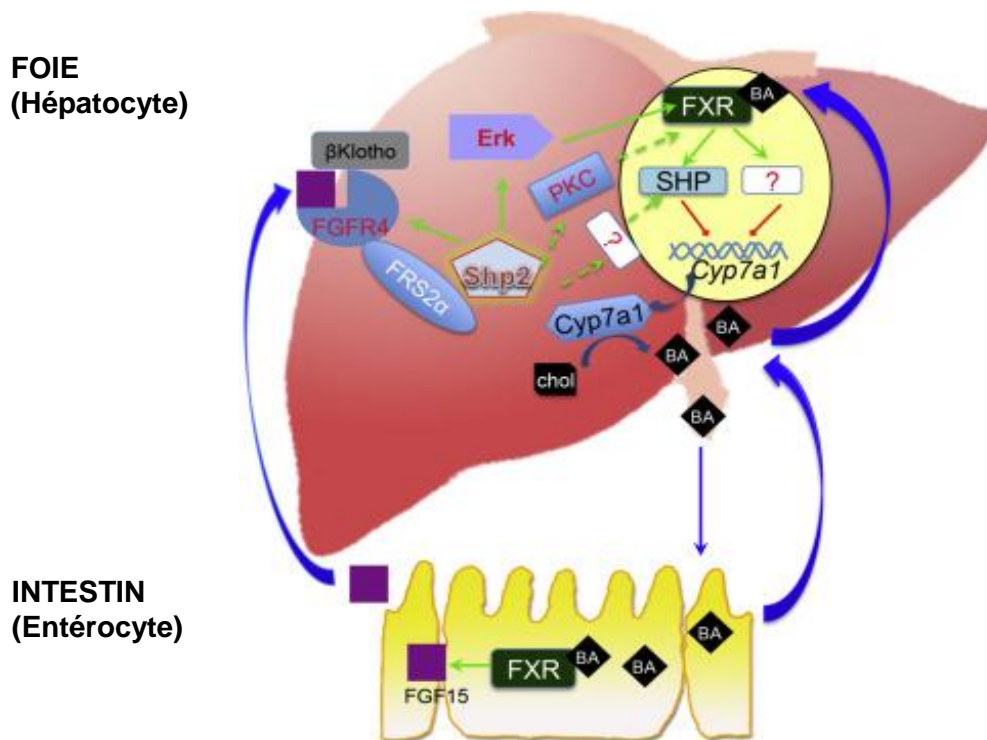


Figure 14. Mécanisme de contrôle de FXR intestinal sur l'expression de la CYP7A1 via FGF15/19- FGFR4 (Li 2014)

Transport des ABs dans le cycle entero-hépatique: Dans le contrôle du transport des ABs, FXR a une action de détoxification et de cytoprotection. En effet, (a) FXR favorise l'excrétion des ABs de l'hépatocyte, (b) il inhibe la captation hépatique à partir de la circulation portale, et (c) favorise l'excrétion des ABs de l'entérocyte.

a. Il a été montré que, parmi les transporteurs qui favorisent la sécrétion des ABs dans les canalicules biliaires, **BSEP**, **MRP2** et **MDR3** sont régulés positivement par FXR (Ananthanarayanan et al. 2001; Song et al. 2013) (**Figure 15**).

b. Du côté basolatérale de l'hépatocyte, FXR réprime l'expression des transporteurs **NTCP** et **OATP**, en limitant ainsi le taux de sels biliaires hépatiques (**Figure 15**).

c. Au niveau intestinal, FXR inhibe l'absorption des acides biliaires par modulation de plusieurs protéines de transport. Chez la souris, l'expression du gène de l'**ASBT** est diminuée par l'action de FXR via l'inhibition de LRH1 dépendante de SHP (Chen et al. 2003). FXR favorise le passage des ABs de la membrane apicale à la membrane basolatérale des entérocytes via la régulation positive d'**IBABP** (Grober et al. 1999) et favorise le retour des ABs au foie par l'induction des gènes du transporteur OST (**OST α** et **OST β**) (Landrier et al. 2006) (**Figure 15**).

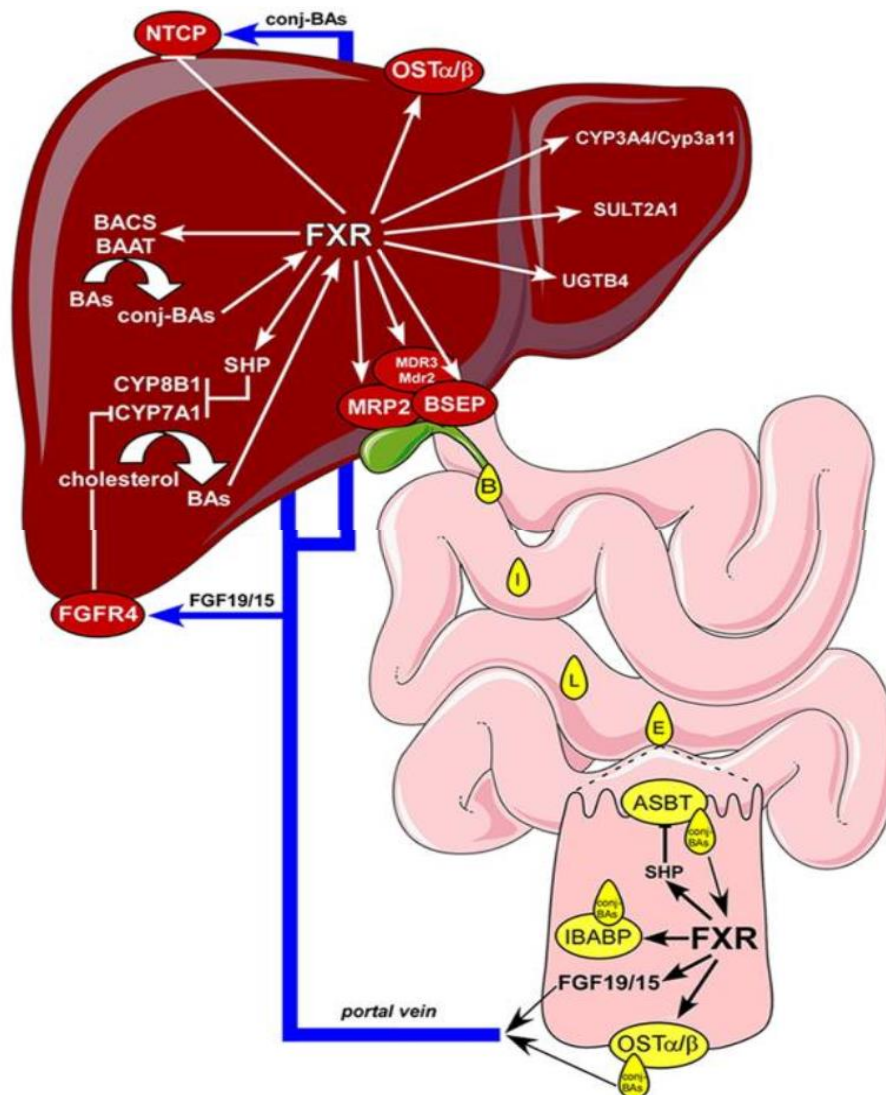


Figure 15. Régulation de la synthèse et du transport des ABs par FXR au niveau hépatique et intestinal (Modica 2010)

2.3.2. FXR et le métabolisme des lipides

Le rôle de FXR sur le métabolisme des lipides et des lipoprotéines a été étudié il y a plusieurs années, et les premières observations remontent à la caractérisation de la souris FXRKO, qui présente une hypercholestérolémie, une hypertriglycémie et une augmentation de l'absorption intestinale du cholestérol (Sinal et al. 2000; Lambert et al. 2003; Cariou et al. 2006). Ce phénotype a été attribué à la capacité de FXR à contrôler l'expression de plusieurs gènes impliqués dans le métabolisme du cholestérol, des lipides et des lipoprotéines (**Figure 16**).

FXR régule le métabolisme intra-hépatique des lipides:

L'hypertriglycémie qui caractérise la souris FXRKO est une conséquence de la régulation de FXR sur la lipogénèse. En effet, FXR active l'expression de **FAS** (*Fatty Acid Synthase*) via un site IR1 dans le promoteur de son gène (Matsukuma et al. 2006) et il exerce un contrôle négatif sur les gènes de la lipogénèse par l'inhibition de l'expression de **SREBP-1c**, (*Sterol Regulatory Binding Protein-1c*), par l'intermédiaire de l'augmentation de **SHP** (Watanabe et al. 2004; Zhang et al. 2010). De plus dans les hépatocytes primaires humains, l'activation de FXR induit l'expression de **PPAR α** et de ses gènes cibles, impliqués dans le transport et l'oxydation des acides gras (Pineda Torra et al. 2003).

FXR régule l'absorption des HDLs par le foie et les tissus périphériques, par l'activation de l'expression de **SR-BI** (*scavenger receptor BI*). En effet, la souris FXRKO présente un haut niveau de HDL plasmatiques et une expression réduite du gène de SR-BI (Sinal et al. 2000; Lambert et al. 2003; Zhang et al. 2010). En revanche, les niveaux de HDL diminuent chez la souris sauvage traitée avec le GW4064 (Cariou et al. 2006; Zhang et al. 2006).

Il a été montré que FXR régule la production des VLDLs, par l'inhibition par SHP de la transcription du gène codant la **MTP** (*Microsomal Triglyceride Transfer Protein*), impliquée dans la formation et la sécrétion de ces lipoprotéines (Hirokane et al. 2004). De plus, FXR régule la clairance des VLDLs et des chylomicrons en induisant l'expression du **VLDLR** (récepteur aux VLDLs) (Nakahara et al. 2002; Sirvent et al. 2004a) et **syndecan-1** (Anisfeld et al. 2003). L'action de FXR sur la captation hépatique du cholestérol se manifeste aussi par l'inhibition de la transcription du gène **PCSK9** (*proprotein convertase subtilisin/kesin type9*) (Langhi et al. 2008), l'enzyme impliquée dans la dégradation du LDLR (LDL-Receptor).

FXR réprime l'expression de l'**ApoAI** par une action à deux niveaux, la liaison directe à un FXRE monomérique sur son gène (Claudel et al. 2002) et une action indirecte via SHP-LRH1 (Delerive et al. 2004).

FXR régule le métabolisme intra-vasculaire des lipids:

FXR régule positivement l'expression du gène de l'**ApoCII** (inhibiteur de la LPL, enzyme d'hydrolyse des triglycérides) *via* deux sites dans la région de contrôle du promoteur hépatique (Kast et al. 2001). En effet, le traitement par le CA de la souris sauvage augmente l'expression hépatique de l'ApoCII et réduit les triglycérides circulants, effets qui n'ont pas été observés chez la souris FXRKO (Kast et al. 2001). Dans ce même sens, FXR régule négativement les gènes de l'**ApoCIII** (Claudel et al. 2003) et de l'**ANGTPL3** (Watanabe et al. 2004), les deux inhibiteurs des LPLs. De plus, FXR est connu pour participer à la réorganisation des lipoprotéines par l'activation du gène de l'**ApoF** (Li et al. 2013), de la **PLTP** (PhosphoLipid Transfer protein) (Urizar et al. 2000) et l'inhibition du gène de **LH** (Lipase Hépatique) (Sirvent et al. 2004b) et de la **CETP** (Cholesterol-Ester Transfer protein) (Kinoshita et al. 2004), ce qui peut également contribuer à la réduction des triglycérides (Mak et al. 2002; Sirvent et al. 2004b)

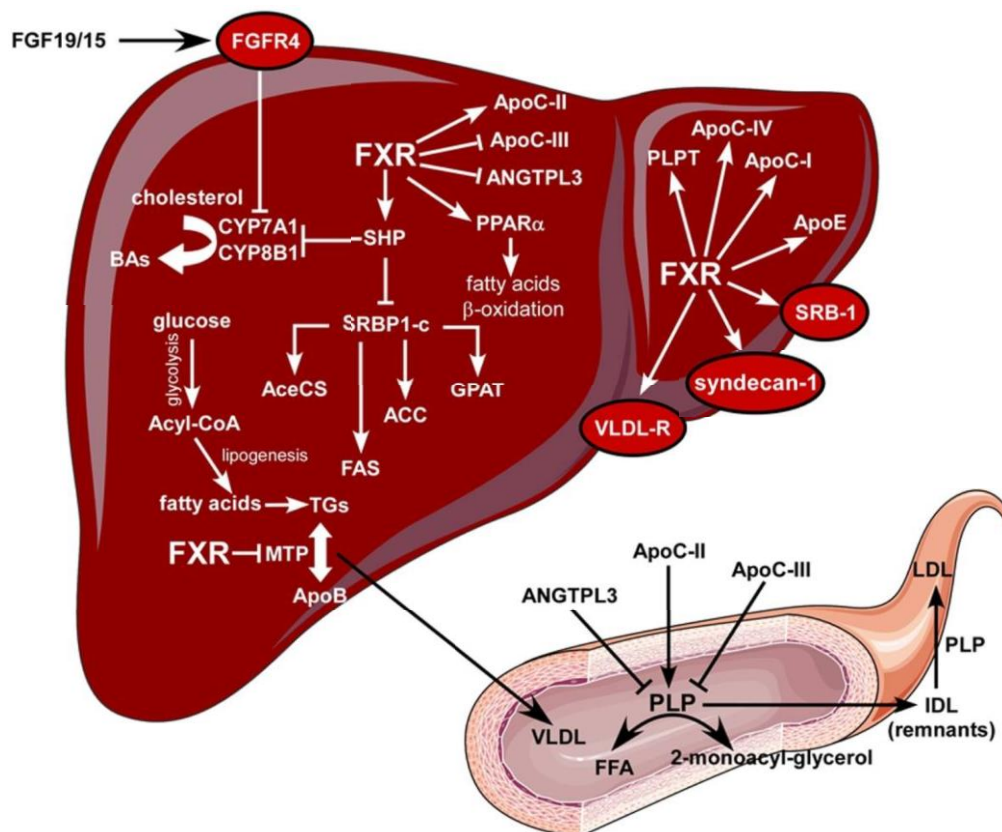


Figure16. Régulation du métabolisme des lipides par FXR (Modica 2010)

Ainsi, l'ensemble de ces données montre que l'activation de FXR peut diminuer les taux de triglycérides via de multiples mécanismes, y compris la réduction de la lipogenèse et l'augmentation de l'absorption, du catabolisme et de l'oxydation des acides gras. Par ailleurs, les effets mentionnés ci-dessus sur les lipoprotéines pourraient aussi contribuer aux effets hypocholestérolémiants des agonistes de FXR en favorisant le catabolisme et la clairance des lipoprotéines. L'activation de FXR dans le foie serait donc une bonne cible thérapeutique pour diminuer les niveaux de LDL-C chez l'Homme. Par contre, il a été montré qu'administrer du DCA ou du CDCA chez l'Homme n'a pas l'effet espéré sur l'absorption hépatique du cholestérol (Wang et al. 2006b), ce qui pourrait être expliqué par une diminution dans la demande de cholestérol par le foie après la diminution de la synthèse des ABs qui suit l'activation de FXR (Porez et al. 2012). De même, un des effets secondaires indésirables de l'acide Obéticolique, agoniste de FXR, est d'augmenter les concentrations de LDL-C (Neuschwander-Tetri et al. 2015).

2.3.1. FXR et le métabolisme du glucose

Il est bien établi que FXR est impliqué dans la régulation du métabolisme du glucose, et qu'en même temps, le glucose et l'insuline ont un effet régulateur sur FXR. En effet, chez le rat, son expression est régulée positivement et négativement par le glucose et par l'insuline, respectivement (Duran-Sandoval et al. 2004). En outre, son expression est diminuée dans des modèles rongeurs de diabète de type 1 et de type 2 (Duran-Sandoval et al. 2004).

Pour comprendre la contribution de FXR au maintien de l'homéostasie glucidique, plusieurs études ont analysé son rôle sur la **néoglucogenèse hépatique**. Cependant, il est actuellement difficile de conclure sur les sens de la régulation de FXR sur la néoglucogenèse, car les différentes études ont souvent conduit à résultats contradictoires. Cette variabilité pourrait être due aux différences des conditions expérimentales, de l'état nutritionnel de l'organisme, de la durée du traitement par les agonistes de FXR, ou aux différents modèles d'étude utilisés (souris, rats, lignées cellulaires, Homme) (Teodoro et al. 2011).

Les premières observations rapportent que l'activation de FXR induit la transcription du gène de la **PEPCK** (Phosphoenolpyruvate carboxykinase). L'absence de FXR diminue le niveau d'expression basal de la PEPCK dans les hépatocytes murins primaires pendant les premières étapes d'adaptation au "fasting" avec une hypoglycémie momentanée (Cariou et al. 2005). L'activation de FXR dans les hépatocytes primaires de rat et humains active l'expression de la PEPCK et la sortie du glucose. Le traitement de souris sauvages par le GW4064 induit son l'expression (Stayrook et al. 2005). Par contre, une autre étude

d'activation par le CA chez la souris (Ma et al. 2006) et par le CDCA dans une lignée d'hépatocyte murin (Yamagata et al. 2004) montre que l'activation de SHP par FXR diminue l'expression de la PEPCK et d'autres enzymes clé de la néoglucogenèse comme la **G6Pase** (Glucose 6-phosphatase), **FBP1** (Fructose-1,6-bisphosphatase 1) et le facteur **PCG1 α** (*Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha*).

La participation de FXR à d'autres aspects du métabolisme hépatique a été prouvée en observant que les souris FXRKO ont une réponse hépatique accélérée lors d'une épreuve de jeûne/réalimentation riche en glucides (Duran-Sandoval et al. 2005). Cette différence a été expliquée par les effets inhibiteurs de FXR sur l'expression des gènes de la **glycolyse** et de la lipogenèse (hépatocytes primaires de rongeur, Duran-Sandoval et al. 2005). En effet, quand il est dans son état activé, FXR est capable d'interagir directement avec **ChREBP**, facteur de transcription impliqué dans la réponse au glucose, et **HNF4 α** , et de recruter le complexe des coRs, ce qui se traduit par la transrepression des gènes de la glycolyse (Caron et al. 2013).

Au niveau intestinal, FXR module l'**absorption du glucose** et la **production de l'incrétine GLP-1**. En effet, soumises à un bolus de glucose, les souris FXRKO présentent une réponse retardée d'apparition du glucose dans la circulation sanguine (van Dijk et al. 2009). De plus, comme il a été montré récemment au sein de notre laboratoire, FXR diminue la synthèse et la sécrétion de GLP-1 par interférence avec ChREBP et par inhibition de la glycolyse, respectivement (Trabelsi et al. 2015).

La **résistance à l'insuline** qui caractérise la souris FXRKO pourrait être en partie due à FXR dans le tissu adipeux. En effet, FXR est exprimé dans le tissu adipeux, où il régule la différenciation et le maintien de la **fonction adipocytaire** (Cariou et al. 2006; Rizzo et al. 2006; Abdelkarim et al. 2010), ce qui pourrait expliquer son rôle dans la réponse à l'insuline. De plus, FXR pourrait participer au maintien de l'homéostasie glucidique par son action au niveau cérébral, mais cette voie reste à explorer (Bookout et al. 2006; Gofflot et al. 2007; Huang et al. 2015).

Enfin, FXR régule le métabolisme du glucose en contrôlant l'expression de l'insuline dans la cellule bêta pancréatique, qui fait l'objet du paragraphe suivant.

2.3.4. Expression et fonction de FXR dans le pancréas endocrine

- L'expression de FXR dans l'îlot pancréatique

Chez la souris et chez l'Homme, FXR est exprimé dans le pancréas endocrine. L'expression de FXR dans le pancréas exocrine n'a jamais été décrite. Dans l'îlot, l'expression de FXR serait exclusivement dans la cellule bêta.

Les premières données décrivant l'expression de FXR dans la cellule bêta datent de 2010, quand deux équipes ont rapporté que FXR est exprimé et fonctionnel dans les îlots pancréatiques humains, murins, dans la lignée de cellule β de rat (INS1) (Popescu et al. 2010) et dans la lignée de cellule β murine β TC6 (Renga et al. 2010).

FXR est exprimé dans l'îlot pancréatique et plus particulièrement dans la cellule bêta.

- Le rôle de FXR dans la fonctionnalité de l'îlot:

Des études d'activation pharmacologique (INT-747 pendant 18h) dans la lignée cellulaire β TC6 cultivée en concentration de glucose basse (5 mM) ou élevée (25 mM) ont montré que FXR augmente la sécrétion de l'insuline en présence de forte concentration de glucose (Renga et al. 2010). Cet effet est FXR-dépendant, car il n'est plus observé après siRNA FXR dans la lignée cellulaire β TC6. De plus, les îlots primaires de souris traitées par le CDCA (le plus puissant agoniste naturel de FXR, 50 μ M, 24h) ou le GW4064 (agoniste synthétique de FXR, 1 μ M, 24h) présentent une augmentation de la sécrétion d'insuline en réponse au glucose par rapport aux îlots non traités (Seyer et al. 2013). Ces résultats sont retrouvés aussi suite à une activation plus longue par les ABs (CDCA 500 nM ou TCDCA 500 nM, 48h, îlots de souris WT (Björn Schittenhelm et al. 2015).

D'une façon complémentaire, une étude d'inactivation génétique totale de FXR a montré que les îlots de la souris FXRKO 1) ont une capacité réduite de sécréter l'insuline en réponse au glucose (Popescu et al. 2010), et 2) ils perdent l'induction de la sécrétion d'insuline en réponse au glucose après traitement par un agoniste de FXR (Seyer et al. 2013).

FXR protège de la lipotoxicité. En effet, l'incubation des îlots avec le GW4064 (5 μ M) ou le CDCA (50 μ M) réduit l'accumulation des triglycérides et améliore la viabilité des îlots exposés au palmitate (Popescu et al. 2010).

La déficience en FXR ne modifie pas la morphologie des îlots. En effet, la structure et la masse des cellules β sont comparables dans la souris FXRKO et WT nourries en régime standard (Popescu et al. 2010) et en régime riche en graisses (Björn Schittenhelm et al. 2015).

Des études sur la lignée cellulaire Min6 avec des agonistes de TGR5 (acide oléanolique et INT-777) attribuent à ce récepteur membranaire la propriété d'induire la sécrétion d'insuline par la cellule bêta (Kumar et al. 2012). Toutefois, ces résultats n'ont pas été confirmés par l'analyse de l'insuline sécrétée par des îlots murins traités par un agoniste de TGR5 (Rg-239) pendant 48 heures (Seyer et al. 2013), ni par le traitement des îlots de la souris FXRKO par le LCA ou le DCA (les agonistes naturels de TGR5 les plus puissants), qui ne corrige pas le déficit de sécrétion dû à l'absence de FXR (Björn Schittenhelm et al. 2015). L'induction de la sécrétion d'insuline par TGR5 semble peu réelle, et le résultat de Kumar et al. (Kumar et al. 2012) pourrait être dû au fait que les Min6 ne sont pas une lignée cellulaire pure, mais présentent aussi un caractère de cellule alpha et delta, où TGR5 pourrait être exprimé et actif dans la régulation d'autres voies cellulaires.

FXR participe au contrôle de la sécrétion de l'insuline en réponse au glucose (1) et protège de la lipotoxicité (Figure 17).

-L'action transcriptionnelle de FXR:

L'augmentation de la sécrétion d'insuline en haut glucose dans la lignée β TC6 est associée à l'augmentation du transcrit du gène de l'insuline (*Ins1*), qui n'est plus observée après siRNA FXR (Renga et al. 2010). De plus, dans les mêmes conditions expérimentales (β TC6, glucose 5 mM ou 25 mM en présence ou pas de INT-747 pendant 18h), l'activation de FXR augmente l'expression du gène *KLF11* (*Kruppel-Like Factor 11*), régulateur positive de la transcription du gène de l'insuline, à la fois en bas et en haut glucose (Renga et al. 2010). De manière complémentaire, l'analyse de l'expression génique dans le pancréas total de la souris FXRKO a montré une diminution de l'expression du gène de l'insuline et de certains facteurs de transcription qui en régulent la transcription (*PDX-1* (*Pancreatic and duodenal homeobox 1*), *BETA2/NeuroD* (*neuronal differentiation 1*), *MafA* (*v-maf avian musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog A*) §3.4.2.1.2) reflété par un contenu en insuline plus faible (Popescu et al. 2010).

FXR participe au contrôle de la transcription du gène de l'insuline (2) en régulant l'expression de ses facteurs de transcription (3,4) (Figure 17).

- L'action non-transcriptionnelle de FXR:

Lorsque des îlots pancréatiques primaires de souris sauvages sont traités pendant une heure avec du glucose et des ABs (TCDCA, CDCA, GCDCA), ou avec du glucose et un agoniste synthétique de FXR (GW4064), on observe une augmentation de la sécrétion

d'insuline. Cette augmentation est dépendante de FXR, puisqu'elle n'est plus observée dans les îlots pancréatiques primaires de souris FXRKO (Düfer et al. 2012). Néanmoins, un temps de traitement si court (1 heure) n'est pas suffisant pour être le résultat de l'action transcriptionnelle (ou génomique dans ce contexte) de FXR. Il a donc été suggéré que ces effets sur la sécrétion d'insuline impliqueraient des mécanismes non génomiques (indépendants de la transcription). Il a été montré que FXR interagit physiquement avec le canal potassique ATP-dépendant de la cascade d'événements déclenchant la sécrétion de l'insuline (Düfer et al. 2012). De manière intéressante, l'induction de la sécrétion d'insuline qui suit le traitement aiguë (1 heure) par les ABs des îlots pancréatiques des souris WT nourries avec régime standard, n'est pas retrouvée chez les souris nourries avec un régime riche en graisses (Björn Schittenhelm et al. 2015). Cette disparité a été attribuée à la localisation cellulaire de FXR différente en fonction des conditions métaboliques (régime standard/riche en graisses). En effet, il a été observé que FXR est localisé dans le cytoplasme dans les îlots des souris non-obèses, alors que chez les souris obèses il est retrouvé plutôt dans le noyau (Popescu et al. 2010). Schittenhelm et al. (Björn Schittenhelm et al. 2015) émettent l'hypothèse que la translocation de FXR au noyau diminuerait son activité cytoplasmique, induisant une perte des effets non-génomiques de FXR sur la sécrétion de l'insuline.

La régulation des canaux potassiques par FXR n'est pas le seul exemple d'action non génomique de FXR dans la réponse au glucose. En effet, un autre mécanisme d'action cytosolique est rapporté, concernant la translocation à la membrane du transporteur pour le glucose GLUT-2 via la phosphorylation d'Akt (Renga et al. 2010).

FXR induit la sécrétion de l'insuline par des mécanismes non-génomiques qui impliquent la fermeture des canaux potassiques (6) et la translocation de GLUT2 à la membrane (6) (Figure 17).

Ainsi, dans la cellule bêta pancréatique, FXR participe au contrôle de la production de l'insuline en régulant la transcription de son gène, et au contrôle de la sécrétion de l'insuline par des mécanismes non génomiques qui contribuent à augmenter les voies de signalisation intracellulaire qui se terminent par l'exocytose des granules.

Toutefois, les mécanismes moléculaires de ces régulations et la fonction de FXR dans les différents contextes métaboliques doivent encore être précisés.

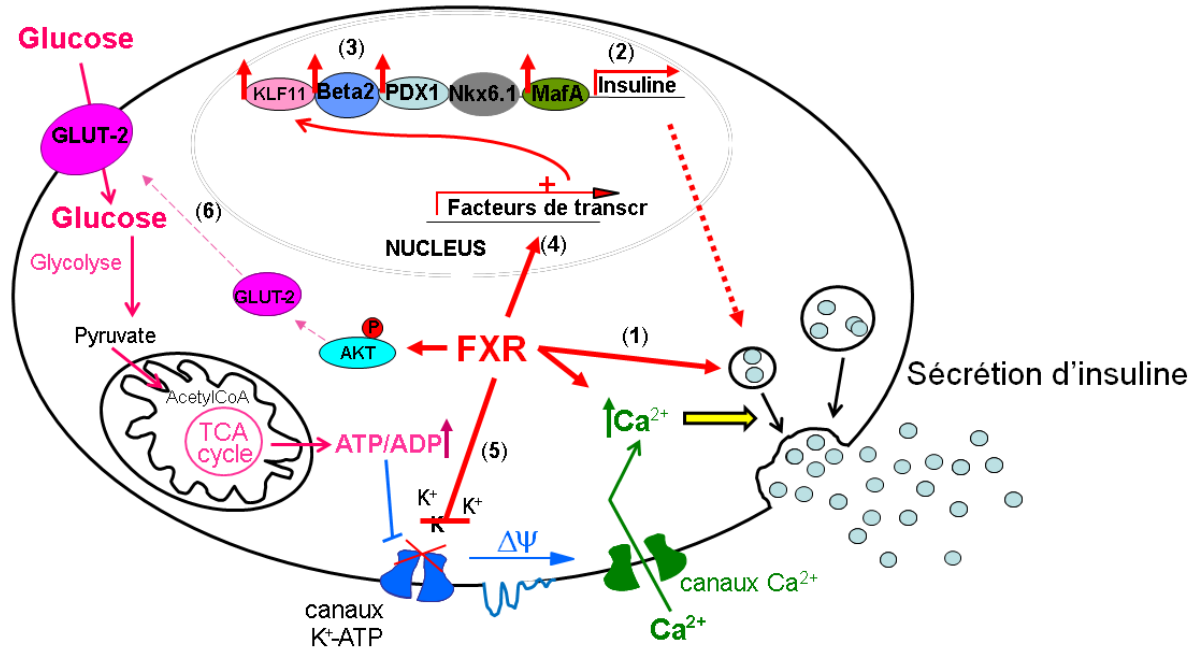


Figure 17. Les fonctions décrites pour FXR dans la cellule bêta rapportent une action sur la sécrétion de l'insuline (1), une action sur l'expression des facteurs de transcription (3,4) qui régulent l'expression du gène de l'insuline (2), et une action non-transcriptionnelle sur la sécrétion de l'insuline par interaction avec le canal potassique ATP dépendant (5) et la translocation à la membrane du transporteur au glucose GLUT2 (6).

2.3.5. Rôle physiopathologique de FXR in vivo

Approche par déficience génétique:

En régime standard (Chow Diet, CD), la souris FXRKO n'a pas de différence de poids corporel avec la souris WT. En cohérence avec le rôle de FXR dans la régulation du métabolisme des ABs et des lipides, elle présente des concentrations d'ABs plasmatiques élevés, des concentrations de cholestérol et TG plasmatiques élevés, un profil de lipoprotéines plasmatiques pro-athérogène et un contenu en cholestérol et TG hépatiques élevé (Sinal et al. 2000). Elle présente une perturbation du métabolisme du glucose, avec une intolérance au glucose accompagnée d'une résistance à l'insuline périphérique (TAs et muscle) et hépatique (Cariou et al. 2006; Ma et al. 2006; Zhang et al. 2006) (**Figure 18**).

Cependant, en condition pathologique et de stress métabolique (souris nourrie avec un régime riche en graisses, High Fat Diet, HFD, souris *ob/ob* (invalidée pour la leptine) ou souris *db/db* (invalidée pour le récepteur à la leptine)) l'absence en FXR a des effets bénéfiques. En effet, sur fond *ob/ob* ou en HFD, la déficience de FXR atténue le gain de poids corporel avec réduction de la masse du tissu adipeux, et améliore l'homéostasie du glucose par augmentation de la clairance du glucose et de la sensibilité périphérique à l'insuline (même si la sensibilité hépatique à l'insuline n'est pas modifiée) (Prawitt et al. 2011). Ces améliorations ne sont pas dues à l'expression hépatique de FXR, car les souris FXRKO-foie

spécifique ne sont pas protégées de l'obésité et de l'insulino résistance induites par le régime (Prawitt et al. 2011) (**Figure 18**). En revanche, les souris invalidées pour FXR dans l'intestin sont également protégées des effets délétères du régime HFD, avec profil glycémique et tolérance à l'insuline améliorés, un contenu de TG hépatiques plus faible et une prise de poids corporelle réduite par rapport à la souris WT (Li et al. 2013; Jiang et al. 2015). Ces résultats montrent que FXR dans l'intestin est (au moins en partie) responsable du phénotype de la souris FXRKO en HFD. De plus, des études chez la souris FXRKO total ont identifié une autre fonction de FXR chez la souris obèse, avec des répercussions au niveau de la flore intestinale. En effet, il est connu que la flore bactérienne intestinale joue un rôle dans l'obésité et est capable de moduler l'activité de FXR par la modification du pool de ses ligands (Li et al. 2013; Sayin et al. 2013; Jiang et al. 2015). Des données très récentes montrent que FXR influence aussi la composition de la flore intestinale. De plus, la flore intestinale promeut l'obésité et les pathologies associées par l'intermédiaire de FXR (Parseus et al. 2015).

La majorité de ces études porte sur la souris déficiente pour FXR dans l'organisme entier. La compréhension mécanistique du phénotype nécessite le développement de modèles invalidés spécifiquement dans un organe.

Approche pharmacologique:

Si l'absence de FXR dans un contexte d'obésité a un impact positif sur le métabolisme, il existe aussi des épreuves que l'activation de FXR en condition de perturbation métabolique améliore la sensibilité à l'insuline, le profil glycémique et lipidique. En effet, l'activation de FXR par administration de GW4064 par voie intra-péritonéale (IP) améliore la sensibilité à l'insuline, l'hyperglycémie et le profil lipidique chez la souris *db/db* (Duran-Sandoval et al. 2004) et *ob/ob* (Cariou et al. 2006). Ces résultats sont vérifiés aussi quand l'agoniste de FXR est administré par voie orale, comme montré par l'amélioration du profil glycémique et lipidique par le GW4064 chez la souris *db/db* (Zhang et al. 2006) et la diminution de l'insulino-résistance chez le rat diabétiques Zucker après administration de INT-747 (Cipriani et al. 2010). Cependant, une autre étude a montré que le traitement de la souris génétiquement obèse par le GW4064 majore l'intolérance au glucose, par la diminution du pool des ABs induite par l'activation de FXR, et qui se traduit par l'inactivation de TGR5 dans les tissus périphériques, avec la diminution de la dépense énergétique (Watanabe et al. 2011). (**Figure 18**).

L'ensemble de ces données parfois contradictoires rend difficile d'établir si dans le traitement du syndrome métabolique il serait plus efficace d'activer ou d'inhiber FXR.

L'idéal serait une molécule capable d'activer (ou inactiver) FXR de manière tissu-spécifique, en conservant seulement les effets positifs de sa modulation. Dans cette optique, chez la souris obèse, l'administration orale de la fexaramine, un agoniste de FXR actif seulement dans l'intestin, protège de la prise de poids induite par le régime et entraîne une amélioration du profil glycémique (Fang et al. 2015). Cette amélioration pourrait être la conséquence de l'altération du pool des ABs qui suit la diminution de FGF15, et qui se répercute sur l'activité de TGR5 dans le TAB, avec augmentation de la dépense énergétique (Fang et al. 2015).

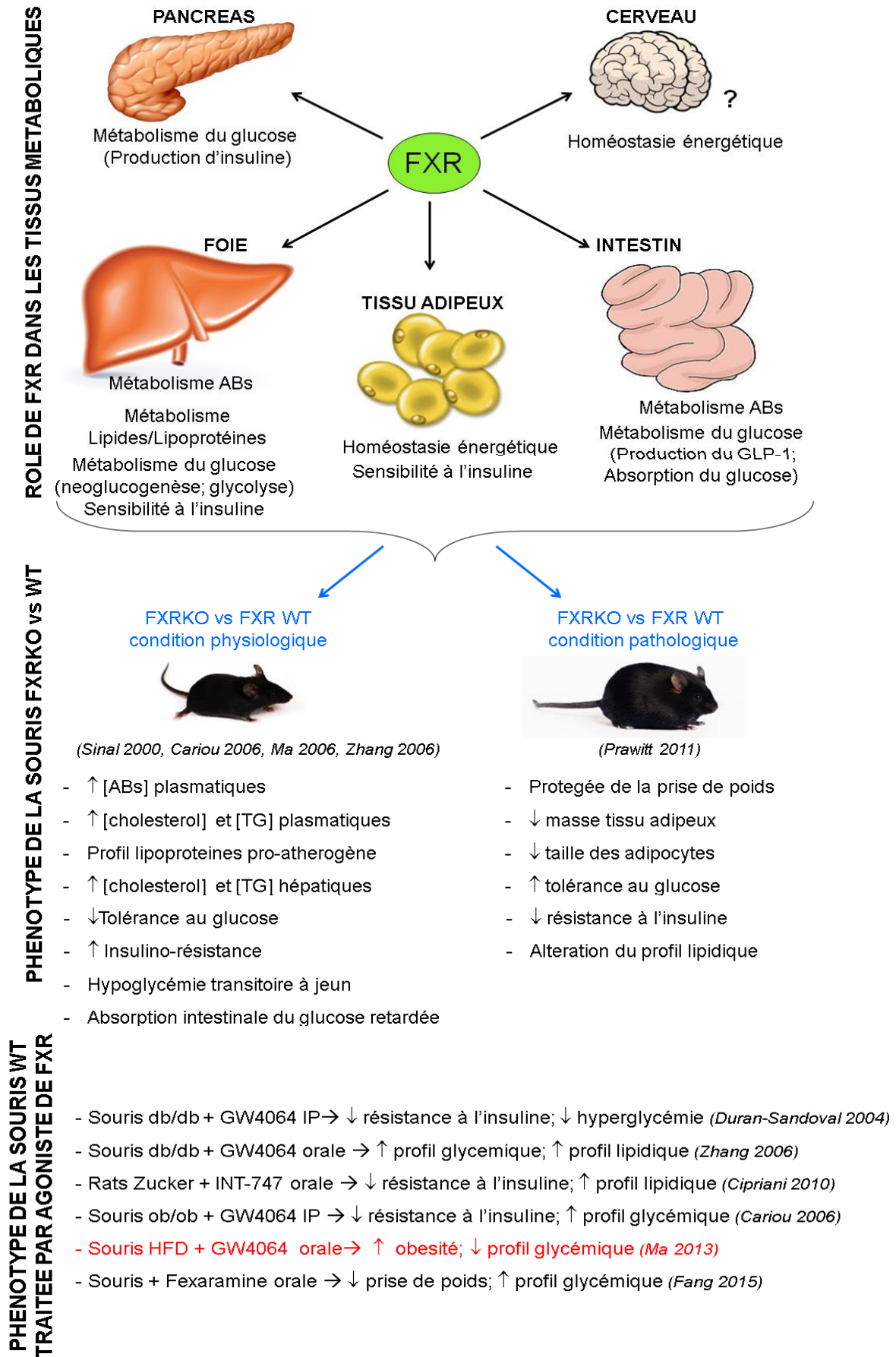


Figure 18 Fonctions principales de FXR dans les tissus qui régulent l'homéostasie métabolique. Caractéristiques principales de la souris FXRKO en condition physiologique (régime standard, Chow Diet) ou en condition pathologique (régime riche en graisses, High Fat Diet/ fond génétique ob/ob ou db/db) comparée à la souris WT. Effets de l'activation de FXR *in vivo* dans différents modèles (en rouge, une étude qui montre l'effet négatif de l'activation de FXR). IP=intra-péritoneale

3. LE PANCREAS

3.1. Le pancréas et sa structure

Le **pancréas** est un organe rétropéritonéal d'environ 15 cm de longueur chez l'Homme, annexé au tube digestif. Sa forme allongée semblable à une langue, plus épaisse dans la partie médiane et plus mince et aplatie dans la partie latérale, a permis de distinguer classiquement une "tête" et une "queue" du pancréas, parties localisées respectivement dans la concavité du duodénum et contre la rate (**Figure 19A**). Chez la souris, le pancréas n'a pas une forme aussi définie et compacte, et sa forme irrégulière se ramifie en "doigts" qui le mettent en contact avec plusieurs organes. Cependant, d'une façon globale, en parallèle avec l'Homme, on peut également identifier une tête, correspondant à la partie adjacente au duodénum, et une queue, constituée par la partie en contact avec la rate (**Figure 19B**) (Lindsay et al. 2006).

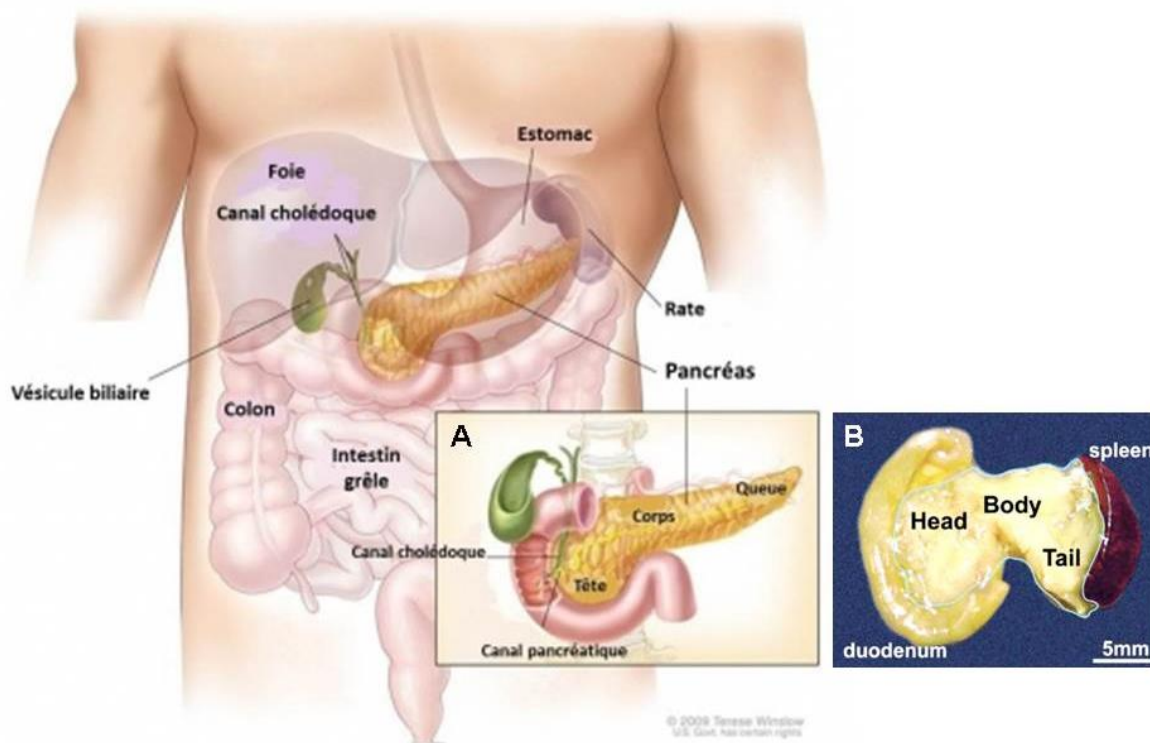


Figure 19. Localisation et anatomie du pancréas humain (A) et de souris (B) (Adaptée de Winslow 2009 et Lindsay 2006)

Le pancréas est une glande amphicrine composée de deux types de tissus:

- Le **tissu exocrine**, organisé en grappes de cellules épithéliales qui, avec le système ductal, forment les *acini*, dont la fonction est la production des enzymes digestives (trypsine, chymotrypsine, lipase, amylase) qui participent à l'absorption intestinale des aliments. Ces

enzymes sont sécrétées par les cellules acinaires dans les petit canaux pancréatiques qui se déversent dans le canal de Wirsung (ou canal pancréatique principal) (**Figure 20A**), avec de l'eau et du carbonate de sodium, formant le jus pancréatique. Le canal de Wirsung converge dans le cholédoque et le jus pancréatique est déversé avec la bile dans le duodénum par l'ampoule de Vater, sous l'action de l'hormone secretine, produite par le duodénum à l'arrivée du chyme.

- Le **tissu endocrine**, moins abondant, représenté par des agrégats de cellules, la plupart de forme sphérique ou ovoïde appelés îlots de Langherans. Les îlots sont dispersés dans le pancréas, enveloppés de tissu exocrine (**Figure 20B** et **20C**), et sont localisés souvent à proximité des vaisseaux sanguins. Ils sont composés de cellules à fonction hormone-sécrétrice, dont le rôle est fondamental pour le maintien de l'homéostasie du glucose. Ils ont un diamètre compris entre 100 et 200 μm , indépendamment de l'espèce mammifère, mais leur nombre augmente avec la taille de l'espèce.

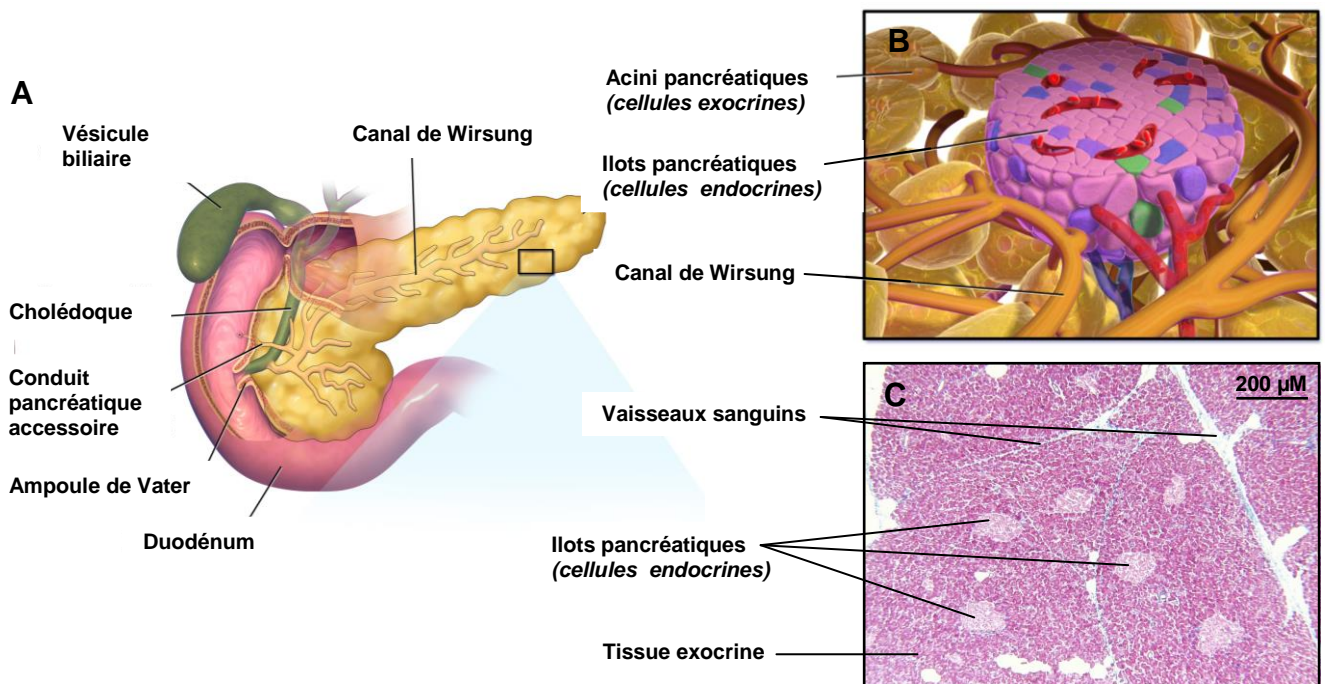


Figure 20 A. Organisation des canaux pancréatiques B. et C. organisation du tissu endocrine et exocrine dans le pancréas (Adaptée de *Blausen Gallery 2014* et *nku.edu*)

Ainsi, un pancréas humain contient entre 200 000 et 1 million d'îlots (avec une masse estimée à environ 1-1.5 gr, ce qui représente 1-2% du pancréas total), un pancréas murin contient entre 100 et 300 îlots (Jo et al. 2007).

Les îlots se composent principalement de cinq types de cellules endocrines:

- Les **cellules α** , qui représentent environ 10-25% des cellules de l'îlot et sécrètent le glucagon (hormone hyperglycémiant);
- Les **cellules β** , qui constituent environ 65-80% des cellules de l'îlot et sécrètent l'insuline (seule hormone hypoglycémiant);
- Les **cellules δ** , qui représentent 3-10% des cellules de l'îlot et sécrètent la somatostatine;
- Les **cellules ϵ** , qui sécrètent la ghreline;
- Les **cellules PP**, qui sécrètent le polypeptide pancréatique.

Leur disposition et leur proportion dans l'îlot varie considérablement selon les espèces. Par exemple, chez l'Homme, les cellules alpha, bêta et delta sont dispersées d'une façon homogène dans l'îlot (**Figure 21A**). Au contraire, dans les îlots de souris, les cellules bêta sont localisées en "cluster" à l'intérieur de l'îlot, tandis que les cellules alpha se trouvent à la périphérie (**Figure 21B**). De plus, les îlots humains ont moins de cellules bêta et plus de cellules alpha par rapport à la souris (**Figure 21C**) (Cabrera et al. 2006).

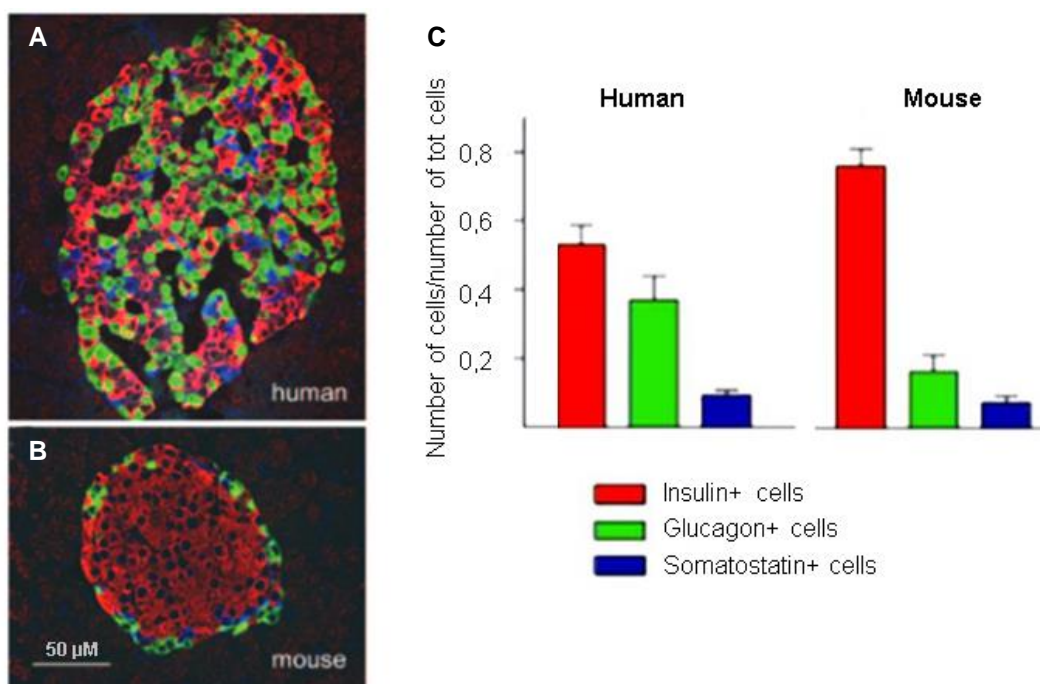


Figure 21: Organisation de la structure des îlots (A) chez l'Homme et (B) chez la souris C. Distribution des différents types cellulaires dans l'îlot (Adapté de Cabrera 2006)

3.2. Le développement du pancréas murin

Pendant la phase de gastrulation du développement embryonnaire, trois feuillets germinaux se forment: l'ectoderme, le mésoderme et l'endoderme. Le pancréas entier, dans sa composante

exocrine et endocrine, est issu d'une cellule mère unique qui dérive de l'endoderme (Fishman et Melton 2002).

Chez la souris, le pancréas se développe au jour E8.0-E9.5 à partir de l'épithélium endodermique intestinal, qui deviendra le duodénum (*foregut endoderm*), adjacent au précurseur du foie (**li**, **Figure 22A**) (Habener et al. 2005). Le pancréas dérive de la fusion de deux parties, une ventrale (**vp**, **Figure 22A**) à l'origine de la partie qui sera en contact avec le duodénum et une dorsale (**dp**, **Figure 22A**) précurseur de la portion accolée à la rate. A E10.5 environ, ces structures se projettent dans le mésenchyme environnant, entre ce qui deviendra l'estomac (**st**, **Figure 22A**) et ce qui sera l'intestin (**in**, **Figure 22A**), sous la forme de bourgeons épithéliaux denses. La rotation de l'intestin au jour E12.5 permet aux deux précurseurs du pancréas de se rapprocher, conduisant à la fusion de la partie dorsale avec le bourgeon ventral, en conservant la connexion originale avec le canal biliaire commun (**cbd**, **Figure 22A**).

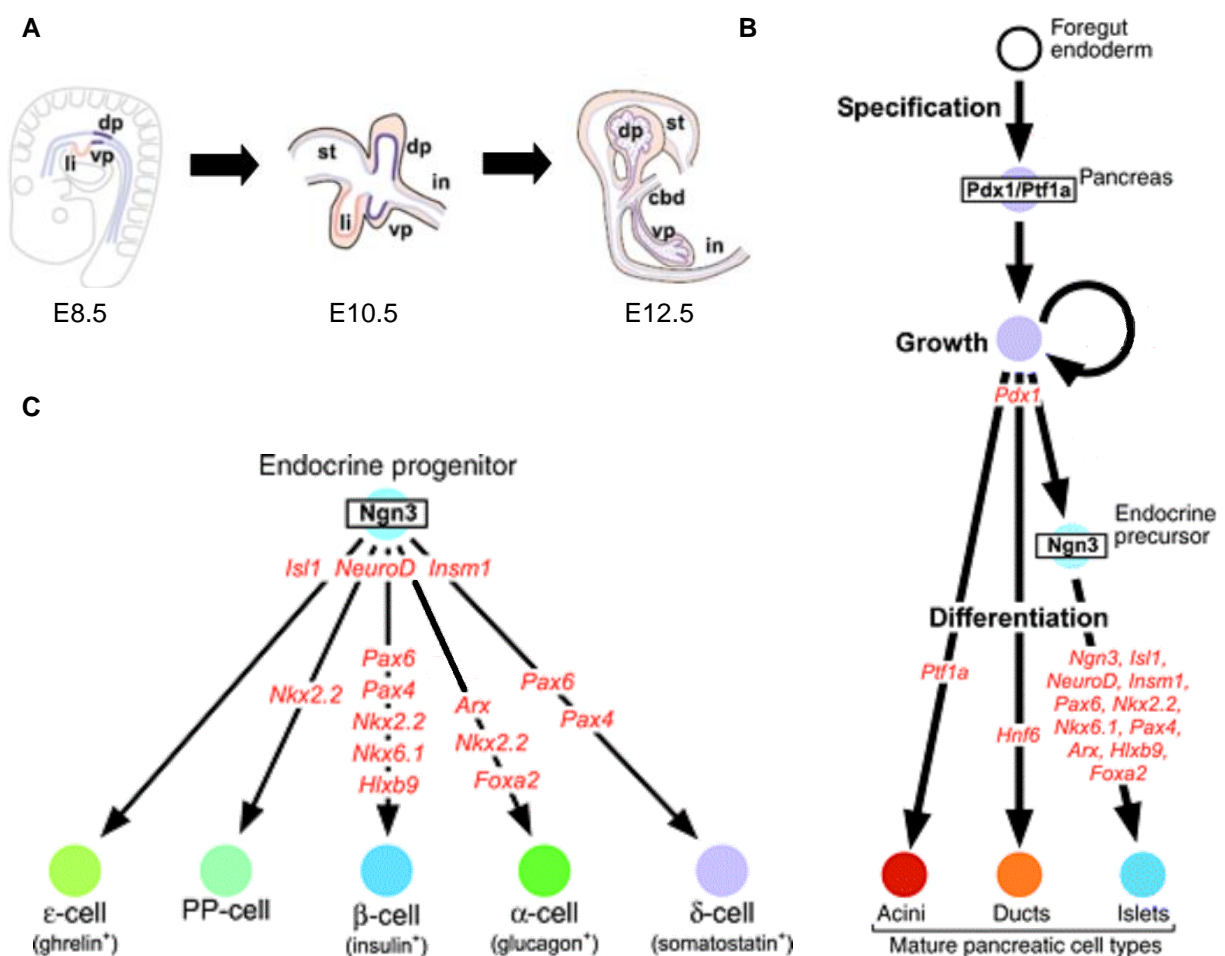


Figure 22: A. Développement embryonnaire du pancréas murin B. Facteurs de transcription spécifiques du pancréas et (C) des cellules endocrines. dp : partie dorsale; vp : partie ventrale; li : foie; st : estomac; in : intestin; cbd : canal biliaire commun (Adaptée de *Murthaug 2007*)

Toutes les phases du développement embryonnaire et fœtal du pancréas sont contrôlées par des facteurs de transcription spécifiques et par des voies de signalisation qui déterminent le devenir de chaque cellule (**Figure 22B**). Les deux précurseurs, dorsal et ventral, sont initialement composés de cellules progénitrices multipotentes qui expriment les facteurs de transcription **PDX-1**, et **Ptf1a** (*pancreas specific transcription factor 1a*, **Figure 22B**). Les cellules acinaires différenciées conservent l'expression de Ptf1a et perdent PDX-1. La différenciation des cellules des canaux pancréatiques (ducts) est assurée par le facteur de transcription Hnf6 (**Figure 22B**). L'expression de facteur de transcription Ngn3 (*Neorogenin 3*) induit la différenciation des cellules progénitrices multipotentes en cellules endocrines (**Figure 22B et C**). D'autres facteurs de transcription entrent ensuite en jeu pour conférer l'identité de chaque type cellulaire des îlots pancréatiques (**Figure 22C**). Deux de ces facteurs de transcription, **PAX4** (*paired box gene 4*) et **Arx** (*aristaless-related homeobox*), jouent un rôle crucial et opposé: PAX4 favorise le développement des cellules β et δ , tandis que Arx favorise les cellules α (**Figure 22B et C**). À partir d'E15,5, l'orientation de chaque type de cellule endocrine est établie. La migration des cellules endocrines différenciées et la formation des îlots de Langerhans a lieu entre E16,5 et la naissance.

3.3. Les hormones endocrines pancréatiques

Le maintien de l'homéostasie du glucose est contrôlé par l'action opposée de l'insuline et du glucagon, mais ces hormones, avec la somatostatine, ont aussi une action autocrine et paracrine qui contribue à la régulation du processus complexe qu'est l'homéostasie du glucose (**Figure 23**).

- L'**insuline** sera détaillée dans le paragraphe §4.4.

- Le **glucagon** est l'hormone sécrétée par la cellule α en réponse à la baisse de la glycémie.

II

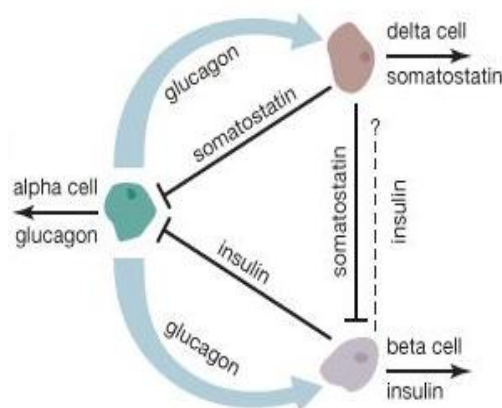


Figure 23. Schéma de régulation des hormones insulaires sur leur propre sécrétion (*Encyclopedia Britannica, 2008*)

a une action opposée à celle de l'insuline, en promouvant la mobilisation des substrats énergétiques, particulièrement celle du glucose. Il est capable de stimuler la sécrétion d'insuline par son action paracrine sur la cellule bêta, par liaison à son récepteur, un RCPG couplé à protéine Gs qui active l'adenylate cyclase (AC) et conduit à l'augmentation de l'AMPC intracellulaire. Simultanément, l'insuline et le glucose inhibent la sécrétion du glucagon et la transcription de son gène.

Le glucagon est un peptide de 29 acides aminés. Il représente un des produits du gène *gcg*, qui code pour la protéine pré-proglucagon. Le promoteur de ce gène est actif aussi dans la cellule enteroendocrine L intestinale. En fonction du type cellulaire, les isoformes prédominantes de l'enzyme proprotéin convertase (PC) clivent le proglucagon en glucagon dans la cellule α (PC2) et en GLP-1 dans la cellule L intestinale (PC1) (Rouillé et al. 1994; Tucker et al. 1996). Au cours des dernières années, il a été montré que le proglucagon peut être clivé en GLP-1 aussi dans la cellule α dans certaines conditions: en hautes concentrations de glucose (lignée cellulaire α TC1-6 25mM glucose) (Whalley et al. 2011), par activation du récepteur aux ABs TGR5 (α TC1-6 + agonistes TGR5) et par destruction des cellules β (rat traités par streptozotocine) (Whalley et al. 2011).

- La **somatostatine** est produite par la cellule δ et a une action inhibitrice sur la sécrétion de l'insuline par liaison aux récepteurs à la somatostatine SSTR2 et 3, récepteurs RCPG couplés à protéine Gi qui réprime la voie AMPC-PKA via l'inhibition de l'AC (Dimitriadis et al. 1985). La somatostatine inhibe aussi la sécrétion du glucagon.

3.4. La cellule bêta pancréatique: de la synthèse à la sécrétion de l'insuline

3.4.1. La découverte et la structure de l'insuline

3.4.1.1. Etapes clé de sa découverte

L'insuline est la seule hormone hypoglycémiant de l'organisme. Sa découverte date du début du XX^{ème} siècle, et a valu le prix Nobel aux chercheurs canadiens Frederik Banting et John MacLeod en 1923. Sa séquence en acides aminés a été établie en 1955 par Fred Sanger (Sanger et al. 1955), ce qui lui a valu le prix Nobel en 1958. L'insuline a aussi permis à Yallow d'obtenir un prix Nobel en 1977, pour avoir mesuré par dosage radio-immunologique le peptide circulant même en quantités infimes (Berson et Yallow 1961). La structure tridimensionnelle de l'insuline a été identifiée par Dorothy Hodgkin et ses collègues en 1969, à l'aide de la méthode cristallographique à rayons X (Adams et al. 1969). La voie de

biosynthèse de l'insuline dans la cellule bêta pancréatique a été élucidée en 1967 par Don Steiner (Steiner et James 1992).

3.4.1.2. Structure

L'insuline circulante et biologiquement active est un protéine de 5,8 kDa composée de deux chaînes polypeptidiques: la chaîne A, 21 acides aminés, et la chaîne B, 30 acides aminés (chez l'Homme). Deux ponts disulfure inter-chaîne et un pont disulfure interne à la chaîne A stabilisent l'ensemble de la structure (**Figure 24A**).

Les positions de ces trois ponts disulfure sont conservées chez les mammifères, mais au niveau de la séquence en acides aminés il existe des variations inter-espèces. Ainsi, l'insuline de porc est la plus proche de l'humaine, et diffère par un seul acide aminé dans la portion C-terminale de la chaîne B.

Les deux chaînes s'organisent dans une structure globulaire qui présente un noyau hydrophobe et une α -hélice dans chacune des chaînes (**Figure 24B**). L'interaction avec le récepteur de l'insuline se fait avec la participation des régions N- et C-terminale des deux chaînes.

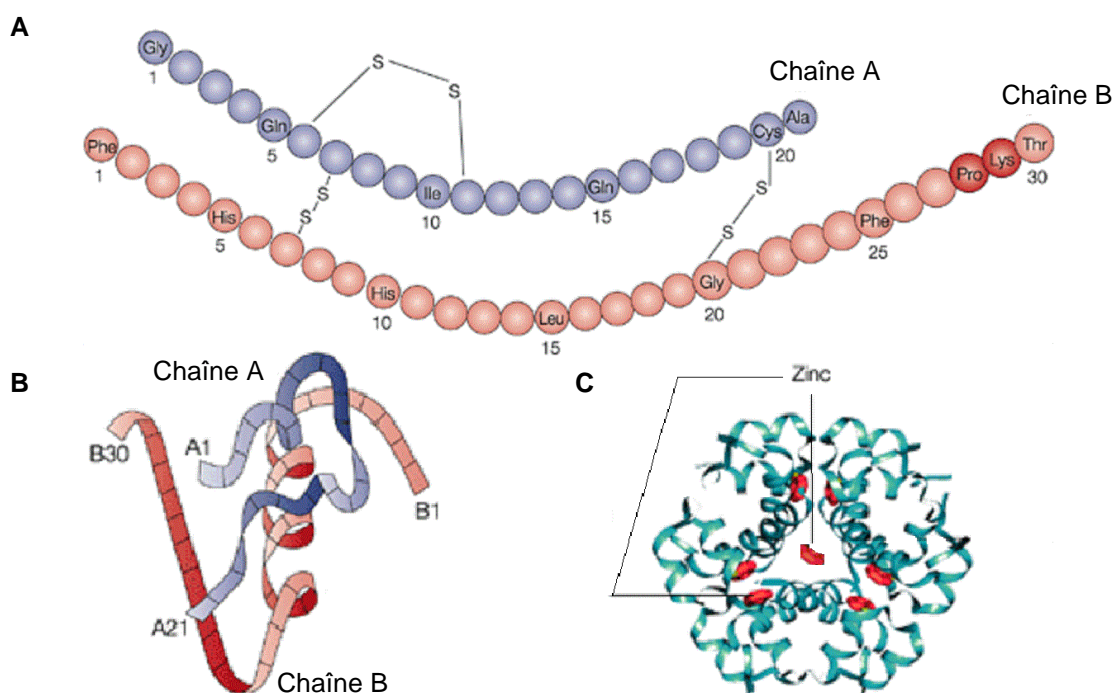


Figure 24. Structure primaire (A), tertiaire (B) et quaternaire (C) de l'insuline humaine (Adaptée de Owens 2002).

A pH neutre, et dans la gamme de concentrations physiologiques, l'insuline se présente sous forme monomérique, mais elle précipite en dimères lors que le pH est acide ou en concentrations supraphysiologiques. Ainsi, dans les granules de sécrétions, l'insuline se

trouve stockée sous forme de dimères, les deux monomères étant associés par deux atomes de zinc (en rouge dans la **Figure 24C**). De plus, trois dimères s'associent entre eux pour former des cristaux hexamériques, structures stabilisées par un atome de zinc supplémentaire (**Figure 24C**).

La plupart des mammifères ont une seule copie du gène de l'insuline (localisé sur le chromosome 11 chez l'Homme), exception faite pour la souris et le rat, qui ont deux copies non-alléliques du gène localisées sur deux chromosomes différents chez la souris (chromosomes 9 et 19) et sur le même chromosome chez le rat (chromosome 1). Chez la souris et le rat, le gène *Ins1* est issu de par la rétro-transposition d'un produit incomplet de la transcription du gène *Ins2*. *Ins1* est très similaire à *Ins2*, mais il manque le deuxième intron (Hay et Docherty 2006). Chez la souris, les deux gènes sont fonctionnels et l'insuline est synthétisée à partir des deux gènes dans un rapport de 1:2 (Deltour et al. 1993). L'expression d'*Ins2* est détectée au jour E8.5 du développement embryonnaire, tandis que l'expression de *Ins1* est détectable pour la première fois un jour plus tard. Le transcrit de *Ins2*, mais pas de *Ins1*, est exprimé aussi dans des neurones particuliers localisés dans l'hypothalamus, définis pour cette raison "neurones RIP" (Deltour et al. 1993; Song et al. 2010; Wicksteed et al. 2010).

Le gène humain de l'insuline a une structure similaire à l'*Ins2* murin, avec deux introns et trois exons. Le premier produit de ce gène (**Figure 25**) est un polymère de 1355 pb. Le premier exon code pour le **peptide signal**, le deuxième exon code pour la **chaîne B** de l'insuline et une partie du **peptide connecteur** (le peptide C), et le troisième exon code pour la deuxième partie du peptide C et la **chaîne A** de l'insuline (la synthèse de la protéine sera détaillée au §3.4.2). L'ARN messager privé des séquences introniques est un produit de 600 nucléotides qui est traduit en pré-pro-insuline, protéine de 11.5kDa.

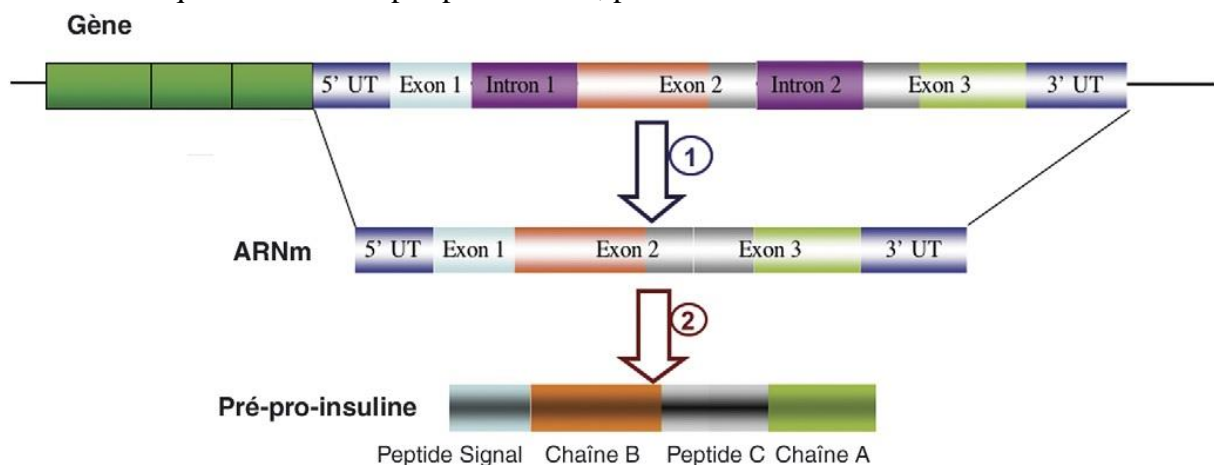


Figure 25. Transcription (1) et traduction (2) de la pré-pro-insuline à partir du gène humain de l'insuline. 5'UT et 3'UT: séquences non traduites (Adaptée de *Magnan 2005*)

3.4.2. La synthèse de l'insuline

3.4.2.1. Synthèse de l'insuline: la transcription du gène

3.4.2.1.1. Caractéristiques du promoteur du gène de l'insuline

La transcription du gène de l'insuline est contrôlée par des facteurs de transcription qui sont spécifiques de la cellule bêta pancréatique ou ubiquitaires. Des facteurs métaboliques et hormonaux modulent la liaison des facteurs de transcription aux éléments de régulation (*boxes*), pour former des complexes de transcription sur le promoteur du gène. Les éléments de régulation les mieux caractérisés et fortement conservés entre les espèces sont les *boxes* A et E, la séquence C2, la CRE et ILPR (**Figure 26**):

- Boxes A (A1, A2, A3/A4, A5): reconnues par PDX-1, facteur de transcription majeur dans le développement du pancréas, de la cellule bêta et de ses fonctions (§ 3.4.2.1.2).

- Boxes E (E1, E2 (chez le rat, E2-like chez l'Homme): impliquées dans l'activation mais aussi dans la répression du gène, reconnues par des facteurs de transcription de la famille HLH (*helix-loop-helix*), comme IEF-1 (*insulin enhancer factor-1*), qui interagit avec BETA2/NeuroD, un facteur actif dans le développement du pancréas très spécifique de la cellule bêta et du système nerveux.

- Box CRE (*cAMP Response Element*): elle permet la régulation de la transcription du gène par la voie cAMP-PKA et est la cible finale des voies de régulation activées par les hormones comme le GLP-1 ou le glucagon (l'augmentation de la concentration du AMPc qui suit l'activation par ces hormones active la PKA, qui phosphoryle CREB (*cAMP response Element Binding Protein*), lequel devient alors capable de se lier au CRE).

- Séquence C2: elle interagit avec deux facteurs de transcription cruciaux dans le développement du pancréas : PAX4, répresseur, et PAX6, activateur de la transcription (PAX4 n'est exprimé que dans la phase embryonnaire, donc n'est pas actif dans la régulation du gène de l'insuline chez l'adulte).

- Région ILPR (*insulin-Linked polymorphic region*): région avec un fort niveau de polymorphisme, dû surtout au nombre variable de répétitions en tandem qu'elle peut contenir. L'intérêt de cette région est l'association entre le nombre moyen de répétitions et la prédisposition au DT1 et DT2, qui pourrait être induite par des altérations dans la transcription du gène de l'insuline.

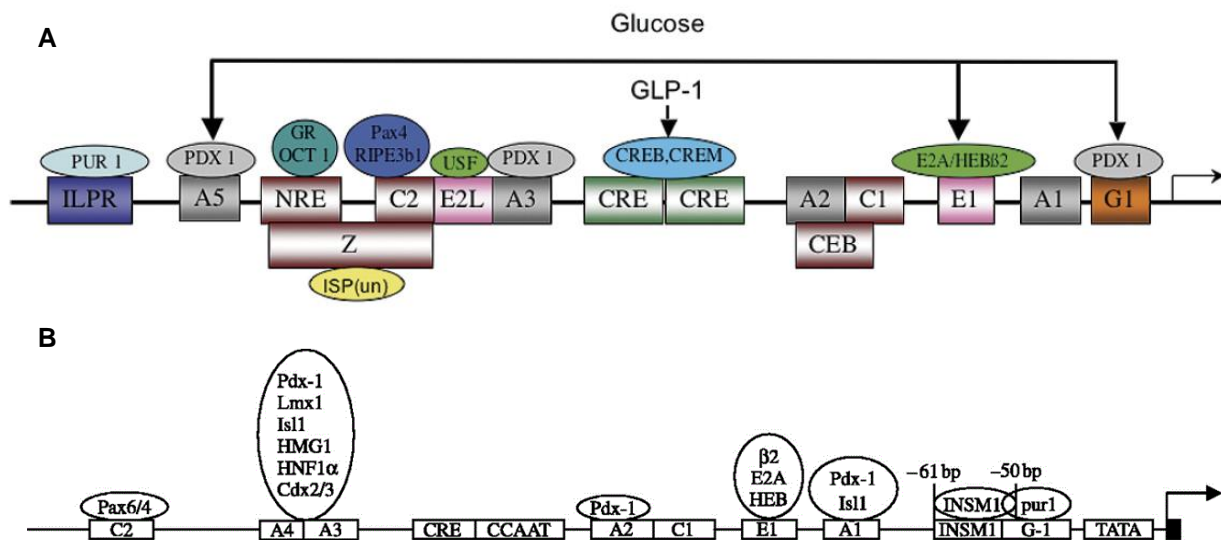


Figure 26. Structure du promoteur du gène de l'insuline humaine (A) et de rongeur (B) (Magnan 2005, Wang 2008)

3.4.2.1.2. Les facteurs de transcription du gène de l'insuline

Les facteurs de transcription qui régulent la transcription du gène de l'insuline sont les mêmes que ceux qui régulent la différenciation de la cellule bêta pancréatique:

- **PDX-1** (*Pancreatic and duodenal homeobox 1*) est le facteur qui lie les *boxes* de type A en réponse au glucose (Melloul et al. 1993). Comme précédemment dit, ce facteur est indispensable dans le développement embryonnaire du pancréas, où il est nécessaire à l'acquisition de la morphologie prénatale et postnatale du pancréas et au contrôle de la distribution entre composants du pancréas endocrine et exocrine. En effet, les souris PDX1KO naissent avec un pancréas rudimentaire et survivent seulement quelques jours (Jonsson et al. 1994). Sa présence est nécessaire pour la fonctionnalité de la cellule bêta (en termes de production et sécrétion d'insuline) et la survie cellulaire (Melloul et al. 1993). En effet, l'inactivation de PDX-1 dans la cellule bêta chez la souris induit le développement d'un diabète (Gannon et al. 2008). PDX-1 est aussi impliqué dans les effets délétères de l'hyperglycémie et des dyslipidémies, qui en réduisent l'expression (la condition de glucotoxicité diminue l'expression de PDX-1, tandis qu'en condition de lipotoxicité son expression est augmentée, mais la protéine est exclue du noyau) (Hagman et al. 2005).

- **BETA2/NeuroD** (*neuronal differentiation 1*) régule la transcription du gène de l'insuline par l'interaction avec la box E, en association avec la protéine E47 (Naya et al. 1995). De façon similaire à PDX-1, les souris déficientes pour BETA2/NeuroD ne survivent que quelques jours après la naissance, elles ont un nombre de cellule bêta réduit, une morphologie de l'îlot altérée et une hyperglycémie sévère (Naya et al. 1997). Il régule

également la transcription des gènes de la GK (glucokinase) et de SUR1 (sulfonylurea receptor 1), sous-unité du canal potassique (Kim et al. 2002; Moates et al. 2003), et il participe au maintien de l'identité cellulaire en réprimant l'expression du gène de la somatostatine dans les cellules bêta (Itkin-Ansari et al. 2005).

- **MafA** (*v-maf avian musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog A*) régule la transcription du gène de l'insuline avec PDX-1 et BETA2/NeuroD. Son invalidation est associée au diabète et à la perturbation de la sécrétion d'insuline, et son expression est réduite dans les modèles murins de DT2 (Kitamura et al. 2005).

- **Nkx2.2** (*NK2 homeobox 2*) est exprimée dans toutes les cellules du pancréas endocrine, exceptée la cellule delta, et dans le système nerveux central. La souris invalidée pour Nkx2.2 développe une hyperglycémie sévère et meurt peu après la naissance. Son invalidation génère une population de cellules qui ne produit aucune hormone, et qui exprime seulement certains marqueurs de la cellule bêta mais qui est déficiente pour des marqueurs importants décisifs comme GLUT2 et NKX6.1. Sa présence est nécessaire à la différenciation complète de la cellule bêta (Sussel et al. 1998).

- **Nkx6.1** (*NK6 homeobox 1*) est un autre facteur fondamental dans la différenciation et dans le maintien de l'identité de la cellule bêta. Son inactivation spécifiquement dans la cellule bêta pancréatique chez la souris adulte induit une hypoinsulinémie et un diabète. Il est essentiel pour le contrôle de la biosynthèse et la sécrétion d'insuline et la prolifération des cellules bêta. Au cours du vieillissement, chez la souris, les cellules bêta déficientes en Nkx6.1 acquièrent les caractéristiques des cellules delta (Taylor et al. 2013).

3.4.2.1.3. Contrôle de la transcription du gène de l'insuline

3.4.2.1.3.1. Contrôle par le glucose

Le glucose est le plus puissant régulateur physiologique de la transcription du gène de l'insuline. Son activité s'exerce d'une part sur la transcription du gène, et d'autre part sur la stabilisation de l'ARN messager.

- Contrôle de la transcription du gène:

Le glucose ne se lie pas directement aux *boxes* d'ADN sur le promoteur du gène de l'insuline, mais module la fixation de différents facteurs de transcription (PDX-1, MafA, BETA2/NeuroD) par des voies qui ne semblent pas impliquer une augmentation des transcrits de ces protéines, mais plutôt des modifications qui les rendraient actives, et qui impliqueraient l'AMPc, des MAPKs et de la PI3K, l'augmentation du Ca²⁺ intracellulaire et les modifications post-traductionnelles (Poitout et al. 2006).

En particulier, le glucose régule la transcription du gène de l'insuline *via* le recrutement de PDX-1 sur les boxes A3 et A5. Il a été montré que le potentiel de transactivation de PDX-1 est aussi modulé par des modifications post-traductionnelles tels que la phosphorylation catalysée par les protéines kinases SAPK2 (*stress-activated protein kinase 2*) (Macfarlane et al. 1999), ou CK2 (*casein kinase II*) (Welker et al. 2013) qui promeuvent la translocation de PDX-1 au noyau, et influencent sa capacité à recruter les cofacteurs p300 et à se dissocier de HDAC. D'autres modifications qui régulent l'activité de PDX-1 impliquent la OGT et le SUMO-1 (*small ubiquitin-related modifier 1*) (Gao et al. 2003; Kishi et al. 2003).

- Contrôle de la stabilisation du transcrit:

Deux éléments localisés dans le 3' UTR de l'ARN messager ont été proposés pour être impliqués dans cet effet : une séquence conservée UUGAA et une séquence riche en pyrimidines (Welsh et al. 1985; Wicksteed et al. 2001). La séquence riche en pyrimidines est reconnue par des protéines tels que la PCBP (*poly(C)-binding protein*) et la PTB (*polypyrimidine tract-binding protein*) qui assemblent un complexe de ribonucléoprotéines à l'ARN messager, ce qui conduit à sa stabilisation et à la préparation pour les étapes suivantes (Tillmar et al. 2002).

3.4.2.1.3.2. Contrôle par les acides gras

Les acides gras sont des facteurs qui stimulent la sécrétion d'insuline. Par contre, leurs effets peuvent devenir néfastes suite à une exposition chronique, ce qui est défini comme la lipotoxicité. L'exposition chronique au palmitate altère l'expression du gène de l'insuline (Jacqueminet et al. 2000) par des mécanismes qui diminuent la capacité du glucose à activer la transcription du gène de l'insuline, par inhibition de l'activité du promoteur **(a)** et par l'augmentation de la synthèse de céramide **(b)** (Kelpke et al. 2003).

(a) La diminution de l'activité du promoteur est due à la diminution du recrutement de PDX-1 et Maf-A. PDX-1 est affecté dans sa capacité de translocation au noyau, tandis que MafA est affecté au niveau de son expression (Hagman et al. 2005).

(b) Dans la cellule bêta, les acides gras sont converti en LC-Acyl-coA, qui, en condition physiologique, sont transférés dans les mitochondries par la CPT-1 (palmytoyltransferase cytosolique), où ils sont transformés par la bêta-oxydation. Dans le cas particulier où les LC-Acyl-coAs s'accumulent dans le cytoplasme, ils sont estérifiés en céramides, qui ont aussi une fonction néfaste sur la transcription du gène de l'insuline. La formation des céramides à partir de palmitate inhibe la voie Akt/PKB via l'activation de la

PKC. La diminution de l'activité d'Akt/PKB lève l'inhibition du facteur de transcription FOXO1, qui passe dans le noyau où il réprime ses gènes cibles, dont le gène de l'insuline (Kelppe et al. 2003).

3.4.2.1.3.3. Contrôle par les facteurs hormonaux

- **Incrétines:** outre son rôle sur la sécrétion de l'insuline (§3.4.3.3.2), GLP-1 stimule l'expression de PDX-1 (Wang et al. 1999b) et stabilise le transcrit du gène de l'insuline (Drucker et al. 1987).

- **Hormone de croissance (GH) et prolactine:** stimulent la transcription du gène de l'insuline (Hussain et Habener 2000; Melloul et al. 2002).

- **Insuline:** l'insuline elle-même est capable de réguler positivement l'expression de son propre gène par une action autocrine qui implique la participation du récepteur COUP-TFII (Perilhou et al. 2008). En présence de glucose, l'insuline sécrétée inhibe l'activité transcriptionnelle de COUP-TFII, qui normalement réprime la transcription du gène de l'insuline, ce qui se traduit par une augmentation de la synthèse de l'ARNm de l'insuline. Au contraire, en absence de glucose, COUP-TFII réprime le gène de l'insuline en action avec FOXO1, qui est augmenté en état de "fasting". De plus, l'insuline favorise la fixation de PDX-1 sur la région du promoteur A3 de son propre gène par un mécanisme autocrine impliquant l'IRS-PI3 kinase (Wu et al. 1999).

- **Leptine:** la leptine inhibe la transcription du gène de l'insuline via des séquences sensibles à la leptine sur le promoteur de son gène. Ce contrôle négatif permet de prévenir l'accumulation excessive des triglycérides dans le tissu adipeux (Roduit et Thorens 1997; Seufert et al. 1999).

3.4.2.2. La synthèse de l'insuline: du gène à la protéine

Le premier produit de la traduction du gène de l'insuline est la pré-pro-insuline, produit de 11,5 kDa, représenté par une seule molécule où les deux chaînes A et B sont connectées par le C-peptide (**Figure 27A**). Les 25 premières acides aminés du côté N-term représentent le peptide signal, des résidus pour la plus part hydrophobes qui permettent le passage de la pré-pro-insuline en cours d'élongation dans la lumière du réticulum endoplasmique par interaction avec le SRP (*signal recognition particle*). Le peptide signal est enlevé après le passage dans le réticulum endoplasmique, ce qui conduit à une protéine de 9kDa, la pro-insuline (étape de 10-20 min environ). Cette molécule est transférée dans les micro-vesicules du Golgi (20 min environ) (**Figure 27B**), où la pro-insuline est transformée

en insuline par l'action d'autres protéases, comme les deux endopeptidases PC2 et PC3 (*prohormone convertase 2 et 3*) et la carboxypeptidase H (étape de 30-120 min). Ces étapes de protéolyse permettent le clivage du peptide C avec libération de l'insuline bicatenaire. Dans ces vésicules, qui subissent une acidification, l'insuline précipite avec les ions zinc, où les microcristaux hexamériques d'insuline-zinc représentent la forme de stockage de l'hormone (**Figure 24C**). Ils restent sous cette forme jusqu'au moment de la sécrétion, avec libération d'insuline et de peptide C en proportions équimolaires. En conditions physiologiques, 95% de l'insuline est sécrétée dans sa forme mature, tandis que 5% est sécrété sous forme de pro-insuline.

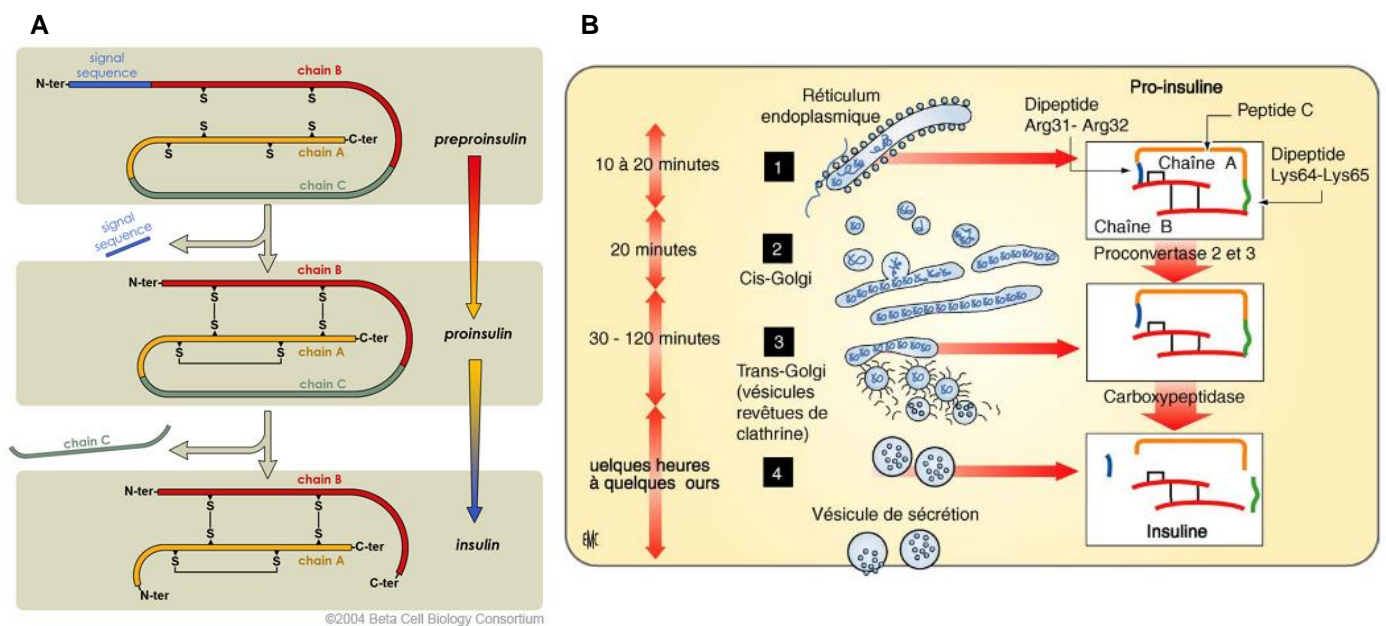


Figure 27 : **A**. Maturation de la pré-pro-insuline en insuline. Bleu: peptide signal, rouge: chaîne B, gris: peptide C, jaune: chaîne A (*Beta Cell Biology Consortium 2004*). **B**. Schéma de synthèse et transport intracellulaire de l'insuline (*Magnan 2005*)

3.4.3. La sécrétion de l'insuline

3.4.3.1. L'exocytose des vésicules d'insuline

L'exocytose des vésicules d'insuline est un processus constitué de plusieurs étapes, dont l'amarage (*docking*), l'accolement (*priming*) et la fusion finale avec la membrane plasmique.

Ces étapes demandent la participation de plusieurs éléments: les canaux calciques voltage dépendants (pour l'augmentation de la $[Ca^{2+}]_c$, signal qui déclenche le relargage des vésicules), le cytosquelette (pour le transport intracellulaire des vésicules), les protéines monomériques à activité GTPasique, et les protéines SNARE (pour l'accolement et la fusion de la vésicule à la membrane).

1) Le transport intracellulaire des vésicules

Le cytosquelette est nécessaire à l'exocytose des granules de sécrétion, car il maintient leur position quand la cellule n'est pas stimulée, et favorise leur déplacement lors du recrutement à la membrane (Howell et Tyhurst 1986). Les processus de sécrétion demandent aussi la participation des microtubules qui, avec une action glucose et ATP dépendante, transportent les granules de l'intérieur de la cellule aux filaments d'actine à la périphérie cellulaire. En conditions basale (non stimulée par le glucose) (**Figure 28A**), l'actine (F-actin) forme des guides de transport des granules d'insuline et simultanément constitue une barrière qui bloque la formation des complexes de fusion des SNARE (complexe syntaxin-VAMP-SNAP, **Figure 29B** pag 111). L'arrivée du Ca^{2+} qui suit la stimulation par le glucose diminue les interactions des granules avec les filaments d'actine, et détruit de manière transitoire les interactions de l'actine avec les SNARE de la membrane (syntaxine) (Thurmond et al. 2003; Jewell et al. 2008). Cette réorganisation transitoire de l'actine permet aux granules d'accéder à la membrane plasmique (PM), ce qui conduit à l'amarrage, la fusion (jouée par des interactions entre VAMP2 et syntaxine) (**Figure 28B**) et la libération d'insuline.

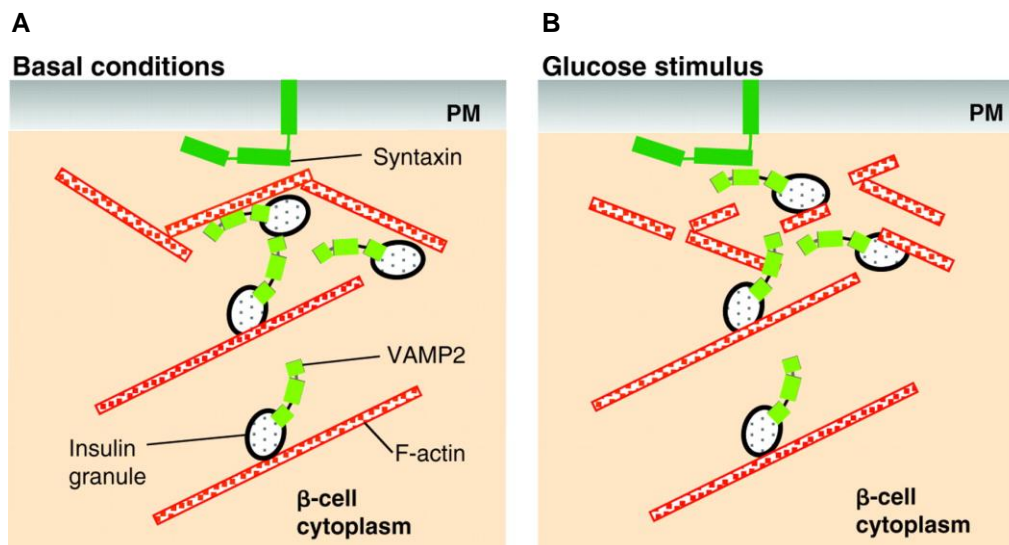


Figure 28. **A.** Disposition du cytosquelette et des protéines SNARE en condition basale **B.** Remodelage de l'actine et mobilisation des granules d'exocytose pour la sécrétion de l'insuline induite par le glucose (Wang 2009).

2) La fusion des vésicules à la membrane:

Le processus d'accolement fait intervenir (**Figure 29A**):

- Des protéines à activité GTPasique (*small GTPase*), dont l'activité est essentielle pour coupler le stimulus du glucose au remodelage du cytosquelette. Ces protéines se classent en 1) GTPase de la famille Rho, comme Cdc42 et Rac1, qui co-localisent avec les granules et participent à la sécrétion par remodelage de l'actine et en conduisant les granules à la

membrane par interaction avec les protéines SNARE vésiculaires (Nevins et Thurmond 2006; Wang et al. 2007); 2) GTPase de la famille Rab, comme Rab3 et Rab27, aussi indispensables pour la sécrétion des granules et impliquées dans les phases d'amarrage et accolement des vésicules (Regazzi et al. 1996; Yi et al. 2002); 3) GTPase de la famille Ras (Rap1 et RalA) et Epac2 (leur *GTP exchanging factor* (GEF) *exchange protein activated by cAMP*), nécessaires dans la fusion des granules dépendants de AMPc (Shibasaki et al. 2007) et aussi impliqués dans les phases d'amarrage et l'accolement des vésicules (les effets de GLP-1 et GIP semblent passer aussi par le "pathway" Rap1 (Kwan et Gaisano 2005).

- **Protéines SNARE**, (*Soluble NSF Attachment Protein REceptor*) cruciales dans le processus d'exocytose et représentées par la **syntaxine**, la **VAMP** (*vesicle-associated membrane protein*, aussi connue comme synaptobrevine), la **synaptotagmine** et les **SNAP23** et **SNAP25**. L'association puis la fusion des deux couches bilipidiques (à la fois de la vésicule de sécrétion et de la membrane cellulaire) se font grâce à l'interaction des SNARE localisées sur les granules d'exocytose (synaptobrevine et synaptotagmine) et sur la membrane cellulaire (syntaxine) (**Figure 29B**).

Le stimulus glucose active les voies de signalisation qui se terminent par la réorganisation des microtubules et du cytosquelette, par l'activation des *small GTPase* et par le rapprochement et l'activation des vésicules de sécrétion avec la membrane, ce qui au final se traduit par la sécrétion de l'insuline. Les GTPases et leurs facteurs d'activation sont nécessaires dans la formation des complexes SNARE, première étape dans l'amarrage du granule à la membrane. Après la formation du complexe SNARE (entre les protéines SNARE des vésicules et les SNARE de la membrane, favorisé par l'activité de GTPase), la vésicule et

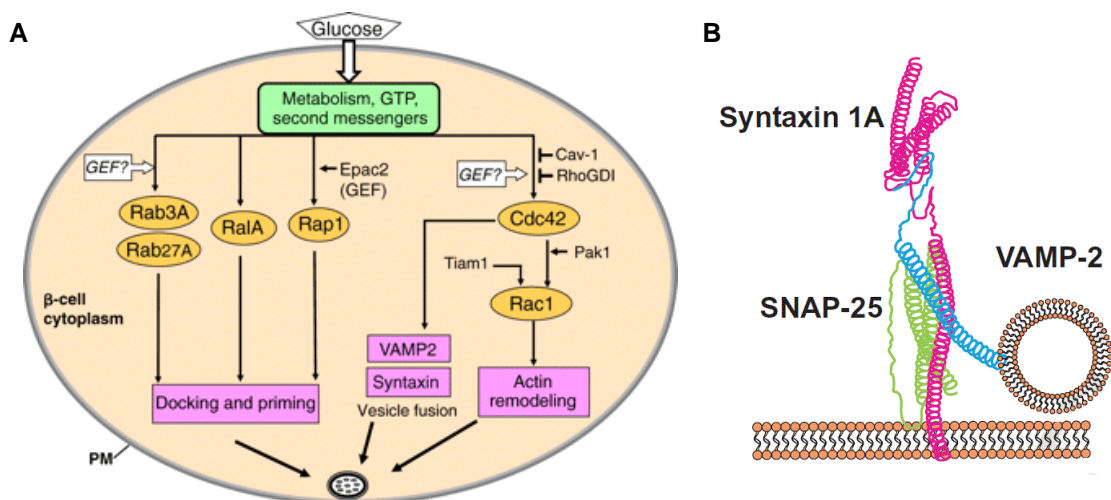


Figure 29. A. Principales protéines impliquées dans l'exocytose des granules d'insuline (Wang 2009) B. illustration de la fusion d'un granule de sécrétion à la membrane par l'interaction des SNARE (VAMP-2) vésiculaires avec les SNARE membranaires (SNAP-25, Syntaxin 1A) (Renström and Rorsman 2009).

la membrane fusionnent selon un processus qui nécessite de l'ATP (car implique une protéine à activité ATPasique) et des ions Ca^{2+} (pour les deux sites de liaison au calcium de la SNARE synaptotagmine, et pour inactiver une protéine qui empêche l'exocytose en absence de stimulus, la Go) (Gerber et Südhof 2002; Duman et Forte 2003). Le lumen vésiculaire entre dans la continuité du lumen extracellulaire et l'insuline est libérée de la cellule.

D'autres protéines sont connues pour interagir avec les SNARE et avoir un rôle régulateur dans la sécrétion de l'insuline, comme Munc18, Doc2b et la granophiline (Wang et Thurmond 2009).

3.4.3.2. Le contrôle de la sécrétion de l'insuline

La cellule bêta pancréatique représente le type cellulaire le plus abondant dans l'îlot (50-80% du total selon l'espèce), et elle est dédiée à la production et à la sécrétion de l'insuline. La fonction insulino-sécrétoire de la cellule bêta est étroitement contrôlée, puisque une production excessive d'insuline peut conduire à l'hypoglycémie, et qu'une sécrétion insuffisante favorise sur le long terme le développement du diabète. Le glucose est le seul insulino-sécrétagogue capable d'induire la sécrétion d'insuline de façon autonome, et il est le plus puissant facteur stimulant la production de cette hormone. Toutefois, la cellule bêta répond également à d'autres éléments nutritifs (acides aminés, acides gras et corps cétoniques) et à la stimulation neuro-hormonale (glucagon, glucagon-like peptide-1 (GLP-1), acétylcholine (Ach) et autres), mais toujours d'une manière absolument glucose-dépendante, ce qui est défini comme "effet permissif du glucose" (Hermans et al. 1987).

Tous les stimuli ont comme résultat final l'augmentation de la concentration de calcium cytosolique ($[\text{Ca}^{2+}]_c$), qui est l'effecteur indispensable pour l'exocytose des vésicules. L'augmentation de calcium cytosolique ($[\text{Ca}^{2+}]_c$) est donc la condition nécessaire pour la sécrétion d'insuline. Cette augmentation est le résultat de **deux voies**:

- La première voie implique le métabolisme oxydatif du glucose et les canaux potassiques (*triggering pathway*, pag 113), Elle est activée par le glucose et peut être potentialisée par les métabolites dérivés d'autres substrats énergétiques, tels que les acides gras et les acides aminés (modèle tricyclique, pag 115);

- La deuxième voie comprend toutes les voies indépendantes des canaux potassiques (récepteurs couplés aux protéines G, phospholipases, protéines kinases, seconds messagers...) qui sont activées en réponse aux signaux neuro-endocriniens (*amplifying pathway*, pag 114).

La sécrétion d'insuline est induite par l'augmentation progressive de la concentration de glucose d'une valeur basale faible (environ 3 mM) à 10-20 mM. Chez l'Homme, elle se

fait selon un profil biphasique (Henquin et al. 2006). Chez le sujet sain, après administration d'un bolus de glucose, une première phase rapide et transitoire (~3-10 min) précède une seconde phase de sécrétion (**Figure 30**). **Deux modèles** existent pour expliquer **le caractère biphasique** de la sécrétion de l'insuline (pag 115). Le premier modèle représente la vision classique mais plutôt simpliste de la sécrétion de l'insuline, et le deuxième modèle est une vision plus récente et donc pas encore complète, mais qui se rapprocherait plus de la situation réelle.

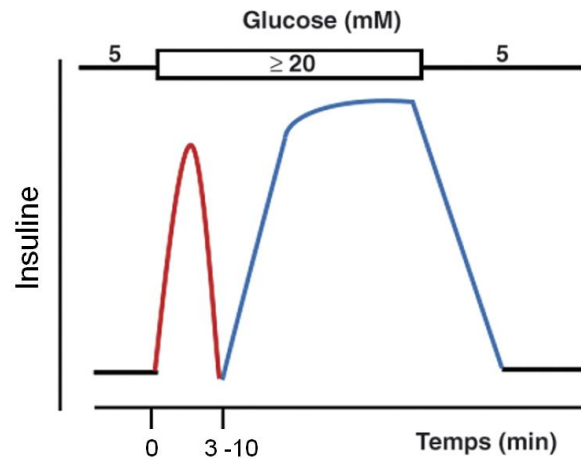


Figure 30: Caractère biphasique de la sécrétion de l'insuline en réponse au glucose (Adaptée de Magnan 2005)

3.4.3.2.1 Les deux voies de sécrétion de l'insuline

A) La voie de déclenchement (*triggering pathway*, **Figure 31**)

Le glucose entre dans la cellule par le transporteur GLUT1/GLUT2 (chez l'Homme et chez le rongeur, respectivement) (De Vos et al. 1995; Thorens et Mueckler 2010). Une fois dans la cellule, le glucose est immédiatement phosphorylé par la GK, qui représente la *rate-limiting step* de la glycolyse et est considéré comme senseur du glucose. Le glucose s'engage dans la cascade de réactions de la glycolyse, qui se terminent par la production de deux molécules de pyruvate. Le pyruvate entre dans les mitochondries, converti en Acetyl-coA qui est transformé par les réactions du cycle de Krebs (TCA) et oxydé en CO₂ et H₂O, avec production d'ATP. L'augmentation de la concentration d'ATP intracellulaire fait augmenter le ratio [ATP]/[ADP] intracellulaire, ce qui déclenche la fermeture des canaux potassiques-ATP dépendants (K⁺_{ATP}) sur la membrane plasmique (activés par l'ADP et le Mg²⁺, inactivés par l'ATP). Il en résulte une dépolarisation de la membrane plasmique qui induit l'ouverture des canaux calciques-voltage dépendant. L'augmentation de la [Ca²⁺]_c déclenche alors l'exocytose des granules de sécrétion d'insuline. L'ensemble de ces réactions est défini comme le *triggering pathway* ou voie de déclenchement de la sécrétion de l'insuline.

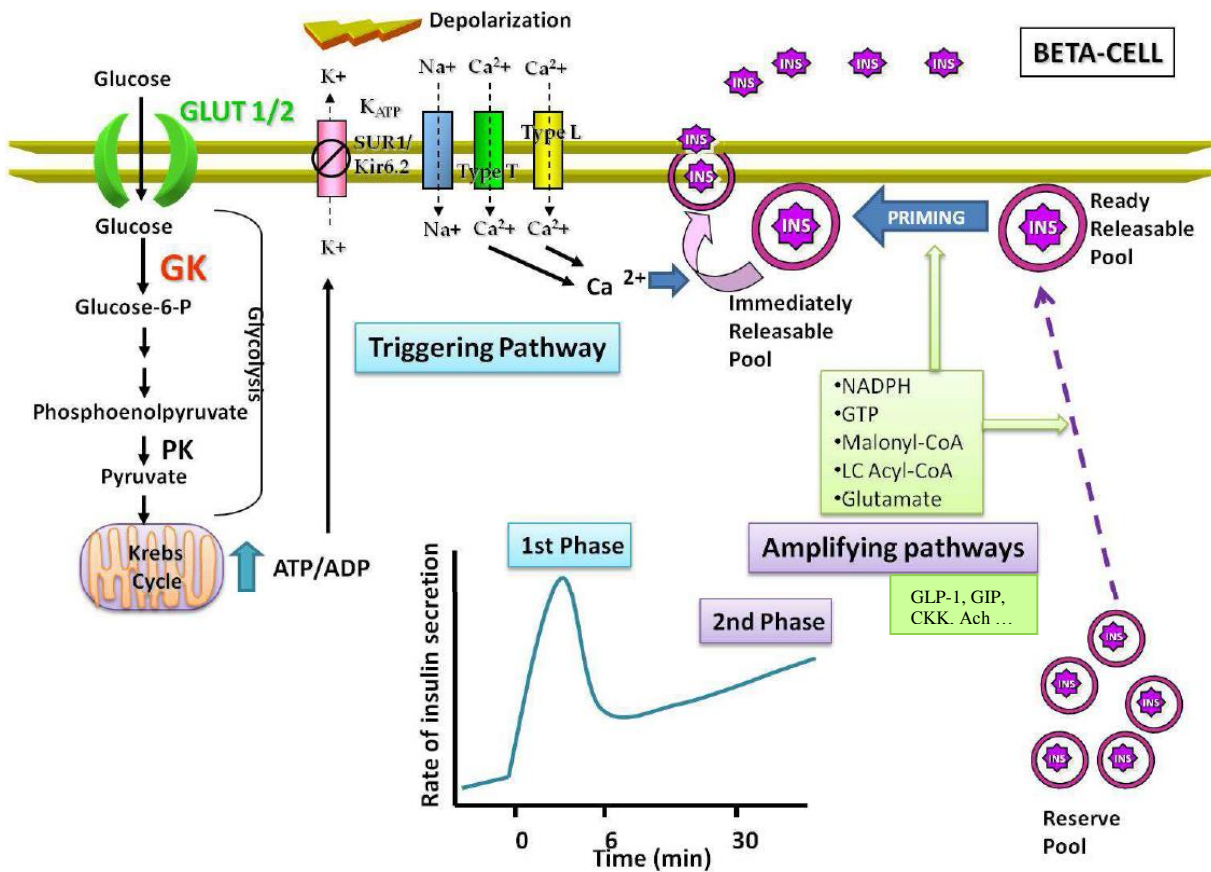


Figure 31. Modèle classique de la sécrétion de l'insuline: les deux phases de sécrétion sont dues au *triggering pathway* (glucose) et à l'*amplifying pathway* (acides gras, acides aminés, signaux hormonaux et neuronaux...), qui déclenchent le relargage des granules (§4.4.3.2.2) du *Ready Releasable Pool* et du *Reserve Pool*, respectivement (Henquin 2000, Lazo de la Vega-Monroy and Fernandez-Mejia, 2011).

B) La voie d'amplification (*amplifying pathway*, **Figure 31**)

Les stimuli autres que le glucose impliquent des voies indépendantes des canaux K^+_{ATP} , qui sont définies comme voies amplificatrices (*amplifying pathway*). Ces voies sont activées par les acides aminés, les acides gras, les corps cétoniques, les hormones et les stimuli neuronaux, qui ont en commun la capacité d'augmenter la $[Ca^{2+}]_c$ par des voies qui activent le relargage de cet ion par le réticulum endoplasmique. Ces voies sont induites par l'activation des récepteurs associés à la phospholipase C (PLC), comme ceux activés par les acides gras libres (AGL), la CCK et l'Ach. La PLC hydrolyse le phosphatidyl inositol 4-5 biphosphate (PIP_2) en inositol 1,4,5 triphosphate (IP_3) et diacylglycérol (DAG). L' IP_3 lie les récepteurs à l' IP_3 sur le réticulum endoplasmique et induit la libération du calcium, ce qui augmente la concentration du pool cytosolique. Le DAG active la PKC qui régule positivement la sécrétion de l'insuline. D'autres voies impliquent la PKA, suite à l'augmentation de l'AMPc produit par l'AC, activée par la sous-unité G_a des récepteurs couplés à protéine G (GPR), comme celui du glucagon, de GLP-1 et de GIP.

L'amplification consiste en l'augmentation de l'efficacité du Ca^{2+} sur l'exocytose des granules d'insuline (Henquin 2000). Il existe une hiérarchie claire entre les deux voies: la voie de déclenchement prédomine sur la voie d'amplification, qui reste fonctionnellement silencieuse aussi longtemps que la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ n'a pas été augmentée par la première voie.

3.4.3.2.2. Les modèles de sécrétion biphasique de l'insuline

Deux modèles principaux ont été proposés pour expliquer la dynamique de la sécrétion d'insuline:

1) Le premier modèle (**Figure 31**) est basé sur la distribution des granules d'insuline dans différents types de pools. Ce modèle propose que la première phase de la sécrétion d'insuline soit le résultat de la fusion avec la membrane plasmique d'un ensemble de granules accolées à la membrane, "prêtes à fusionner" (*Ready Releasable Pool*, RRP), ce qui représente environ 1% de la totalité des granules (Bratanova-Tochkova et al. 2002). La deuxième phase est due à la migration et la fusion à la membrane d'un ensemble de granules de réserve (*Reserve Pool*, RP) situées plus loin dans le cytoplasme et associées à des microfilaments et des microtubules du cytosquelette, et qui sont recrutées lors de la stimulation pour fusionner avec la membrane plasmique. Ce modèle classique de sécrétion reflète la notion que la première phase de sécrétion est attribuable au stimulus venant du *triggering pathway*, identifié comme la voie dépendante du canal potassique K^+_{ATP} , et que la deuxième phase soit due aux *amplifying pathways*, correspondant aux voies indépendantes des canaux potassiques.

2) Le deuxième modèle (**Figure 32**) suggère que le profil biphasique de sécrétion de l'insuline reflète la dynamique d'arrivée des signaux de déclenchement de l'exocytose, avec une contribution égale des *triggering pathways* et *amplifying pathways*. Par conséquent, la sécrétion d'insuline de deuxième phase résulte de l'itération de la première phase (Henquin 2011). De plus, les deux phases mobilisent des granules provenant d'un seul pool recruté lors de la stimulation et immédiatement fusionné à la membrane plasmique. Ainsi, il n'existerait qu'une seule réserve de granules d'insuline située à plus de 50 nm de la membrane plasmique, qui serait immédiatement libérée (Seino et al. 2011).

3.4.3.3. Les modulateurs de la sécrétion d'insuline

3.4.3.3.1. Les éléments nutritifs: le modèle tricyclique

Comme précédemment dit, le glucose stimule la sécrétion de l'insuline par la voie de signalisation $\text{K}^+_{\text{ATP}}/\text{Ca}^{2+}$, mais cette voie n'est pas le seul mécanisme intracellulaire à relier le

stimulus métabolique à la sécrétion d'insuline. En fait, il est montré que le glucose, comme les lipides et les acides aminés, peuvent influencer la sécrétion de l'insuline par les intermédiaires et les cofacteurs produits par leur métabolisme intracellulaire (**Figure 33**), avec des effets directs sur l'exocytose des granules d'insuline, mais aussi sur le mouvement des granules, sur le changement de l'activité des canaux ioniques ou sur les processus métaboliques en amont.

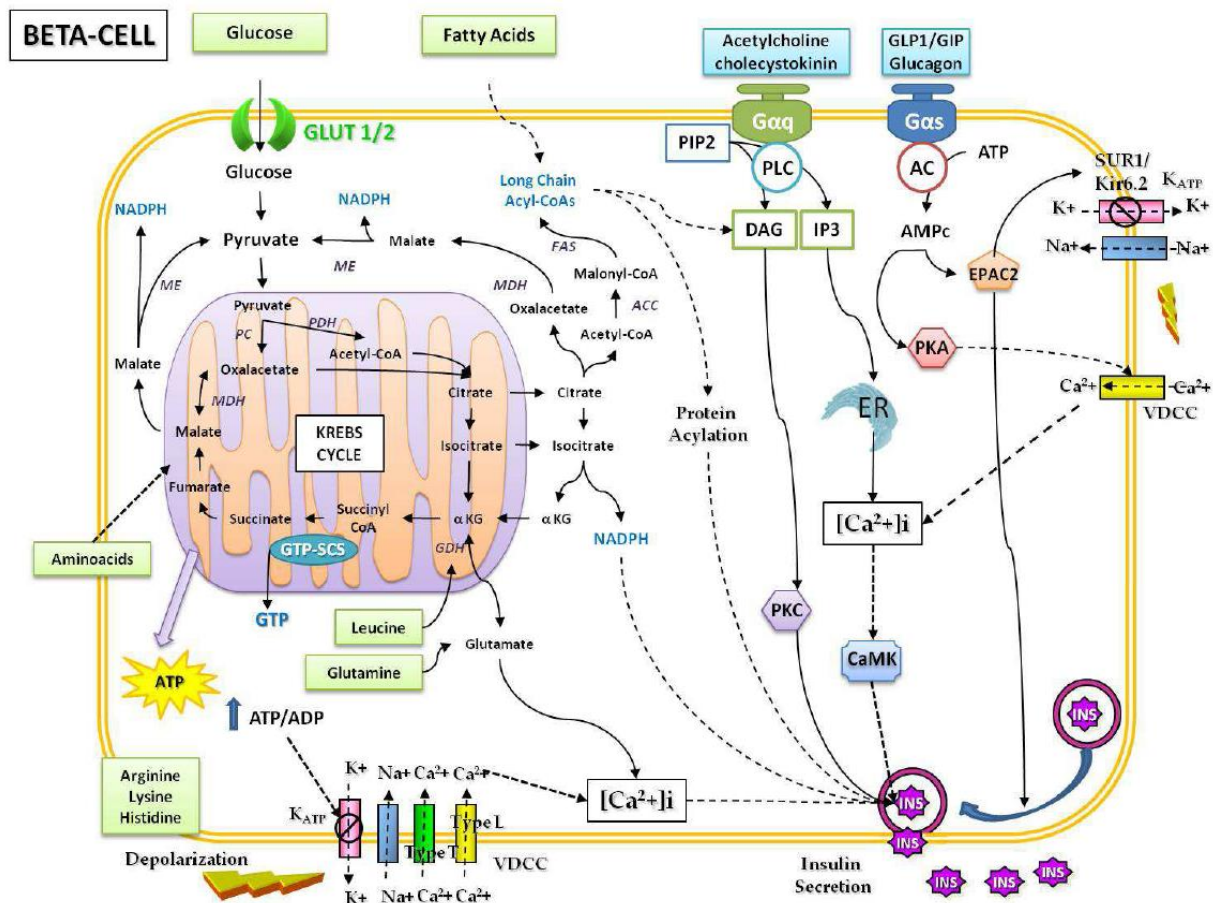


Figure 32 Modèle alternatif de la sécrétion de l'insuline: les deux phases de sécrétion sont dues à l'itération de deux vagues de signaux de toutes origines (glucose, acides gras, acides aminés, signaux hormonaux et neuronaux...), qui déclenchent le relargage d'un pool unique de granules (Henquin 2011, Lazo de la Vega-Monroy and Fernandez-Mejia, 2011).

Dans la cellule bêta, la glycolyse est étroitement couplée au métabolisme oxydatif mitochondrial par les navettes du NADH (en particulier celles du glycérol-3-phosphate et du malate/aspartate), qui transfèrent aux mitochondries les électrons du NADH produits par la glycolyse pour la génération d'ATP (Jitrapakdee et al. 2010). Le processus de reconstitution et d'augmentation des intermédiaires du cycle de Krebs est dit *anaplérose*. Il représente un aspect important de la sécrétion puisque l'activation du métabolisme mitochondrial non seulement augmente le cycle de Krebs et la production d'ATP, mais génère aussi d'autres

signaux impliqués dans les *amplification pathways* de la sécrétion d'insuline (Maechler et al. 2010). Dans le cas du glucose, l'enzyme clé de ce processus est la pyruvate carboxylase, qui produit l'oxaloacétate (à partir du pyruvate), lequel se lie à l'acétylCoA, réaction catalysée par la citrate synthase, et conduit à l'augmentation du citrate mitochondriale. Pour les acides aminés, l'enzyme clé de l'anaplérose est la glutamate dehydrogenase mitochondriale (GDH), qui catalyse la désamination oxydative du glutamate en α -cétoglutarate, et en parallèle la glutaminase, qui catalyse la désamination de la glutamine en glutamate. Les intermédiaires du cycle de Krebs sont importants non seulement pour leur rôle catalytique dans l'activité du cycle, mais aussi dans la production de métabolites des voies d'amplification. Par exemple, le citrate, est transformé dans le cytoplasme en malonyl-coA qui, par inhibition de l'enzyme CPT1, inhibe la β -oxydation des acides gras. Les acides gras restent dans le cytoplasme sous forme de LC-Acyl-coA qui ont plusieurs fonctions de signalisation, comme par exemple l'acylation des protéines qui composent la machine de sécrétion des granules d'insuline (ex. SNAP25, voir §3.4.3.1.) (Corkey et al. 2000).

La sortie des intermédiaires du cycle de Krebs de la matrice mitochondriale au cytoplasme est définie comme processus de *cataplérose*. Certains intermédiaires qui sortent du cycle de Krebs entrent dans le cycle du pyruvate avec génération de NADPH cytoplasmique, important dans les processus d'exocytose. En plus du glucose et des acides aminés, les lipides participent à la régulation de la sécrétion d'insuline, par l'intervention de molécules dérivées du cycle des glycérolipides/acides gras libres (GL/FFA en **Figure 33**).

Ainsi, trois cycles métaboliques inter-dépendants jouent un rôle essentiel dans la sécrétion d'insuline induite par le glucose, les acides aminés et les acides gras libres: le cycle de Krebs, le cycle du pyruvate et le cycle GL/FFA, ce qui compose le *modèle tricyclique de la sécrétion de l'insuline*.

La signalisation intracellulaire qui relie un stimulus métabolique à la sécrétion d'insuline passe aussi par les récepteurs membranaires. Les acides gras libres sont reconnus par le récepteur GPR40 (codé par le gène *Ffar1*) activé par les acides gras à longue et moyenne chaîne et médiateur d'environ la moitié de la réponse sécrétrice induite par les acides gras libres (Ferdaoussi et al. 2012), et GPR43 et GPR41 (codé par les gènes *Ffar2* et *Ffar3* respectivement) activés par les acides gras à courte chaîne et qui ont plutôt une action inhibitrice sur la sécrétion de l'insuline par couplage avec des protéines Gi (Tang et al. 2015). Des études ont rapporté l'existence de récepteurs au sucre et aux acides aminés sur la cellule bêta. Le récepteur de goût sucré T1R2 participe à la potentialisation de la sécrétion d'insuline induite par le fructose (Kyriazis et al. 2012), et des récepteurs de goût d'acides aminés

(Tas1R1 et Tas1R3) contribuent à l'action du glutamate et de l'arginine sur la sécrétion d'insuline (Oya et al. 2011).

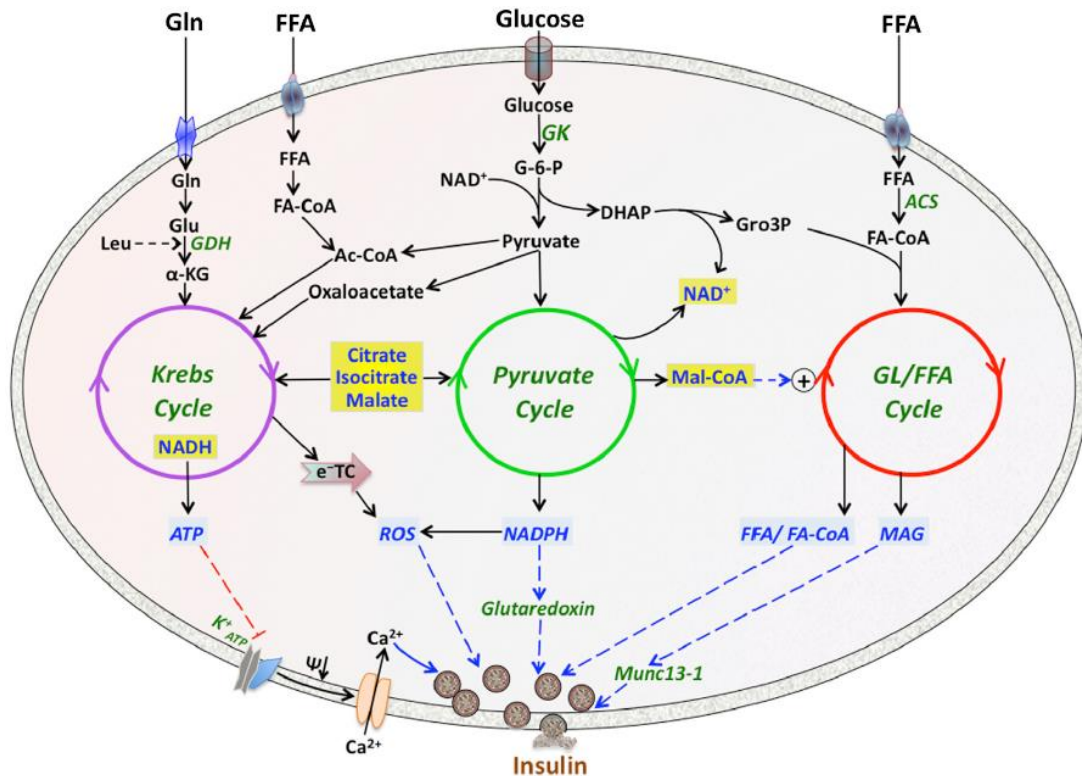


Figure 33. Le modèle tricyclique de la sécrétion de l'insuline. Le glucose, les acides gras et les acides aminés sont métabolisés par des voies interconnectées par leurs intermédiaires métaboliques et contribuent à l'augmentation des signaux de libération des granules d'insuline des voies de déclenchement et d'amplification (Prentki 2013)

3.4.3.3.2. Les incrétines

Les incrétines sont des hormones produites par les cellules endocrines de l'intestin suite à l'ingestion de nutriments. Elles font partie de l'ensemble des signaux hormonaux et nerveux qui régulent la fonction du pancréas endocrine et qui définissent l'axe "entéro-insulaire". Leur action sur le pancréas est de potentialiser la sécrétion d'insuline en réponse au glucose, ce qui est défini comme *effet incrétine* (Edwards et al. 1999). Cet effet a été identifié avec l'observation que la cinétique de glycémie qui suit une administration de glucose par voie orale est moins importante qu'après une administration de la même quantité de glucose par voie intraveineuse, et que la première induit une sécrétion d'insuline plus élevée que la deuxième (Creutzfeldt et Ebert 1985) (**Figure 34**). Les incrétines majeures sont le **GLP-1** (*glucagon like peptide-1*) et le **GIP** (*glucose-dependent insulinotropic peptide*). Le GLP-1 est produit par les cellules L du jéjunum et de l'iléon, par l'action de la PC1 sur le proglucagon. Le GIP est une protéine de 42 acides aminés produite par les cellules K du duodénum. Ces deux hormones sont sécrétées en réponse au glucose, aux acides gras libres et

aux acides aminés. Les deux hormones sont désactivées par la DPP-4 (dipeptidylpeptidase-4). La voie des incrétines représente une cible thérapeutique pour le traitement du diabète, avec les inhibiteurs de la DPP-4 et les analogues de GLP-1.

L'augmentation intracellulaire de la concentration de l'AMPc augmente la transcription du gène de l'insuline (par la voie de signalisation dépendante de la PKA, avec activation de CREB et fixation de ce dernier sur la box CRE du promoteur du gène de l'insuline, (Drucker et al. 1987), et sur la sécrétion de l'insuline via la PKA et l'activation de la protéine EPAC2 (*exchange protein activated by cAMP*) (Kwan et al. 2007).

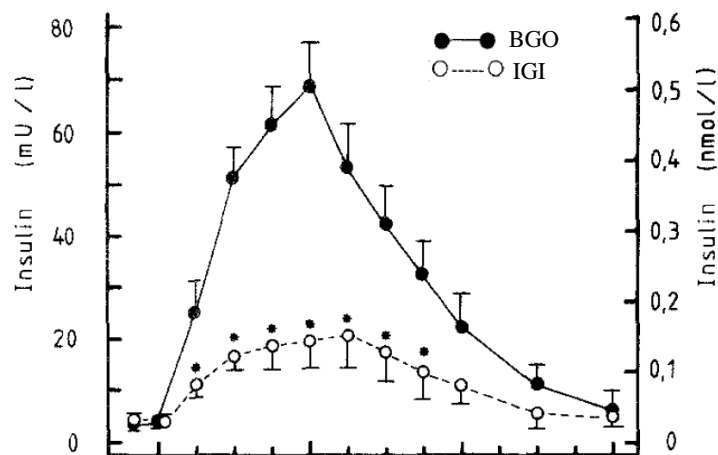


Figure 34. Effet incétine sur la sécrétion de l'insuline chez le sujet sain. OGL : bolus de glucose oral ; IGI : injection de glucose intraveineuse (Adaptée de Nauck 1986)

3.4.3.3.3. Autres hormones

Adipokines:

- Leptine : cytokine produite par l'adipocyte, dont le rôle principal est la régulation de la prise alimentaire et de la dépense énergétique, via son action dans l'hypothalamus. Dans la cellule bêta, la leptine inhibe la sécrétion de l'insuline par la voie de signalisation JAK/STAT et par ouverture des canaux potassique K^+ -ATP dépendants. La leptine agit sur la production de l'insuline aussi au niveau génique en inhibant la transcription du gène (§3.4.2.1.3.3).

- Adiponectine: autre cytokine produite par l'adipocyte impliquée dans la régulation de l'homéostasie glucidique par son action d'augmentation de la sensibilité à l'insuline dans le foie, le tissu adipeux et le muscle (Kadowaki et Yamauchi 2005). Outre son effet sur l'insulino-résistance, elle potentialise la sécrétion d'insuline en réponse au glucose (Patané et al. 2013).

L'**hormone de croissance** (GH) (Kawabe et Morgan 1983; Wu et al. 2011), la **prolactine** (Crepaldi et al. 1997; Brelje et al. 2008; Park et al. 2012) et les **hormones**

thyroïdiennes (Dimitriadis et al. 1985; Ikeda et al. 1990) contribuent aussi à la régulation de la sécrétion de l'insuline.

3.4.3.3.4. Le système nerveux

Le système nerveux autonome est défini par l'ensemble des cellules et des fibres qui innervent les organes internes et les glandes en contrôlant ainsi les fonctions végétatives. Il est composé de parties anatomiquement et fonctionnellement distinctes mais complémentaires qui comprennent le système nerveux sympathique, le système nerveux parasympathique et le système nerveux entérique. Au niveau de la composante endocrine du pancréas, les trois types de fibres nerveuses forment un réseau péri-insulaire qui pénètre dans les îlots le long des vaisseaux et parvient aux cellules des îlots pancréatiques par contacts synaptiques (Ahrén et al. 1986, 2000).

Le **système sympathique** régule négativement la sécrétion de l'insuline via la **noradrénaline**, la **galanine** et le **neuropeptide Y**, signaux générés par le stress ou par l'exercice. Le **système parasympathique** stimule la sécrétion de l'insuline par l'**acétylcholine** et dans une moindre mesure par le **VIP** (*vasoactive intestinal peptide*), le **PACAP** (*pituitary adenylate cyclase activating polypeptide*) et le **GRP** (*gastrin releasing peptide*) (Ahrén et al. 2000).

En particulier, l'activation du système parasympathique est responsable de la phase céphalique de la sécrétion d'insuline, c'est-à-dire le pic précoce d'insuline déclenché par la vision ou l'odeur de la nourriture avant l'ingestion d'un repas, et qui sert à préparer l'organisme à l'élévation de la glycémie qui accompagne le repas. La stimulation vagale augmente la sécrétion d'insuline des cellules β par trois mécanismes:

1) Par l'augmentation de la disponibilité de l'**acétylcholine**. Celle-ci se lie au récepteur muscarinique, qui sur la cellule bêta est représenté par les isoformes M3 et M4, conduisant à l'ouverture des canaux pour le sodium sur la membrane cellulaire. Cela provoque une dépolarisation cellulaire ATP-dépendante avec augmentation du flux de calcium intracellulaire et l'exocytose de l'insuline;

2) Par l'activation de la **phospholipase A₂, C et D** (toujours sous l'action de l'Ach) et l'hydrolyse du PIP₂ en DAG et IP₃. Le DAG est un stimulateur puissant de la PKC qui phosphoryle le MARCKS (*Substrat Myristoylé riche en alanine de la protéine kinase C*) qui se lie à l'actine et à la calmoduline, et induit l'exocytose des vésicules de l'insuline (Chappell et al. 2009);

3) Par la stimulation de la libération de **GLP-1** par les cellules intestinales L. Celui-ci se lie au récepteur présent sur les cellules bêta en activant les voies cellulaires qui contribuent à l'exocytose de l'insuline (Lustig 2003; Miguel et al. 2003).

3.4.3.3.5. Les acides biliaires

Dans les derniers cinq années, il a été montré que les ABs pouvaient avoir des propriétés insulino-sécrétagogues. Comme vu dans le paragraphe précédent (§ 2.3.4), cet effet de potentialisation de la sécrétion d'insuline en réponse au glucose serait dû à l'activation de FXR par ses ligands, qui interagirait par voie directe ou indirecte avec le canal K_{ATP} , Participant à leur fermeture (Düfer et al. 2012).

3.5. La régulation du métabolisme du glucose: rythme circadien et pancréas

L'homéostasie est définie comme la tendance physiologique d'un système donné à garder ses propriétés physico-chimiques dans une relative stabilité interne, et à maintenir un tel état d'équilibre dans le temps, quelques soient les conditions externes, à travers des mécanismes précis d'auto-régulation. Schématisée d'une manière simpliste, l'homéostasie du glucose est maintenue par l'action opposée des deux hormones pancréatiques glucagon et insuline, qui agissent sur plusieurs organes respectivement dans des états d'hypoglycémie et d'hyperglycémie. En réalité, les facteurs qui participent au maintien de l'homéostasie du glucose sont bien plus nombreux et de différentes natures (facteurs métaboliques, hormonaux, nerveux) et leur régulation est soumise à une rythmicité circadienne qui reflète les variations des apports énergétiques et des processus de dépense énergétique, sur une période de 24h en association avec les cycles repos/activité, sommeil/éveil, jeûne/nourri.

3.5.1. La régulation métabolique

- La régulation du métabolisme à l'état de jeûne (**Figure 35**, page 123):

Dans l'état de jeûne court qui caractérise les périodes entre les repas, l'organisme a la capacité de mobiliser le glucose à partir des sites de stockage ou de le produire à partir de différents précurseurs, pour satisfaire la demande énergétique des tissus vitaux comme le système nerveux (qui avec les globules rouges n'est capable d'utiliser presque exclusivement que le glucose comme substrat énergétique) et pour maintenir la glycémie dans les limites physiologiques. Une diminution de la glycémie inhibe la libération d'insuline et l'absorption

du glucose par certaines régions du cerveau (par exemple, l'hypothalamus, où sont situés les capteurs de glucose); cela va activer le système nerveux sympathique et déclencher la libération des hormones contre-régulatrices (le glucagon, les catécholamines, le cortisol et l'hormone de croissance) (Gerich 1988). Ces changements ont pour but d'augmenter la libération de glucose dans la circulation et de réduire sa captation par les tissus de façon à rétablir une glycémie basale. L'action de ces facteurs conduit à une augmentation de la concentration plasmatique du glucose provenant de la dégradation du glycogène dans le foie (glycogénolyse), et la production de glucose dans le foie et les reins à partir d'autres composés précurseurs tels que le lactate, le pyruvate, les acides aminés (qui proviennent des protéines musculaires) et le glycérol provenant de la lipolyse des acides gras dans le tissu adipeux (néoglucogenèse). Ces voies hépatiques sont activées par le glucagon, qui se lie à ses récepteurs sur le foie et active l'AC. En conséquence, la concentration d'AMPc intracellulaire augmente, ce qui induit la glycogénolyse sous stimulation des phosphorylases (Magnusson et al. 1995). Ainsi, la principale action immédiate du glucagon pour augmenter le niveau de glucose dans le plasma est la stimulation de la glycogénolyse hépatique (1) (Lecavalier et al. 1989), mais il a également un effet sur la néoglucogenèse hépatique (2), la protéolyse dans le muscle squelettique (3), la libération des AG du tissu adipeux (4).

En parallèle à l'action du glucagon, l'**adrénaline** sécrétée par les glandes surrénales sous l'action du système nerveux sympathique en réponse au "*fasting*", contribue au rétablissement de la glycémie en agissant sur plusieurs organes:

- Sur le foie, l'adrénaline augmente la glycogénolyse par inactivation de la glycogène synthase (5). Dans une moindre mesure, l'adrénaline augmente indirectement la néoglucogenèse en augmentant la disponibilité de ses substrats et des AGL circulants;
- Au niveau du rein, elle stimule la néoglucogenèse;
- Dans le muscle squelettique, elle diminue l'absorption du glucose et stimule la glycogénolyse (6), qui se traduit par une augmentation de la production de lactate (précurseur de la néoglucogenèse);
- Dans le tissu adipeux, elle stimule la lipolyse via l'activation de la lipase hormone sensible (HSL) (7), qui se traduit par une augmentation de la libération d'AGL et de glycérol, un autre précurseur de la néoglucogenèse;
- Au niveau du pancréas, elle inhibe la sécrétion de l'insuline (8).

La voie principale pour assurer un apport de glucose constant dans l'état de jeûne est la néoglucogenèse hépatique. Les précurseurs et sources de carbone pour cette voie sont les acides aminés et le lactate, provenant de la protéolyse des protéines dans le muscle

squelettique (9) et de la dégradation du glycogène musculaire respectivement (10), processus régulés par le glucagon et le **cortisol**. Contrairement au glucagon et à l'adrénaline qui agissent à très court terme, les actions du cortisol, ont besoin de quelques heures pour être effectives. Le cortisol augmente la synthèse des enzymes de la néoglucogenèse (11).

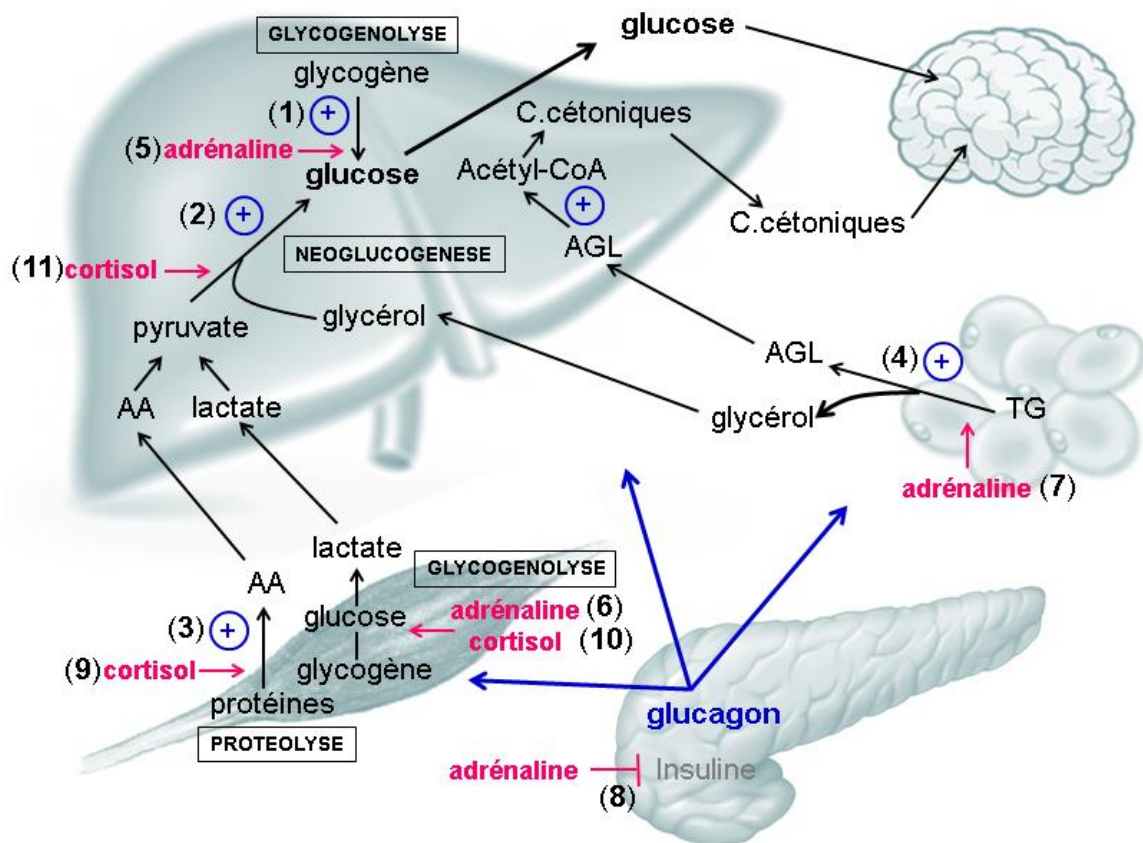


Figure 35. Etapes principales de la régulation du métabolisme dans l'état de jeûne. Bleu : effets rapides (glucagon), Rose: effets plus tardives (adrénaline et cortisol)

Le foie peut aussi synthétiser les corps cétoniques à partir des acides gras provenant de la lipolyse des triglycérides dans le tissu adipeux. Les corps cétoniques et les acides gras sont utilisés comme source alternative d'énergie par les tissus périphériques, spécialement par le muscle, de façon à laisser le glucose disponible aux tissus gluco-dépendants comme le cerveau. L'augmentation des acides gras circulants a comme conséquence la stimulation de la néoglucogenèse hépatique et rénale, l'inhibition de l'entrée du glucose dans le muscle et la compétition avec le glucose comme combustible par oxydation. Les principaux agents de régulation des taux circulants d'AGL sont le niveau de glucose, le glucagon et l'insuline (qui augmente et réduit, respectivement, les niveaux d'AGL plasmatiques en induisant/supprimant la lipolyse) et le système nerveux sympathique.

- La régulation du métabolisme à l'état postprandiale (**Figure 36**):

Dès que la concentration de glucose dans le sang augmente, comme après un repas, la cellule bêta pancréatique répond en sécrétant de l'insuline, tandis que la sécrétion de glucagon est inhibée. L'insuline passe dans la veine porte, ainsi le foie reçoit la quasi totalité de l'insuline sécrétée. Puisque le foie protéolyse environ 50% de l'insuline au cours du premier passage hépatique, les organes périphériques sont exposés à une concentration d'insuline plus basse que le foie.

A faibles concentrations, l'insuline a des effets anti-cataboliques qui consistent en l'inhibition de la protéolyse et de la lipolyse, ainsi que de la néoglucogenèse hépatique. A concentrations plus élevées, l'insuline a des effets anaboliques tels que l'activation de la glycogénogenèse (1), la lipogenèse (2) et la synthèse protéique (3).

Le glucose circulant peut avoir des devenir différents en fonction des tissus:

1) Etre métabolisé avec production d'énergie par la glycolyse (qui peut être *non-oxydative* avec la production de pyruvate (qui peut être réduit en lactate ou transaminés pour former de l'alanine), ou *oxydatif* via la conversion en acétyl-CoA qui est ultérieurement oxydé par le cycle de Krebs pour former du dioxyde de carbone et de l'eau;

2) Etre stocké sous forme de glycogène.

L'utilisation du glucose est induite par l'insuline:

- dans le muscle squelettique et dans le tissu adipeux: l'insuline stimule l'entrée du glucose (4 et 5) en induisant la translocation du transporteur du glucose GLUT4 contenu dans les vésicules intracellulaires à la surface de la membrane cellulaire. Ce processus est réversible, et les transporteurs sont recyclés dans le cytosol une fois que le stimulus de l'insuline diminue. Dans le foie, l'entrée du glucose n'est pas dépendante de l'insuline, mais la phosphorylation intra-cellulaire par la GK l'est. Dans le cerveau la captation du glucose n'est pas un processus insulino-dépendant.

- dans le foie l'insuline stimule l'utilisation (6) et le stockage du glucose en glycogène (1) et en lipides (2), tandis qu'elle réprime la synthèse et la libération du glucose. Ces effets sont contrôlés d'une part par l'induction de gènes codant les enzymes de la glycolyse (6), de la lipogenèse (2), et par répression des gènes de la néoglucogenèse, et d'autre part par modulation réversible de l'activité des enzymes de ces voies, via la cascade PI3Ks-Akt.

De plus, l'inhibition de la néoglucogenèse est assurée aussi par les mécanismes indirects de l'action de l'insuline sur les autres tissus. En effet, puisque l'insuline inhibe la protéolyse dans le muscle squelettique et la lipolyse dans le tissu adipeux, elle diminue la

disponibilité des substrats (acides aminés et glycérol pour la néoglucogénèse). Au contraire, dans le muscle l'insuline stimule la synthèse protéique par la voie mTOR (3).

L'insuline régule aussi le métabolisme des lipides à plusieurs niveaux:

Dans les tissus adipeux, l'insuline à haute concentration induit la lipogénèse (7). Elle facilite la captation des AGL par induction de la transcription de la LPL adipocytaire. De plus, elle inhibe l'action de la LHS (lipase hormonosensible) adipocytaire et donc diminue les AGL circulants.

Dans le foie, elle induit la transcription des gènes de la lipogénèse ACC (Acetyl-CoA carboxylase) et FAS par l'augmentation du facteur de transcription SREBP-1c (2).

Les triglycérides circulants sont transportés principalement par les chylomicrons et les VLDL hépatiques. L'insuline augmente l'activité de la LPL dans les capillaires et augmente le métabolisme des lipoprotéines. De plus, elle semble avoir aussi un effet positif sur le métabolisme des HDL, par augmentation de l'activité de l'enzyme LCAT (qui participe à la formation des HDL) et la suppression de l'activité de la CETP. Dans le foie, l'insuline inhibe la production de VLDL (par inhibition des enzymes MTP, ARF-1, PLD) et diminue l'expression génique de l'apoB.

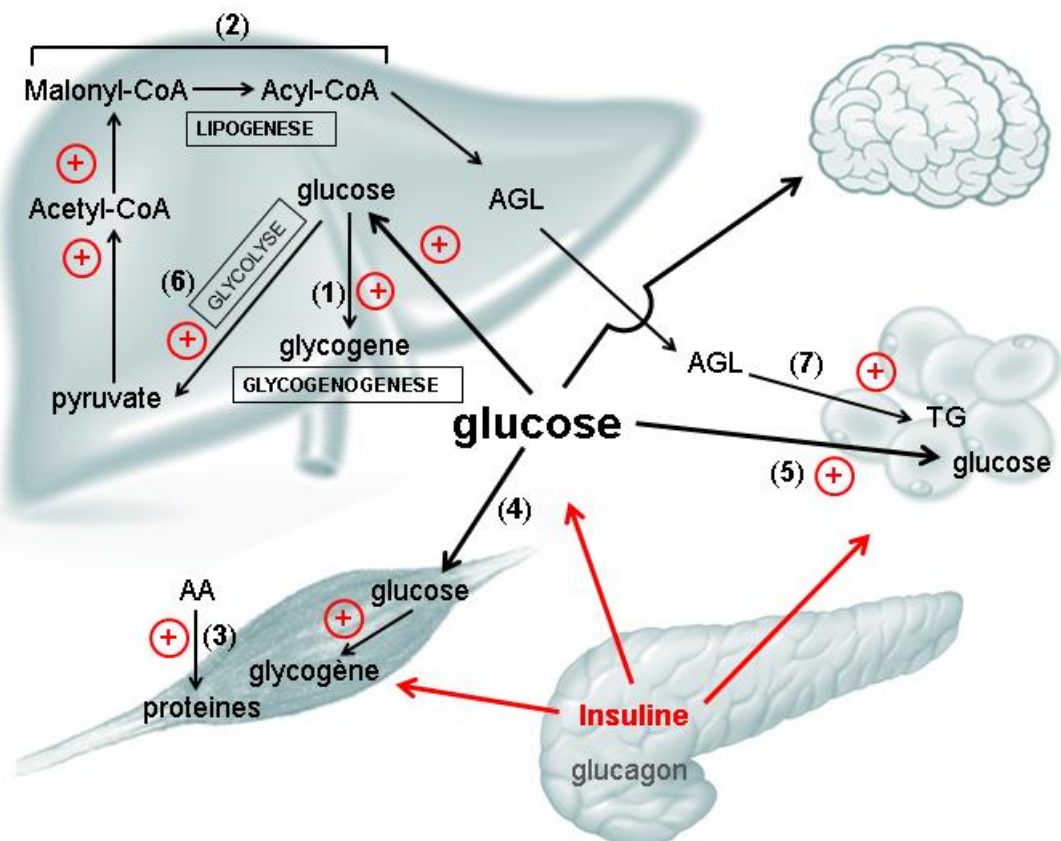


Figure 36. Etapes principales de la régulation du métabolisme à l'état postprandial. Rouge: effets de l'insuline

3.5.2. La régulation circadienne

La régulation circadienne n'est pas le sujet principal de mon travail de thèse. Cependant, la caractérisation du modèle FXRKO- β cell m'a conduit à proposer un rôle du rythme circadien dans le phénotype de la souris. Ainsi, une courte présentation du rythme circadien et de ses effets sur le métabolisme du glucose est présentée dans les paragraphes suivants.

3.5.2.1. La rythmicité dans le métabolisme du glucose

Si il est vrai que le terme homéostasie du glucose comprend le maintien d'une glycémie constante au long de la journée, il est connu que la glycémie subit des fluctuations physiologiques au cours de la journée qui sont à la fois conséquence de la prise des repas, et aussi de la régulation circadienne. Cette rythmicité est contrôlée au niveau du SNC et par les horloges intrinsèques des tissus périphériques (**Figure 37**).

La lumière et la température cyclent avec une période de 24 h en fonction de la rotation de la terre autour de son axe. Les organismes vivants ont évolué en s'adaptant à ces changements périodiques dans leur environnement. Au cours de l'évolution, presque tous les organismes ont acquis un système de chronométrage interne, appelé *horloge circadienne* (du latin *circa*=environ et *diem*=jour), afin d'anticiper ces variables environnementales. L'horloge circadienne génère un rythme d'une période de 24 h qui persiste même en absence d'un cycle

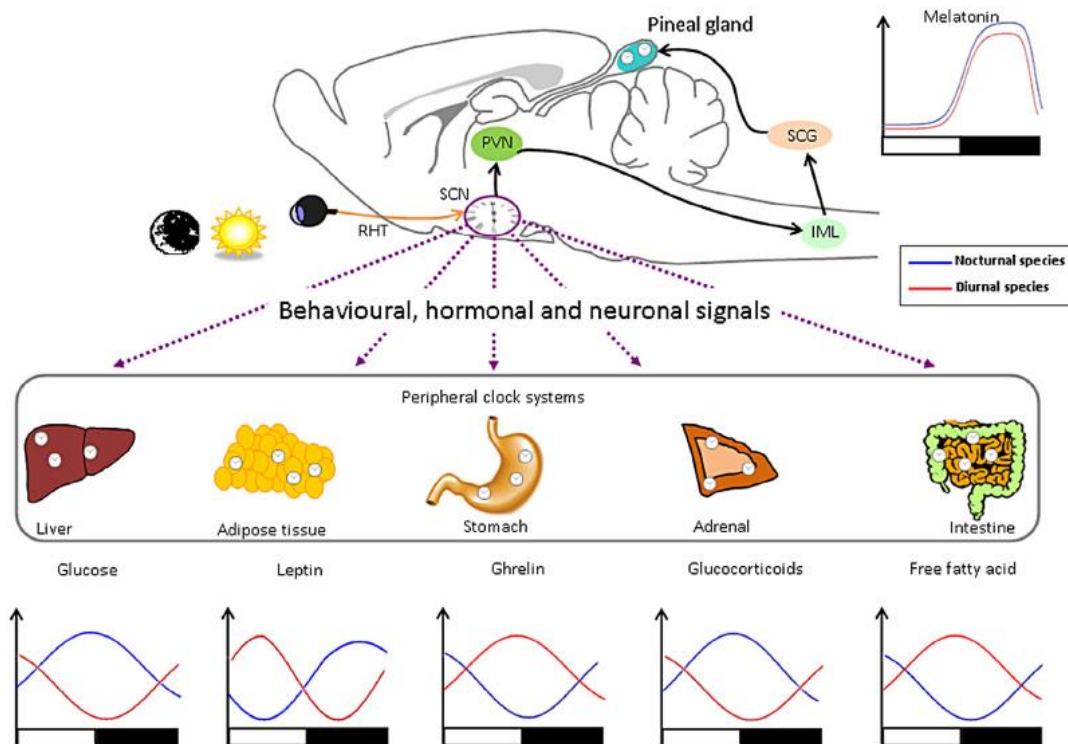


Figure 37. Oscillations des paramètres métaboliques et hormonaux dans le plasma des espèces nocturnes (bleu) et des espèces diurne (rouge) (Kumar Jha 2015)

lumière-obscurité et qui peut être synchronisé avec des signaux environnementaux appelés “Zeitgebers” (tels que le cycle lumière-obscurité, la température ambiante et la disponibilité alimentaire (Schibler et al. 2003)).

Ainsi, la plupart des aspects du métabolisme énergétique montrent des variations pendant le jour et la nuit. Cette rythmicité des fonctions métaboliques, y compris la production d'hormones, est régulée par un système circadien qui consiste en une horloge centrale localisée dans le noyau suprachiasmatique de l'hypothalamus (SNC) et de plusieurs horloges secondaires localisées dans le cerveau et dans les organes périphériques. L'horloge centrale contrôle les horloges périphériques via le SNC autonome et le système neuroendocrinien, ainsi que via les signaux comportementaux (**Figure 37**).

Chez les mammifères, le stockage et la dépense d'énergie varient en fonction des périodes de sommeil/éveil et de jeûne/alimentation, variable selon que l'espèce est diurne ou nocturne. Dans les deux cas, la période d'éveil et d'alimentation coïncide avec un état où le métabolisme est actif et avec des caractéristiques anabolisantes, tandis que le sommeil et le jeûne correspondent à un état de métabolisme faible à propriété cataboliques (Yang 2010).

Plusieurs paramètres en relation avec le métabolisme du glucose ont des variations circadiennes: la tolérance au glucose, la sensibilité à l'insuline, la concentration plasmatique de glucose, d'insuline et de glucagon (Kalsbeek et al. 2014). La prise alimentaire est importante mais pas décisive dans la détermination de la rythmicité circadienne de la glycémie et de l'insulinémie, car la rythmicité circadienne des oscillations de glucose plasmatique est maintenue même en état de jeûne, par l'action combinée de l'horloge centrale et des horloges périphériques sur le foie (néoglucogénèse) et sur les autres tissus (sensibilité à l'insuline).

La preuve principale que les oscillations de la glycémie sont dues au contrôle circadien du SNC sur la **production hépatique du glucose** vient de l'observation que la dénervation hépatique chez le rat abolie la rythmicité journalière de la glycémie (Kalsbeek et al. 2004; Cailotto et al. 2005). Les concentrations plasmatiques de glucose et son absorption par les tissus sont maximales au début de la période d'activité chez les animaux, et autour de l'éveil chez l'Homme, au moment où la production hépatique du glucose est élevée (La Fleur 2003). Toutefois, pendant la nuit, la tolérance au glucose chez l'Homme est diminuée par rapport à la journée, probablement en raison d'une **sensibilité à l'insuline** réduite (Van Cauter et al. 1997; la Fleur et al. 2001; La Fleur 2003).

Le fait que la sensibilité à l'insuline varie sur les 24 heures a été confirmé par des études chez les rongeurs. Des tests métaboliques réalisés à différents moments de la journée

ont montré que la tolérance au glucose et la sensibilité à l'insuline augmentent pendant la journée et sont maximales au début de la période d'obscurité (la Fleur et al. 2001). Chez les animaux nocturnes, la glycémie augmente au cours de la journée pour redescendre au cours de la nuit, quand l'animal est dans l'état d'activité. A l'inverse, chez les animaux diurnes comme chez l'Homme, la glycémie augmente pendant la nuit et son pic est maximal au moment du réveil, puis diminue au cours de la journée (**Figure 37** pag 126, panel du glucose). Dans la partie de la journée où la glycémie est ascendante, la production hépatique de glucose augmente d'une telle manière qu'elle est capable de compenser et masquer l'effet d'augmentation de sensibilité à l'insuline périphérique.

Bien que l'introduction des aliments dans l'organisme soit l'un des facteurs les plus importants dans le contrôle des niveaux d'**insuline plasmatique**, des oscillations de cet hormone sont également reportées chez les animaux et les humains indépendamment du comportement jeûne/alimentation (Boden et al. 1996; Kalsbeek et Strubbe 1998; Shea et al. 2005). Chez l'Homme, un pic de sécrétion d'insuline a lieu au cours de la journée, pour augmenter le stockage et l'utilisation de l'énergie (Boden et al. 1996; Kalsbeek et Strubbe 1998; Marcheva et al. 2013). Au contraire, une réduction de la sécrétion d'insuline et l'augmentation de la production de glucose sont favorisées dans la nuit (Marcheva et al. 2013). Chez les rongeurs, ce processus a un décalage de 12 heures dû à leur activité nocturne (Kalsbeek et al. 2010).

La rythmicité de la production et de l'utilisation du glucose, ainsi que la libération et la sensibilité à l'insuline, sont donc régulés par l'horloge du SNC probablement par l'intermédiaire des projections du système nerveux autonome vers les tissus tels que le foie, le muscle et le pancréas. De plus, chacun de ces tissus a une horloge interne autonome coordonnée par l'horloge centrale.

3.5.2.2 Pathologies associées à l'altération de la régulation circadienne

Des altérations dans le rythme de la prise des repas peuvent désynchroniser la rythmicité circadienne et troubler l'homéostasie énergétique. L'interruption de la rythmicité biologique augmente le risque d'obésité et de développement d'un diabète de type 2 (Gangwisch 2009).

De plus il a été montré que outre le rythme de la prise des repas, la composition du repas influence l'horloge circadienne. Ainsi, un régime riche en graisses modifie la fonction de l'horloge circadienne, avec des changements dans les rythmes des gènes clé de d'horloge dans le tissu adipeux et le foie (Kalsbeek et al. 2010). Il a donc été émis l'hypothèse qu'un

régime alimentaire riche en graisses peut contribuer au développement de l'obésité et la résistance à l'insuline aussi par des altérations dans la rythmicité circadienne.

3.5.2.3. La régulation du rythme circadien

Le rythme quotidien de divers processus biologiques est dicté par une synchronisation entre les signaux environnementaux et le système circadien.

Les oscillations moléculaires du SNC dépendent de plusieurs gènes spécifiques, communément appelés gènes de l'horloge. La rythmicité circadienne est basée sur l'expression rythmique des gènes de base de l'horloge et sur leurs boucles d'autorégulation rétroactive transcriptionnelle/traductionnelle. La machine de base de l'horloge est structurée avec des régulateurs de transcription positifs, comme Bmal1/Clock et les RORs ($ROR\alpha/\beta/\gamma$), et des régulateurs négatifs tels que les membres de la famille period (Per1-3), ceux de la famille cryptochrome (Cry1-2) et les Rev-Erbs (Rev-Erb α et β). Bmal1 se lie avec Clock pour former un hétérodimère qui active la transcription des régulateurs négatifs Per et Cry, définissant ainsi une boucle positive (**Figure 38**) (Reppert et Weaver 2002). Per et Cry s'accumulent dans le cytoplasme et forment des complexes qui transloquent dans le noyau et inhibent leur propre transcription et celle de Bmal1/Clock, formant ainsi une boucle négative (Mohawk et al. 2012). Une autre composante de cette boucle négative est constituée par les

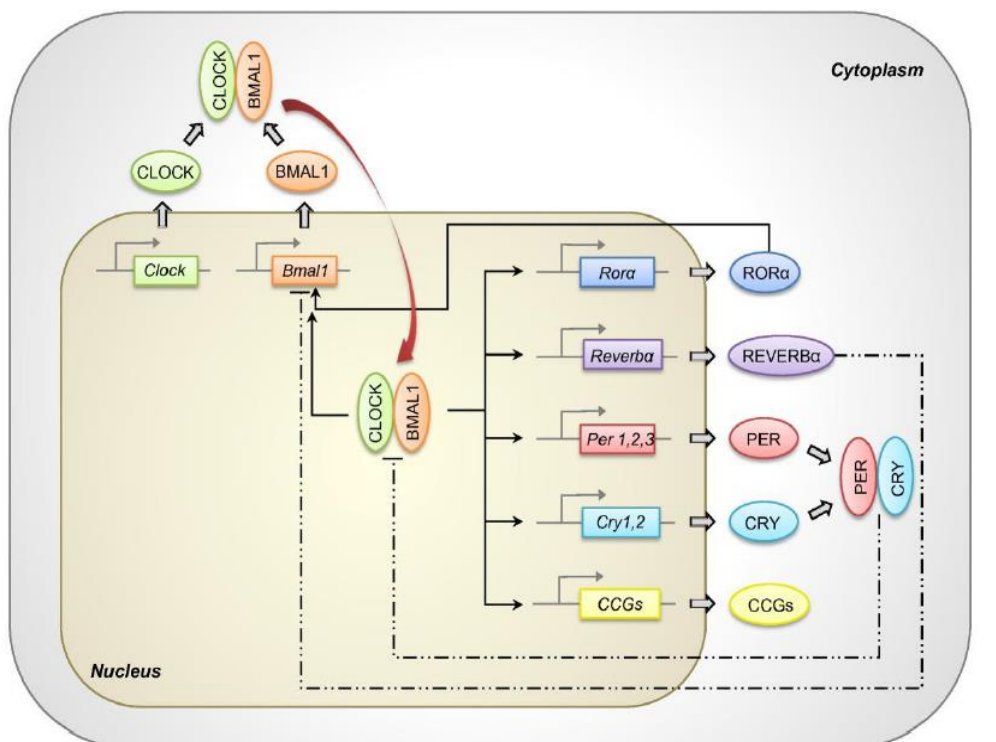


Figure 38. Machine moléculaire de l'horloge (Zanquetta 2010)

récepteurs nucléaires Rev-Erb α et β . Les Rev-Erbs se lient aux éléments de réponse de ROR (RRE) sur le promoteur de Bmal1 et de Clock et répriment leur transcription, tandis que à l'inverse, ROR $\alpha/\beta/\gamma$ induisent leur transcription (Preitner et al. 2002; Guillaumond et al. 2005; Crumbley et Burris 2011). Les rythmes circadiens générés par cette machine moléculaire sont finement régulés par les signaux environnementaux. En particulier, c'est la lumière qui peut synchroniser les neurones du SNC via une cascade d'activation de la transcription.

La rétine des mammifères reçoit le stimulus lumineux et le transporte vers le noyau supra chiasmatique (NSC) à travers le tractus rétinohypothalamique (RTH). L'horloge centrale dans le SNC transmet ensuite ce signal environnemental aux horloges extra-SNC dans le cerveau, ainsi que dans les tissus périphériques via des signaux comportementaux, hormonaux et neuronaux.

3.5.2.4. Les gènes de l'horloge dans le pancréas

Comme il a été dit précédemment, les îlots humains et de rongeur présentent des rythmes circadiens autonomes en termes de sécrétion d'insuline et de glucagon. En particulier, il a été montré que dans les îlots de rats, l'insuline est libérée d'une manière circadienne et que la mélatonine l'influence en agissant comme "zeitgeber" (Peschke et Peschke 1998). De plus, il a été montré que les îlots expriment les gènes de l'horloge (Clock, Bmal1, RevErb α , Per1, Per2, TEF, DBP), démonstration que le pancréas endocrine a un système de contrôle circadien interne (Allaman-Pillet et al. 2004; Mühlbauer et al. 2004). L'expression des gènes de l'horloge a été montrée dans le pancréas de souris (Mühlbauer et al. 2009) et de rat (Mühlbauer et al. 2004), dans les îlots de souris (Marcheva et al. 2010; Vieira et al. 2012) et humains et dans les cellules d'îlots humains dispersées (Pulimeno et al. 2013). De manière intéressante, outre les gènes de l'horloge, d'autres gènes, impliqués dans la sécrétion de l'insuline et dans la croissance de la cellule β , présentent un rythme circadien dans le pancréas, les îlots isolés et des lignées de cellules β , tels que insuline, somatostatine, GLUT2, GK, PDX-1, Syntaxin1A, Ucp2, Nrf2, CyclinD1 (Peschke et Peschke 1998; Delattre et al. 1999; Allaman-Pillet et al. 2004; Frese et al. 2007; Marcheva et al. 2010; Stamenkovic et al. 2012).

La sécrétion d'insuline en réponse au glucose dépend d'une horloge fonctionnelle. En effet, les îlots des souris invalidées pour les gènes de base de l'horloge Clock ou Bmal1 dans l'organisme entier présentent une réduction drastique de la sécrétion d'insuline induite par le

glucose et donc une intolérance au glucose. De plus, elles présentent des défauts de prolifération et une diminution de la taille des îlots pancréatiques, qui s'aggravent avec l'âge (Marcheva et al. 2010). En outre, l'inactivation de Clock modifie l'expression de gènes impliqués dans la croissance des îlots pancréatiques et dans l'assemblage des vésicules de sécrétion (diminution des gènes VAMP, syntaxin et Munc18) (Marcheva et al. 2010). Pour comprendre le rôle spécifique de l'horloge dans le pancréas *in vivo*, des modèles de souris invalidées pour Bmal1 spécifiquement dans le pancréas (Sadacca et al. 2011) ou dans la cellule bêta (Lee et al. 2013a) ont été générés. Ces deux souches de souris se caractérisent par une diminution de la sécrétion d'insuline, une intolérance au glucose et par conséquent une hyperglycémie. Fait intéressant, la déficience en Bmal1 dans le pancréas et dans la cellule bêta n'affecte pas le contenu en insuline des îlots, suggérant que la sécrétion d'insuline, mais pas la synthèse, était défectueuse dans les souris "knock-out" (Sadacca et al. 2011; Lee et al. 2013a).

Outre Clock et Bmal1, Revb- α est aussi un régulateur de la fonctionnalité de l'îlot. En effet, la down-régulation du gène Revb- α par ARN interférence dans des îlots pancréatiques et dans la lignée cellulaire Min-6 inhibe la sécrétion d'insuline induite par le glucose (Vieira et al. 2012).

Si la déficience de Bmal1, Clock, ou Revb- α dans la cellule bêta conduit à un phénotype d'hypoinsulinémie, la dérégulation de l'expression de Per ou Cry conduit au phénotype inverse. En fait, les modèles d'inactivation de Per2 montrent une capacité accrue de sécrétion d'insuline en réponse au glucose et une diminution dans la clairance de l'insuline (Zhao et al. 2012) et les souris double KO pour Cry1 et Cry2 sont hyperinsulinémiques (Barclay et al. 2013).

En conclusion, l'effet majeur d'une altération des mécanismes de l'horloge dans la cellule bêta est une diminution de la sécrétion d'insuline, et par conséquent, une hyperglycémie (Lamia et Evans 2010; Marcheva et al. 2011). Parallèlement, il a été montré que perturber l'horloge dans les cellules alpha entraîne une diminution de la sécrétion de glucagon (Vieira et al. 2013). Cependant, les gènes de l'horloge ont aussi une action autre que sur le contrôle du rythme circadien et sur la régulation de la production hormonale, notamment sur la défense contre le stress oxydatif (régulation d'Ucp2 et Nrf2) (Vieira et al. 2014) (**Figure 39**).

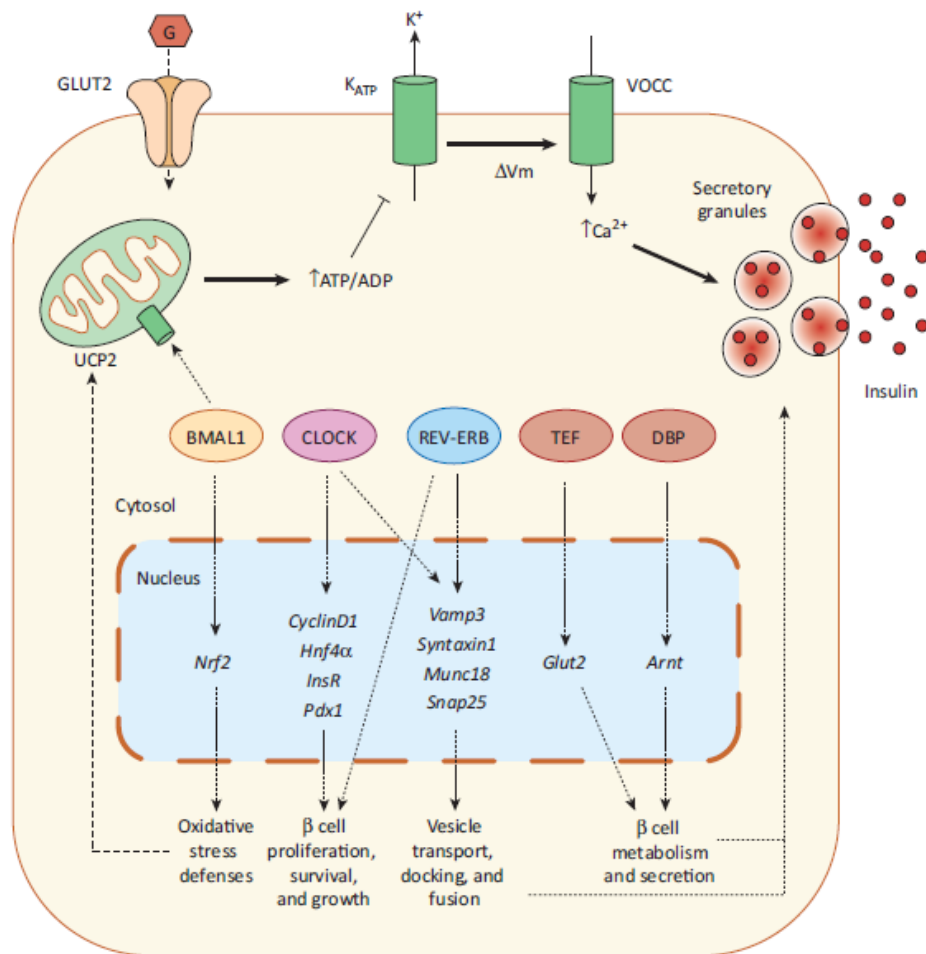


Figure 39. Effet des gènes de l’horloge sur la sécrétion d’insuline dans la cellule bêta pancréatique (Vieira 2014)

4. L'INVALIDATION CONDITIONNELLE D'UN GENE DANS LA CELLULE BETA PANCREATIQUE

4.1. La stratégie Cre-LoxP

La stratégie utilisée est le système *Cre-LoxP* (**Figure 40**), qui depuis les années quatre-vingt-dix représente l'approche la plus efficace pour l'invalidation génique dans des organes ou tissus cibles. Ce système est basé sur la propriété naturelle de la Cre Recombinase, protéine de 38 kDa codée par le gène Cre du coliphage P1, de reconnaître et recombiner des séquences géniques spécifiques de 34 pb, appelées sites *LoxP* (Sauer et Henderson 1989), qui se composent de deux séquences palindromiques de 13 pb séparées par une séquence de 8 pb asymétrique variable sauf pour les deux bases intermédiaires. Cette stratégie prévoit le croisement d'une souche de souris "*floxed*", c'est-à-dire qui contient dans son génome deux sites *LoxP* situés de part et d'autre d'une partie du gène à invalider, avec la souche transgénique qui exprime la Cre Recombinase sous contrôle d'un promoteur spécifique d'un tissu ou d'un type cellulaire. De cette manière, dans la génération issue de ce croisement, l'enzyme est synthétisée exclusivement dans les cellules dans lesquelles le promoteur qui régule l'expression du transgène Cre est actif, ce qui conduit à la recombinaison de la séquence flanquée des sites *LoxP* (flox) uniquement dans ces cellules, avec la génération d'un allèle recombiné (ou allèle null), et l'inactivation sélective du gène cible. Dans les autres cellules, où le transgène Cre n'est pas exprimé, la délétion de l'ADN ne se produit pas et l'expression du gène cible n'est pas modifiée (**Figure 40**). Dans ce but, le choix du promoteur

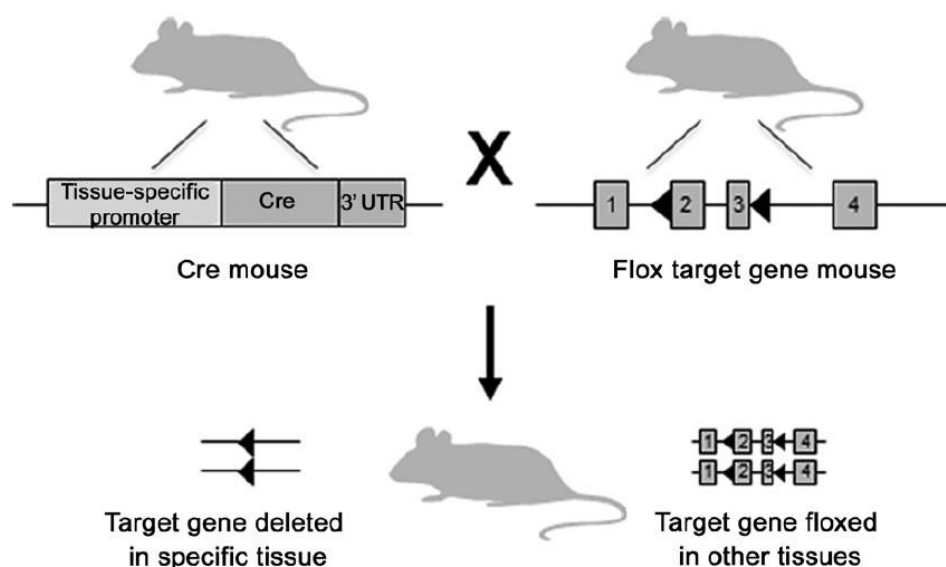


Figure 40. Génération d'un modèle d'invalidation conditionnelle en utilisant le système de recombinaison Cre-LoxP (Rana 2014)

qui contrôle l'expression du gène Cre est cruciale pour la spécificité spatiale et temporelle de la délétion du gène d'intérêt.

Un raffinement supplémentaire de cette technique est le système de recombinaison (et donc d'inactivation) inducible, qui peut être obtenu en utilisant, par exemple, des Recombinases chimériques constituées de la fusion de la Cre Recombinase avec le LBD d'une forme mutée du récepteur aux estrogènes, activé exclusivement par des ligands synthétiques (comme le tamoxifène), mais pas par des composés "estrogène-like" naturels. Cette stratégie offre un contrôle temporel sur l'inactivation du gène d'intérêt, avec l'avantage d'éviter les problèmes de létalité précoce, les effets sur le développement et les mécanismes compensatoires qui sont souvent majeurs dans les modèles des knockouts somatiques.

4.2. Les souches Cre-transgéniques pour le pancréas

Pour cibler le pancréas, au moins 80 souches murines transgéniques pour le gène *Cre* ont été développées, avec l'utilisation des régions promotrices d'au moins 32 gènes (Magnuson et Osipovich 2013). Ces lignées peuvent être classées en quatre catégories (qui se recouvrent en partie) sur la base du/(des) type/(s) cellulaire/(s) où la Cre est exprimée: endocrines, exocrines, canalaire ou cellules progénitrices pancréatiques (Magnuson et Osipovich 2013).

Les premières trois catégories reflètent les trois principaux types de cellules pancréatiques à dérivation épithéliale. Les promoteurs des hormones peptidiques sont utilisés pour cibler les cellules de l'îlot pancréatique, tandis que les promoteurs des enzymes digestives sont utilisés pour cibler les cellules exocrines. La quatrième catégorie (cellules progénitrices pancréatiques) inclut des promoteurs utilisés généralement pour les études de développement pancréatique, mais qui peuvent être également utiles pour comprendre la fonction pancréatique. Notamment, il s'agit de promoteurs de facteurs de transcription qui sont temporellement actifs dans l'endoderme pancréatique ou pré-pancréatique au cours de l'embryogenèse, et qui ensuite sont limités à des types cellulaires spécifiques (Magnuson et Osipovich 2013).

Pour cibler la cellule bêta pancréatique, certains chercheurs se sont tournés vers l'utilisation de la souche PDX1-Cre, qui utilise le promoteur de PDX-1, gène codant pour un facteur de transcription impliqué dans les premières étapes de la différenciation pancréatique (§3.4.2.1.2). Le promoteur de PDX-1 est actif dans toutes les cellules progénitrices du pancréas (endocrines et exocrines) et également dans certaines régions du cerveau (Wicksteed

et al. 2010), comme aussi dans le duodénum, l'estomac et le canal biliaire. Par conséquent, son utilisation ne peut être faite lorsque le gène qu'on veut invalider est présent exclusivement dans la cellule β . Aussi, le choix d'utiliser des promoteurs de gènes de facteurs de transcription exprimés dans les précurseurs endocrines (tels que Neuro3, Nkx2.2, PAX4, PAX6, Isl-1, BETA2/NeuroD, Myt1, Rfx6 and Mnx1) doit être évalué au cas par cas en fonction du pattern d'expression du gène à invalider.

En cohérence avec le travail de thèse, le prochain paragraphe décrit les principaux modèles Cre développés pour cibler la cellule bêta pancréatique.

4.3. Les souches Cre-transgéniques pour la cellule bêta pancréatique

La région d'élection utilisée pour cibler spécifiquement la cellule bêta est une séquence du promoteur du gène de l'insuline. La plupart des souches Insulin-Cre utilisent la séquence du promoteur d'une espèce différente de la souris (Tableau 1). Le promoteur le plus utilisé est celui du gène *Ins2* du rat, connu sous le nom de RIP (pour Rat Insulin Promoter). Il existe aussi des souches obtenues avec le promoteur du gène du cochon (PIP-iCre, Tg(INS-icre)^{18Msd}, (Dahlhoff et al. 2012) et le promoteur du gène humain (HIP-Cre, Tg(INS-cre)^{2Rms}, (Hamilton-Williams et al. 2013).

Au moins dix lignées transgéniques différentes RIP-Cre ont été générées et sont actuellement utilisées pour l'étude de la perte de fonction d'un gène dans les cellules β . Les trois lignées les plus utilisées ont été obtenues par l'insertion non-ciblée dans le génome d'un fragment de 0,6 kb du promoteur du gène *Ins2* du rat suivi par la séquence du gène *Cre*, ce qui permet l'expression de la Cre Recombinase dans au moins 80% des cellules β : il s'agit des souches Tg(Ins2-cre)^{25Mgn} (Postic et al. 1999), Tg(Ins2-cre)^{23Herr} (Herrera 2000), et Tg(Ins2-cre/ERT)^{1Dam} (Dor et al. 2004). Par contre, ces modèles présentent l'inconvénient d'une expression de la Cre faible mais détectable aussi dans les neurones du cerveau (Song et al. 2010; Wicksteed et al. 2010). Parmi ces trois lignées, celle qui présente l'expression aspécifique neuronale la plus faible est la souche inductible par le tamoxifène Tg(Ins2-cre/ERT)^{1Dam} (Wicksteed et al. 2010). Cependant, cette souche présente un inconvénient majeur, puisque la recombinaison se produit indépendamment de l'administration du tamoxifène, dès d'âge de deux mois (Liu et al. 2010).

Pour augmenter la spécificité β -cellulaire, d'autres lignées ont été développées avec un fragment plus long du promoteur du gène de rat *Ins2*: Tg(Ins2-cre)^{1Heed} et Tg(Ins2-cre)^{1Dh} (Ahlgren et al. 1998; Crabtree et al. 2003). Si la spécificité a été améliorée, ces souches

présentent une diminution de l'expression du transgène Cre, qui parvient juste à affecter 10% à 20% de la population des cellules bêta (Crabtree et al. 2003).

Un modèle transgénique de Cre sous contrôle du promoteur endogène de l'insuline *Ins2* murin a été généré ($Ins2^{tm1(cre/ERT2)kcmm}$), (Nakamura et al. 2011) mais une expression ectopique dans le cerveau a été mise en évidence (Thorens et al. 2014).

Un inconvénient majeur de certaines des souches RIP-Cre, qui reste inexplicable actuellement, est qu'elles présentent un phénotype d'intolérance au glucose attribuable à un déficit d'insulino-sécrétion. La preuve vient d'une étude qui a réuni des analyses conduites dans des laboratoires différents montrant que les souris transgéniques pour le transgène RIP-Cre présentent un profil de gluco-intolérance suite à l'injection intrapéritonéale de glucose comparées aux souris sauvages (Lee et al. 2006). Cet étude a porté sur la souche $Tg(Ins2-cre)^{25Mgn}$. L'année suivante, une autre équipe a confirmé cette particularité avec l'observation d'une altération de la masse des cellules bêta dans la souche $Tg(Ins2-cre)^{25Mgn}$. Dans cette étude, les souris présentent une hypoplasie significative des cellules bêta chez les jeunes souris RIP-Cre et une hyperplasie des îlots dans des RIP-Cre plus âgées (Pomplun et al. 2007). Ces résultats suggèrent que l'intolérance au glucose et l'altération de la sécrétion d'insuline décrites précédemment pour les souris RIP-Cre plus jeunes pourraient être causés par l'hypoplasie de l'îlot associée au transgène, et que l'hyperplasie chez les souris âgées pourrait refléter une réponse compensatoire à l'intolérance au glucose liée au transgène. En complément de ces observations, l'analyse d'îlots isolés à partir de souris transgénique pour la forme inductible du transgène RIP-Cre (RIPCreER: $Tg(Ins2-cre/ERT)^{1Dam}$) a rapporté aussi un déficit de sécrétion d'insuline (Teitelman et Kedeas 2015).

Comme le locus *Ins1* est connu pour avoir une expression cellulaire plus restreinte aux cellules bêta que le locus *Ins2* (qui montre une expression transitoire dans l'hypothalamus et d'autres structures du cerveau) (Deltour et al. 1993), ces dernières années les chercheurs ont développé des modèles Ins-Cre avec le promoteur murin du gène *Ins1*. Une souche récemment développée est un deuxième modèle inductible par le tamoxifène qui utilise un fragment de 8.5kb du promoteur du gène de souris *Ins1*, la lignée MIP1-CreERT ($Tg(Ins1-cre/ERT)^{1Lphi}$) (Tamarina et al. 2014). Cette construction permet une recombinaison quasi-totale, restreinte à la cellule bêta, et ne présente pas d'activité neuronale (Wicksteed et al. 2010). Pour cette souche inductible, aucun cas de recombinaison indépendante du tamoxifène n'a été rapporté.

Par la suite, d'autres souches ont été développées en utilisant le promoteur MIP/*Ins1*, comme la BAC-*Ins1*-Cre25. Dans cette souche la séquence Cre est intégrée dans l'exon 2 du locus de *Ins1*, dans un chromosome bacterien artificiel (BAC) qui s'est intégré dans une région chromosomique bien définie. Pour la BAC-*Ins1*-Cre25 aucune fuite d'expression dans les tissus neuronaux n'a été détectée (Hasegawa et al. 2014).

Très récemment, d'autres souches *Ins*-Cre ont été développées dans le but d'augmenter la spécificité pour la cellule bêta et de réduire l'aspecificité d'expression aux tissus neuronaux. Pour ces souches, le gène *Cre* est directement intégré dans le locus originel de *Ins1*, et l'expression de la Cre Recombinase se fait à partir du codon d'initiation de la traduction du gène endogène (à la différence des souches précédemment décrites, pour lesquelles le gène Cre est sous le contrôle d'un fragment exogène du promoteur). Ces lignées comprennent la *Ins1*^{Cre} (*Ins1*^{tm1(cre)Thor}) et la lignée tamoxifène-inductible *Ins1*^{CreERT2} (*Ins1*^{tm1(CreERT2)Thor}) (Thorens et al. 2014). De façon intéressante, la recombinaison est induite dans la quasi-totalité des cellules bêta avec le *Ins1*^{Cre}, et dans 60-70% des cellules bêta avec le *Ins1*^{CreERT2} après administration de tamoxifène, sans aucune recombinaison dans le cerveau. Par ailleurs, pour le modèle *Ins1*^{CreERT2}, aucune recombinaison n'a été observée dans les souris non-traitées ou traitées avec le véhicule. Un aspect important des modèles de souris *Ins1*^{Cre} et *Ins1*^{CreERT2} est que l'homéostasie du glucose et le poids corporel ne sont pas affectés par rapport aux contrôles (Thorens et al. 2014).

Cependant, l'enthousiasme pour l'ensemble des souches β -cell spécifiques Cre est retombé récemment lorsque il a été montré que les cellules β de la souche MIP-GFP (Hara et al. 2003) expriment de manière ectopique l'hormone de croissance humaine (human Growth Hormone, hGH), en raison de l'inclusion de la séquence de son ADNc dans la construction du transgène (Brouwers et al. 2014). Il en résulte des effets indésirables locaux, dus à l'activité biologique de l'hGH, sur la croissance et la survie des cellules β , et la sécrétion d'insuline stimulée par le glucose. D'une façon générale, l'utilisation de la cassette hGH est relativement courante dans la génération des modèles transgéniques, donc la question de son impact sur le comportement des cellules et de l'interprétation phénotypique s'étend bien au-delà du champs de l'îlot pancréatique.

En réponse à cette problématique, une nouvelle souche de MIP-Cre a été développée avec l'utilisation d'une construction dépourvue du gène hGH (Cheng et al. 2015): la *Ins1*-Cre-DsRed (Tg(*Ins1*-DsRed*T4)32Hara/J), a été montrée active dans la cellule bêta sans cas

d'aspecificité neuronale. Ce dernier modèle semble être le plus prometteur dans l'état actuel des connaissances car il permet de s'affranchir de la plus part des problèmes associés avec les lignés β -cell spécifiques.

MGI name	Common name	Type	Driver gene (size if applicable or known)	Reference	Advantages	Disadvantages
Tg(Ins2-cre) ^{25Mgn}	RIP-Cre	transgene	Rat <i>Ins2</i> (0,66kb)	Postic <i>et al.</i> , 1999		Brain activity; intrinsic phenotype; hGH-cassette
Tg (Ins2-cre) ^{23Herr}	RIP-Cre	transgene	Rat <i>Ins2</i> (0,60kb)	Herrera, 2000		Brain activity; hGH-cassette
Tg(Ins2-cre/ERT) ^{1Dam}	RIP-CreER	transgene	Rat <i>Ins2</i> (0,66kb)	Dor <i>et al.</i> , 2004	Negligible brain activity	Spontaneous activation; deficit in insulin secretion; hGH-cassette
Tg(Ins2-cre) ^{1Heed}	RIP1-Cre	transgene	Rat <i>Ins2</i> (0,7kb)	Ahlgren <i>et al.</i> , 1998	Negligible brain activity	Less effective; hGH-cassette
Tg(Ins2-cre) ^{1Dh}	RIP7-Cre	transgene	Rat <i>Ins2</i> (10kb)	Crabtree <i>et al.</i> , 2003	Negligible brain activity	hGH-cassette
Ins2 ^{tm1(cre/ERT2)kcm}	Ins2 ^{CreERT2}	Knock-in	Mouse <i>Ins2</i>	Nakamura <i>et al.</i> , 2011		Brain activity; hGH-cassette
Tg(Ins1-cre/ERT) ^{1Lphi}	MIP1-CreERT	transgene	Mouse <i>Ins1</i> (8,5kb)	Tamarina <i>et al.</i> , 2014	No brain activity No spontaneous activation	hGH-cassette
Tg(Ins1-cre) ^{25Utr}	BAC-Ins1-Cre25	transgene	Mouse <i>Ins1</i>	Hasegawa <i>et al.</i> , 2014	No brain activity	hGH-cassette
Ins1 ^{tm1(cre)Thor}	Ins1 ^{Cre}	Knock-in	Mouse <i>Ins1</i>	Thorens <i>et al.</i> , 2014	No brain activity; no intrinsic phenotype	hGH-cassette
Ins1 ^{tm1(CreERT2)Thor}	Ins1 ^{CreERT2}	Knock-in	Mouse <i>Ins1</i>	Thorens <i>et al.</i> , 2014	No brain activity; no intrinsic phenotype; no spontaneous recombination	hGH-cassette
Tg(Ins1-DsRed* ^{T4}) ^{32Hara/J}	Ins1-Cre-DsRed	transgene	Mouse <i>Ins1</i> (8,5kb)	Cheng <i>et al.</i> , 2015	No brain activity; no intrinsic phenotype; no hGH cassette	

Tableau 1. Caractéristiques majeures des principales souches transgéniques Cre générées pour l'inactivation de gènes cibles dans la cellule bêta pancréatique. MGI: Mouse Genome Informatics

RESULTATS

PARTIE 1

ROLE PHYSIOPATHOLOGIQUE DU RECEPTEUR NUCLEAIRE FXR DANS LA CELLULE BETA-PANCREATIQUE

Rôle physiologique du récepteur nucléaire FXR dans la cellule bêta pancréatique

1. Contexte scientifique

Dans la cellule bêta-pancréatique, FXR contrôle la sécrétion de l'insuline par des mécanismes transcriptionnels (ou génomiques) qui impliquent la régulation positive de l'expression du gène de l'insuline et de certains régulateurs de la transcription comme PDX-1 et MafA, en augmentant ainsi la synthèse et le contenu intracellulaire (Popescu et al. 2010; Renga et al. 2010). FXR induit la sécrétion de l'insuline aussi par des mécanismes non transcriptionnels (ou non génomiques) impliquant les canaux potassiques (Düfer et al. 2012) et la translocation à la membrane du transporteur au glucose GLUT2 (Renga et al. 2010).

Dans la littérature, il est montré que les cellules β TC6 (insulinome de rat) cultivées en bas glucose (BG, 5 mM) ou haut glucose (HG, 25 mM) pendant 18 heures en présence ou pas de l'agoniste semi-synthétique de FXR, l'INT-747 (1 μ M), augmentent le relargage d'insuline en condition de HG + INT-747 comparé au HG seulement, avec une forte augmentation de la transcription du gène *Ins1* (Renga et al. 2010). La mesure de l'insuline libérée par les îlots pancréatiques humains traités pas le INT-747 en condition d'HG a confirmé ce résultat (Renga et al. 2010). De plus, ces résultats sont aussi confortés par l'observation que les îlots pancréatiques isolés de la souris déficiente pour FXR dans l'organisme entier (FXRKO) ont une capacité réduite de sécréter l'insuline en réponse au glucose par rapport à la souris WT (Popescu et al. 2010), déficit qui s'accompagne d'une diminution de l'expression des gènes de *Ins1*, *PDX-1*, *MafA* et *BETA2/NeuroD* dans les îlots de la souris FXRKO (Popescu et al. 2010). De manière complémentaire, le prétraitement pendant 24 heures des îlots murins avec un agoniste naturel de FXR (CDCA, 50 μ M) ou synthétique (GW4064, 1 μ M) augmente la sécrétion d'insuline induite par le glucose, augmentation dépendante de FXR puisqu'on ne la retrouve pas dans les îlots de la souris FXRKO (Seyer et al. 2013).

L'étude de la fonction de FXR dans différents tissus a montré son implication dans la régulation du métabolisme du glucose, avec une action tissu-dépendante et contexte métabolique-dépendante. En effet, dans un contexte physiologique, la souris FXRKO montre une légère intolérance au glucose et une insulino-résistance dans le foie et dans les tissus périphériques (§2.3.5), mais, quand elle est dans un contexte obèsogène (régime riche en graisses ou induction génétique, souris *ob/ob*), elle est protégée contre l'obésité et présente une amélioration du profil glycémique (Prawitt et al. 2011; Bjursell et al. 2013; Fang et al.

2015). Des études d'inactivation de FXR spécifiquement dans le foie ont montré que ces effets bénéfiques ne seraient pas dus à l'action de FXR dans cet organe. L'intérêt de développer des modèles animaux "knock-out tissu-spécifiques pour FXR", outre élucider son action dans chaque organe, est de pouvoir étudier la contribution de FXR dans chaque tissu au phénotype observé dans les souris FXRKO.

2. Objectifs

L'objectif des travaux décrits dans cette partie est de répondre aux questions:

1. **Quel est le rôle de FXR dans la fonction insulino-sécrétoire de la cellule β pancréatique et quels sont les mécanismes moléculaires associés?**
2. **Quel est la contribution de FXR dans la cellule β pancréatique à la régulation de l'homéostasie métabolique *in vivo*?**

3. Stratégies expérimentales et résultats

3.1. Etude du rôle de FXR dans la fonction de la cellule bêta pancréatique et des mécanismes moléculaires associés

Etudes *in vitro*: Nos premières analyses de la fonction de FXR ont été conduites sur la lignée cellulaire murine bêta-pancréatique Min6, lignée établie à partir d'un insulinome obtenu par expression ciblée du gène de l'antigène T du virus 40 de singe (SV40) dans des souris transgéniques (Miyazaki et al. 1990). Cette lignée cellulaire offre l'avantage d'être un bon outil pour l'étude des mécanismes associés à la sécrétion de l'insuline, car le métabolisme du glucose et la réponse au stimulus du glucose en termes de sécrétion d'insuline sont similaires à celles d'îlots pancréatiques isolées. La sécrétion d'insuline induite par le glucose (GSIS, *Glucose Stimulated Insulin Secretion*) augmente avec les concentrations de glucose de 5 mM (bas glucose) à 25 mM de glucose (haut glucose, où le GSIS atteint le niveau maximal, environ 7 fois le niveau basale (Ishihara et al. 1993). Par contre, cette lignée a l'inconvénient de ne pas être une lignée pure de cellules bêta, mais plutôt une lignée mixte de cellules endocrines pancréatiques, comme il a été montré par l'identification d'hormones de plusieurs types cellulaires après analyses d'expression génique, d'immunohistochimie et de dosage immuno-enzymatique par ELISA des hormones secrétées (Nakashima et al. 2009).

Pour aller plus loin dans la compréhension des mécanismes moléculaires qui lient FXR à la sécrétion de l'insuline, nous avons adopté une approche d'**analyse fonctionnelle des effets transcriptionnels de FXR sur la sécrétion d'insuline en réponse au glucose**. Nous

avons prétraité les Min6 par différents ligands naturels de FXR (CDCA) ou synthétiques (GW4064, INT-747, WAY) pendant différents temps (24, 48 ou 72 heures), et mesuré l'insuline sécrétée pendant une heure en réponse au glucose en forte concentration (20 mM) (**Figure 41**), au cours d'expériences indépendantes.

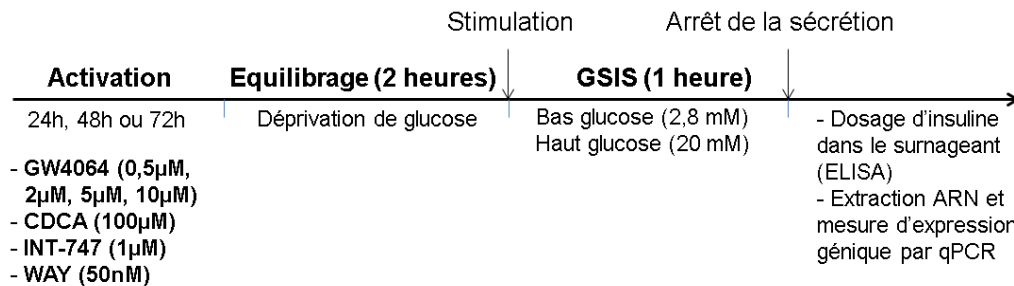


Figure 41 : protocole pour l'étude fonctionnelle des effets transcriptionnels de FXR sur la sécrétion de l'insuline en réponse au glucose

Les expériences ont été systématiquement validées en vérifiant l'activation de FXR par analyse de l'expression de SHP et VLDLR, gènes cibles de FXR dans la lignée Min6 (exemple, **Figure 42E, F**). L'insuline sécrétée en réponse au glucose, comme le contenu cellulaire en insuline, ont été dosés par ELISA (Merckodia Insulin ELISA), et l'action transcriptionnelle de FXR sur les gènes de l'insuline a été évaluée par analyse de l'expression des gènes *Ins1* et *Ins2*.

La figure 42 présente les résultats d'une des expériences, représentative de l'ensemble. Malgré le grand nombre de conditions différentes testées, aucune augmentation de la sécrétion d'insuline (**Figure 42A, B, C**) ou variation du contenu d'insuline intracellulaire (**Figure 42D**) n'a été observé, ni une modulation de l'expression des gènes de l'insuline (**Figure 42G, H**).

La difficulté à reproduire les résultats de la littérature nous a amenés à la conclusion que **les agonistes de FXR n'augmentent pas la sécrétion de l'insuline en réponse au glucose ni le contenu en insuline intracellulaire, et ne modulent pas l'expression du gène de l'insuline malgré leur capacité à activer FXR**, dénotée par l'augmentation de l'expression de ses gènes cibles **dans le modèle cellulaire Min6**.

La lignée cellulaire Min6 ne s'est donc pas un modèle cellulaire approprié pour l'analyse fonctionnelle de FXR. Nous avons alors renoncé à l'analyse transcriptomique globale sur les Min6 initialement prévu.

Microarray sur îlots de la souris FXRKO total: il était prévu dans le projet une analyse du transcriptome globale des îlots de la souris invalidée pour FXR spécifiquement dans la cellule bêta pancréatique. En parallèle, nous avons analysé le transcriptome des îlots de la

souris FXRKO total, dans le but d'apprécier d'une part la contribution de FXR de la cellule bêta pancréatique, et d'autre part les effets cumulatifs des répercussions de l'inactivation de FXR dans l'organisme entier sur la régulation génique dans l'îlot et l'absence de FXR dans la cellule bêta.

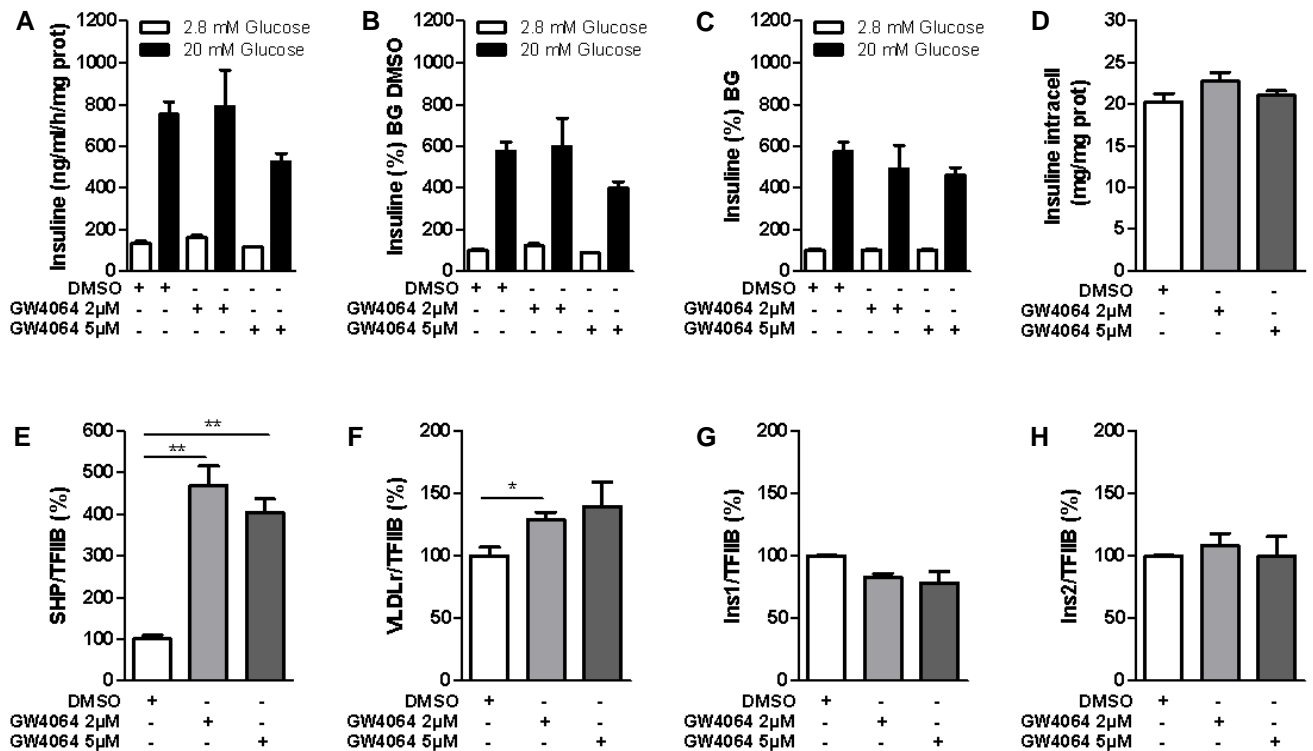


Figure 42. Résultat représentatif des expériences de GSIS après activation de FXR, obtenu en traitant les cellules Min6 avec l'agoniste synthétique GW4064 pendant 24 heures. Résultat de la même expérience représenté en valeur absolu d'insuline sécrétée (A), en pourcentage rapportée au Bas Glucose (BG) du contrôle (DMSO) (B), en pourcentage rapportée à chaque BG (C). Insuline intracellulaire après activation de FXR (D). Expression relative rapportée au gène de ménage TFIIB de SHP (E), VLDL-r (F), Ins1 (G) et Ins2 (H). Moyenne +/- SEM, Student t test *p<0.05, **p<0.01.

Les ARN pour l'analyse sur puce à ADN ont été obtenus à partir d'îlots isolés par la technique de Micro Dissection Laser (MDL, détails techniques: **Annexe 1**) (protocole en **Figure 43**). Quatre souris FXRKO total et 4 souris WT contrôle de portée (mâles, 13 semaines) (disponibles au laboratoire) ont été sacrifiées après 5 heures de jeûne (8am-1pm). Pour obtenir une quantité d'ARN suffisante, pour chaque échantillon nous avons travaillé en MDL avec une moyenne de 6 lames avec 4 coupes de 10µm de pancréas, correspondant à ~300-400 coupes d'îlots par souris (environ 2 000 000 unités arbitraires (UA) de surface) (ce qui a requis environ une journée de manipulation pour chaque pancréas). Les ARN ont été extraits sur colonne selon les instructions du kit (Arcturus® PicoPure® RNA Isolation Kit, Applied Biosystem, Excilone), et leur concentration et qualité ont été déterminées au Bioanalyser (Agilent 2100). Pour chaque échantillon, nous avons obtenus une moyenne de

60-70 ng d'ARN avec un RIN compris entre 6 et 7 (ce qui est considéré un bon niveau de qualité pour des ARN de tissu primaire, particulièrement pour le pancréas, tissu riche en RNase). Les analyses ont été réalisées en collaboration avec la plateforme AGILENT de l'Institut de Recherches sur le Cancer de Lille (IRF114, Univ Lille 2). Les ARN ont été prétraités et déposés sur puce (Agilent, Pucés Mo Gene 2.0 ST).

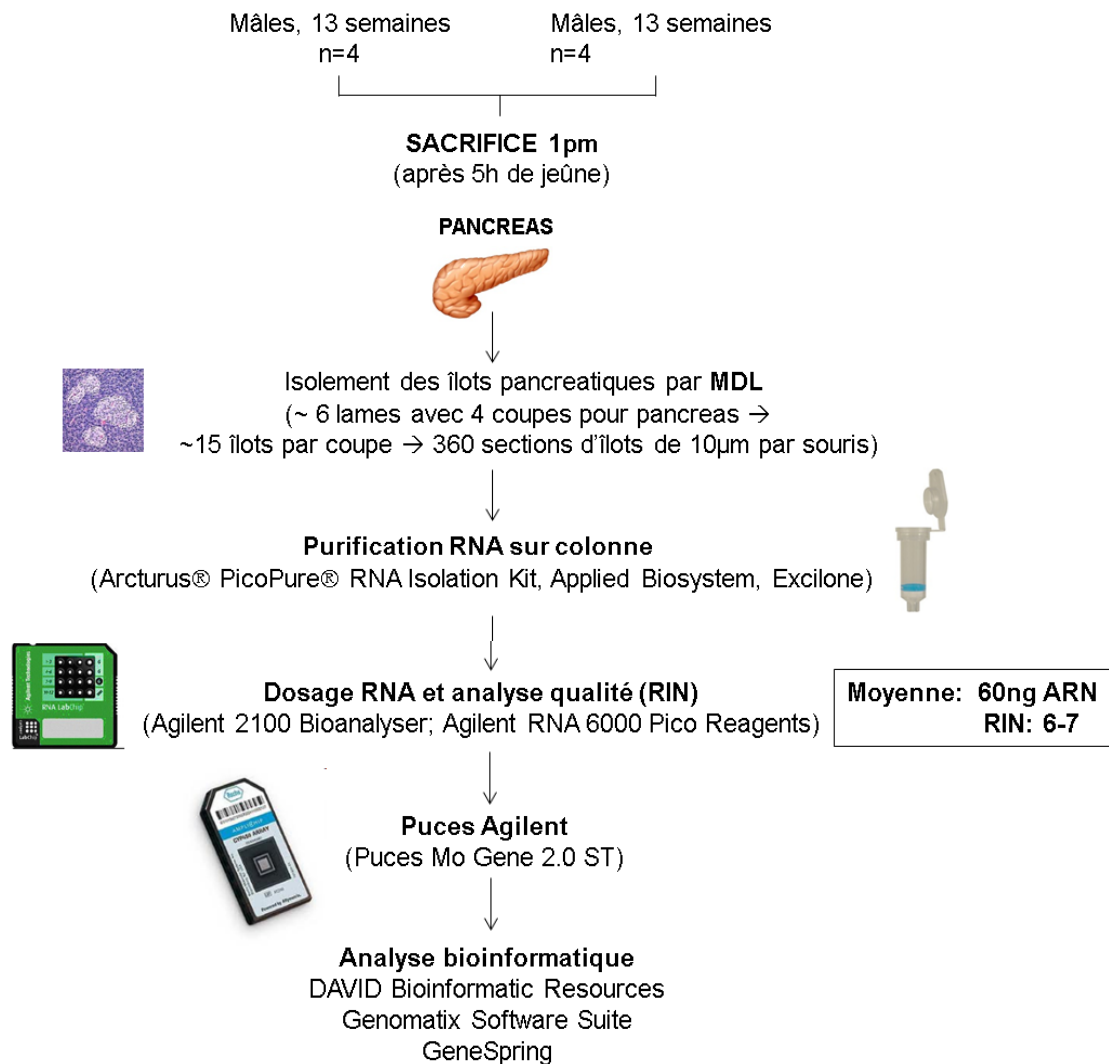


Figure 43. Protocole expérimental d'analyse transcriptomique globale chez la souris FXRKO vs FXRWT pour identifier les gènes cibles de FXR dans les îlots pancréatiques murins.

A partir des 60 000 probes environ qui composent la puce, nous avons limité notre analyses aux gènes qui étaient dérégulés avec une induction en valeur absolue (FC) d'au moins 1,2 et une p-value d'au minimum 0,05. Le gène le plus fortement dérégulé était FXR, avec un FC de -213 fois et une p-Value de 9.5×10^{-7} dans les îlots de la souris FXRKO. Cette analyse nous a permis d'identifier 2943 entités dérégulées au total, comprenant 1064 régions non codantes et 1897 gènes codants. Parmi les régions codantes, 1007 gènes étaient up-régulés et 893 gènes down-régulés quand FXR est invalidé (**Figure 44**).

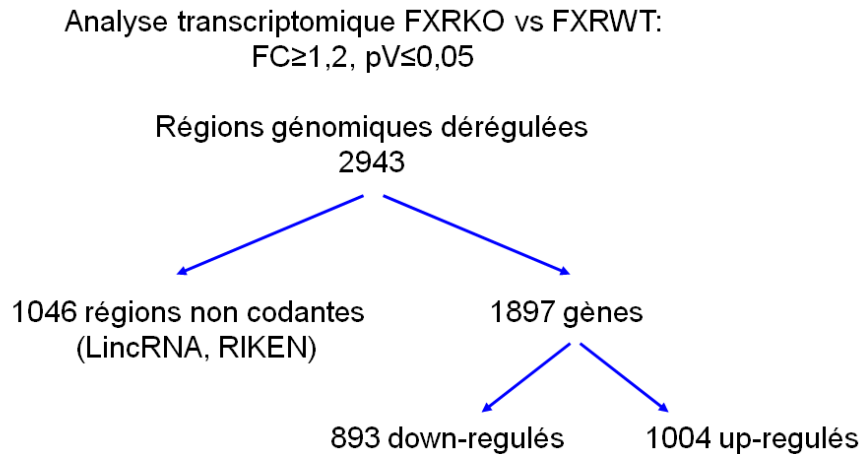


Figure 44: Résultat de l’analyse transcriptomique des îlots de la souris FXRKO comparée à la souris WT.

L’analyse globale de l’ensemble de ces gènes (effectuée par DAVID Bioinformatic Resources et Genomatix Software Suite) n’a pas mis en évidence de dérégulations de voies métaboliques particulières dans l’îlot. Cependant, l’analyse gène par gène a permis d’identifier une dérégulation du gène codant pour le récepteur nucléaire Rev-Erb α , avec une induction moyenne de son expression de 3,7 fois dans l’îlot de la souris FXRKO, validée par qPCR. L’étude et la signification de cette régulation n’ont pas été poursuivis à ce moment-là, mais la relation mise en lumière par cette analyse peut représenter un aspect intéressant à approfondir, en faveur d’un rôle de FXR dans la régulation du rythme circadien dans l’îlot pancréatique, comme nous le verrons ultérieurement.

De manière intéressante, des 1046 éléments non codants issus de cette analyse, 676 sont des *Long Intergenic Non Coding RNA* (lincRNA). Il s’agit de longues séquences d’ARN (au moins 200 nucléotides), sans potentiel codant, dont la fonction principale est la régulation post-transcriptionnelle de l’expression génique via la dégradation de l’ARNm et l’inhibition de sa traduction. Leur mécanisme d’action est très large, et comprend la régulation de la transcription, la traduction, l’imprinting, le réarrangement du génome, les modifications de la chromatine (à la fois via le recrutement des complexes de modification des histones et l’interaction avec la machine de méthylation), le trafic des facteurs nucléaires, la dégradation des protéines et l’interférence des microRNA (via leur séquestration par un mécanisme “éponge”, ce qui les empêche de downréguler l’expression génique) (Esguerra et Eliasson 2014; Kameswaran et Kaestner 2014; Pullen et Rutter 2014). Le profil d’expression des lincRNA est très spécifique de chaque type cellulaire (et même du compartiment cellulaire), encore plus que la spécificité des gènes codants (Guttman et al. 2009; Djebali et al. 2012). En

effet, il semble que la fonction majeure des lincRNA soit la régulation de la différenciation cellulaire et l'identité cellulaire.

Identifiés pour la première fois en 2005, les lincRNA dans l'îlot pancréatique ont été décrits en 2012, avec l'identification de 1359 lincRNA dans l'îlot de souris (Ku et al. 2012) et 1128 lincRNA dans l'îlot humain (Morán et al. 2012), qui ont été déterminés par analyse des lincRNA dérégulés dans les îlots des sujets diabétiques. Les lincRNA sont souvent localisés à proximité de facteurs de transcription critiques et spécifiques pour l'îlot, avec lesquels ils exercent une action régulatrice. Pour certains de ces lincRNA, il a été possible d'attribuer une fonction et un mécanisme d'action, normalement relié à la différenciation et au maintien de l'identité des cellules pancréatiques endocrines, ce qui renforce leur implication dans la pathogenèse du diabète. Toutefois, les lincRNA étant différents en fonction de l'espèce, il n'est pas toujours possible transférer les connaissances acquises d'une espèce à l'autre (souris/Homme).

Les lincRNA pour lesquels une fonction commence à être connue chez l'Homme ou chez la souris, n'étaient pas compris parmi les lincRNA issus de notre analyse sur les îlots FXRKO.

L'approche d'analyse génique globale ne nous a pas permis d'identifier des voies majeures évidentes de régulation par FXR dans la cellule bêta dans le temps imparti pour ma thèse. Cependant, étant donné le grand nombre de LincRNA issu de l'analyse de puces FXRKO, et puisque une relation entre les LincRNA de la cellule bêta et le diabète est connue, il serait intéressant étudier si l'action régulatrice de FXR dans la cellule bêta passe, au moins en partie, par la régulation de ces RNA non codants, après avoir caractérisé leur rôle dans la cellule bêta pancréatique.

3.2. Etude de la contribution de FXR dans la cellule bêta pancréatique à la régulation de l'homéostasie métabolique *in vivo*

3.2.1 Développement du modèle de souris FXRKO- β -cell

Pour la génération de notre modèle d'inactivation spécifique de FXR dans la cellule bêta pancréatique (FXRKO- β cell), nous avons employé la stratégie Cre-LoxP (§4.1). Deux croisements successifs sont nécessaires pour générer des souris portant deux allèles du gène cible floxé et le transgène exprimant la Cre Recombinase de manière tissu-spécifique. Le schéma de croisement que nous avons adopté est présenté en **Figure 45**. Au premier croisement, la souris homozygote pour le gène FXR floxé (FXR^{fl/fl}) a été croisée avec la

souris transgénique pour la Cre Recombinase (RIP-Cre^{+/?}). Pour la génération de notre modèle, nous avons utilisé la lignée Cre qui au moment du choix présentait le plus d'avantages par rapport aux autres souches Cre, c'est-à-dire la souche RIP-Cre développée par le Pr. Pedro Herrera (Tg (Ins2-cre)^{23Herr} (Herrera 2000), §4.3). Ce premier croisement a conduit à la génération de souris FXR^{fl/wt} RIP-Cre^{-/-} et FXR^{fl/wt} RIP-Cre^{+/-}, en proportion 0-50% et 50-100%, respectivement, en accord avec les lois de Mendel (**Figure 45**, 1^{er} croisement). Les proportions ne sont pas exactement au 50:50 pour l'impossibilité de savoir si les parents portant la Cre sont homozygotes ou emizygotés pour le transgène. Au deuxième croisement, ces souris ont été croisées pour générer les souris FXRKO-βcell (FXR^{fl/fl} RIP-Cre^{+/-}) et les deux souris contrôles de même portée: les souris contrôles portant le transgène Cre Recombinase (Contrôle Cre, FXR^{wt/wt} RIP-Cre^{+/-}) et les souris contrôles portant les deux allèles du gène cible floxé (Contrôle Flox, FXR^{fl/fl} RIP-Cre^{-/-}) (**Figure 45**, 2^{ème} croisement). Les pourcentages attendus sur la base des lois de Mendel par ce croisement sont de 12.5% pour chacun des génotypes d'intérêt. À titre d'exemple, pour une expérience qui prévoit 8 souris de même sexe par groupe, il faut générer et génotyper 130 petits au 2^{ème} croisement. Même si ce schéma de croisement n'apparaît pas comme le plus simple en termes logistiques, il nous permet d'obtenir les deux groupes contrôles Flox et contrôle Cre à la même génération et sur le même fond génétique que les FXRKO-βcell, ce qui est fondamental pour valider le modèle.

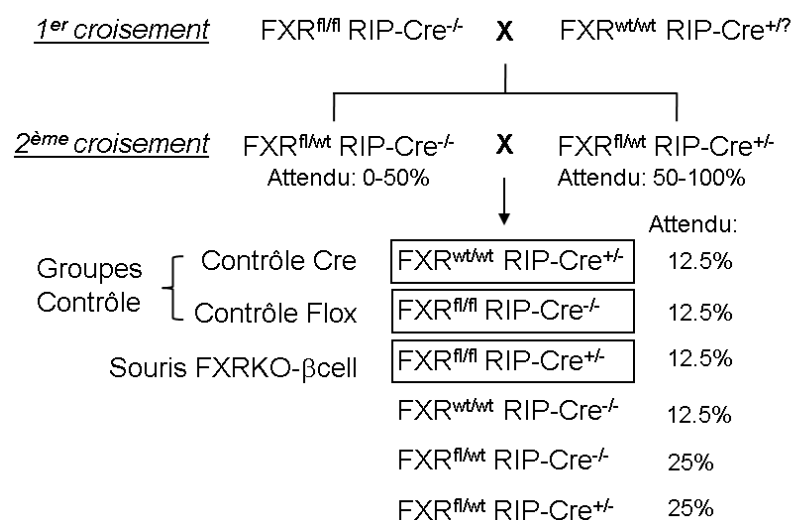


Figure 45: Schéma de croisement pour l'obtention de la souris FXRKO-βcell et de ses contrôles de portée. Les pourcentages attendus pour chaque génotype sont indiqués.

3.2.1.1 La problématique de la recombinaison non-spécifique

Au cours du développement de notre modèle, nous nous sommes intéressés aux cas de recombinaison non-spécifique qui peuvent se produire dans l'utilisation des lignées transgéniques pour la Cre Recombinase. L'éventualité de la recombinaison non-spécifique peut conduire à la génération de souris portants l'allèle recombiné (ou null) dans des tissus autres que celui souhaité, compromettant ainsi la fiabilité des résultats, si la survenue de ces événements n'a pas été systématiquement vérifiée. Pour cette raison, il faut caractériser et bien connaître le pattern d'expression de la Cre dans chaque lignée Cre utilisée. Dans ce but, les chercheurs ont développé des banques de données en libre accès visant à recueillir toutes les données de caractérisation des souches archivées qui représentent une ressource essentielle pour le chercheur dans le choix d'une lignée Cre, par exemples le Jackson Laboratory Cre Repository (<http://cre.jax.org>) et le Mouse Genome Informatics Cre Portal (<http://www.creportal.org>) (Heffner et al. 2012). Les efforts visant à développer ces bases de données ont permis de mettre en évidence un certain nombre de phénomènes reliés à la fonction de la Cre, y compris l'activité inattendue dans des tissus "off-target", un niveau de recombinaison différents parmi les souris "littermate" (qui induit ainsi des niveaux de mosaïsme différent d'une souris à l'autre), ou encore l'activité différentielle de la Cre sur la base du parent d'origine qui transmet l'allèle Cre (Heffner et al. 2012).

Un certain nombre d'hypothèses pourraient potentiellement expliquer ces observations, comme par exemple l'activation ou l'inactivation d'autres gènes au niveau du site d'insertion du transgène dans le génome, l'incorporation incomplète des éléments de régulation dans la construction du transgène, le profil d'activation du promoteur pas assez bien documenté, l'expression de la lignée germinale maternelle/paternelle, les changements dans le nombre de copies du transgène et la modification par le fond génétique de la souche (Heffner et al. 2012).

Les cas d'expression non-spécifique les plus souvent rapportés sont imputables au promoteur choisi pour contrôler l'expression de la Cre, avec un profil d'activation qui n'est pas exclusif pour le tissu/organe intéressé, mais qui conduit à l'expression de la Cre, et par conséquent à la recombinaison du gène floxé, aussi dans des tissus autres. Par ailleurs, la recombinaison non-spécifique peut être la conséquence d'autres types d'événements, qui se présentent d'une façon occasionnelle dans la même souche (sans que les causes en soient identifiées) et sont ainsi impossibles à anticiper. Un tel exemple est la recombinaison dans la lignée germinale, phénomène de recombinaison aléatoire pendant la gamétogenèse chez une souris portant à la fois le transgène Cre et l'allèle flox, qui conduit donc à la transmission

directe de l'allèle recombiné (null) dans la descendance, ou l'expression inattendue et aléatoire du transgène Cre seulement dans une partie des cellules (différent de l'expression non-spécifique d'un tissu liée à la non-spécificité du promoteur) avec en conséquence la génération de souris chimériques pour l'allèle null. Des cas reportant ces phénomènes sont connus en littérature pour les lignées aP2-Cre (qui pour cibler les adipocytes utilise un fragment du promoteur du gène de la protéine adipocytaire 2, codant pour FABP4 (Lee et al. 2013b)), certaines lignées utilisées en neurosciences ou en immunologie comme la Syn-Cre, la Pvalb-Cre ou la Nestin-Cre, ou encore les lignées CamK2a-Cre, Emx1-Cre, Pcp2-Cre et hGFAP-Cre (Schmidt-Suppran et Rajewsky 2007; Kobayashi et Hensch 2013).

Les causes de ces phénomènes étant encore inconnus, tous les modèles transgéniques développés avec cette stratégie Cre-loxP peuvent potentiellement être concernés par cette problématique. Ceci nous a conduits à développer une méthode de détection de recombinaison non-spécifique dans notre modèle β cell-spécifique. Nous avons mis au point une technique de screening systématique de chaque souris, qui est une variante de la technique de génotypage classique par PCR-électrophorèse avec l'ajout d'un troisième oligonucléotide qui permet de discriminer, outre l'allèle WT et l'allèle floxé, l'éventuelle présence de l'allèle recombiné. Le principe de cette technique est représenté en **Figure 46A**, et les résultats de la migration électrophorétique sur gel d'agarose des produits de PCR obtenus avec les trois génotypes possibles en **Figure 46B**.

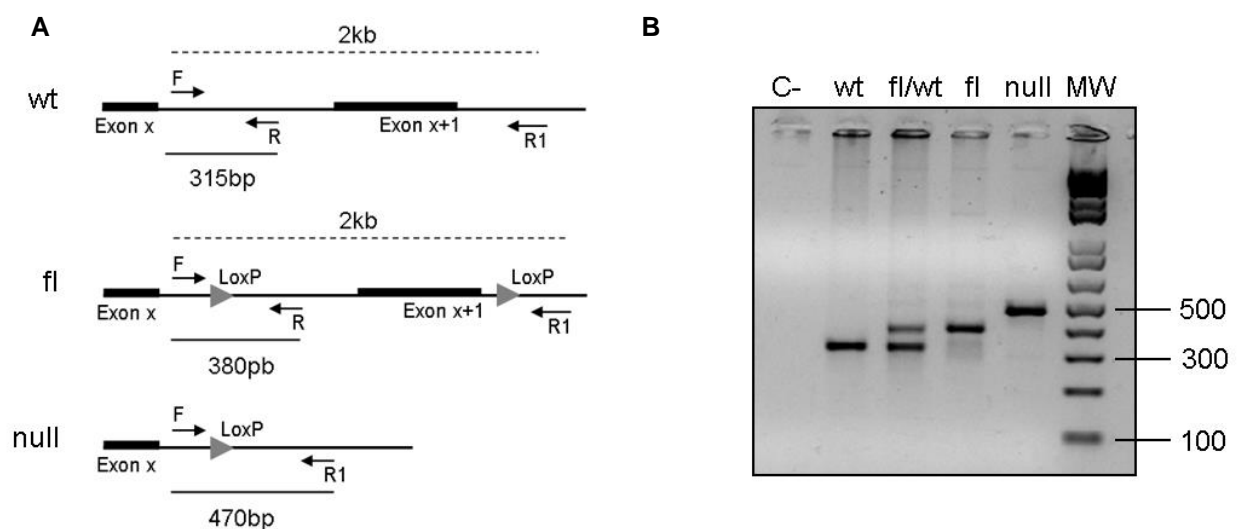


Figure 46. A. Représentation schématique montrant les trois allèles possibles pour le locus de FXR amplifié: allèle de souris sauvage (wt), Floxé (fl) ou null. La position des amorces de PCR (F, R et R1), l'emplacement des sites loxP (triangles gris) et les tailles des produits de PCR attendus sont indiqués. **B.** Gel d'électrophorèse montrant les tailles des produits de PCR pour les amplificats du locus génomique FXR à partir d'ADN extrait des biopsies de queue de souris sauvage (wt), hétérozygotes floxé/sauvage (fl/wt), floxé (fl) ou nulles (null). MW: poids moléculaire; C-: contrôle négatif (H₂O).

Dans notre élevage, les souris ont été systématiquement génotypées avec ce screening. Cette analyse nous a permis d'identifier 10,7% de souris issues du premier croisement portant un allèle null en plus d'un allèle wt et d'un allèle floxé (ce qui dénote un chimérisme au niveau tissulaire) (**Figure 47**), et 5,4% de souris provenant du deuxième croisement présentant l'allèle null à la fois en association avec l'allèle wt (1,4%) ou l'allèle floxé (2,4%) (témoin d'une recombinaison dans la lignée germinale d'un des deux parents, qui leur a donc transmis un allèle recombiné), ou l'allèle null en association avec l'allèle wt ou l'allèle floxé (1,6%) (témoin d'une activation inattendue du promoteur de la Cre uniquement dans certaines cellules, comme pour le cas du première croisement). Les résultats sont montrés en **Figure 47**).

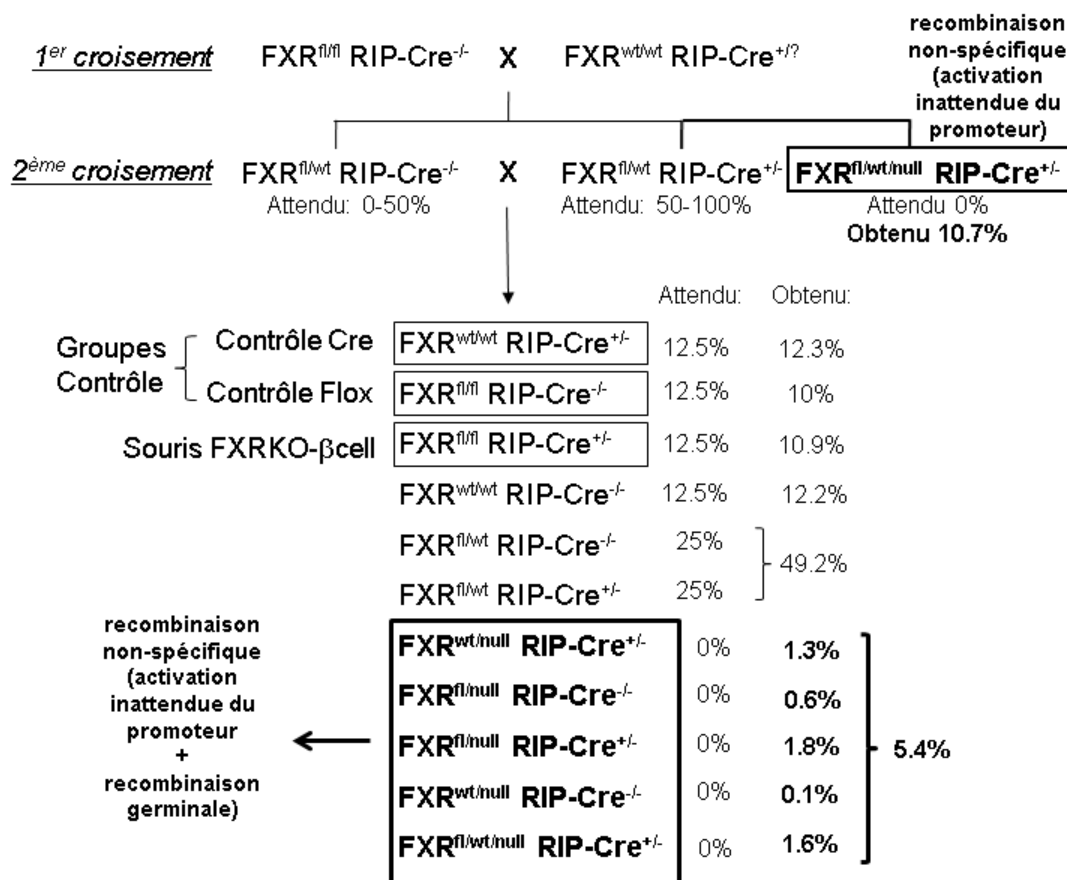


Figure 47. Schéma de croisement pour l'obtention de la souris FXRKO-βcell, et de ses contrôles de portée. Les pourcentages attendus et ceux obtenus pour chaque génotype à partir d'une population de 299 petits (1^{er} croisement) et de 707 petits (2^{ème} croisement) sont indiqués.

L'identification de la problématique de la recombinaison non-spécifique associée à une activité inattendue du promoteur pour la première fois dans la lignée RIP-Cre, pour laquelle de tels cas de recombinaison n'avaient jamais été reportés auparavant, nous a permis de résumer l'ensemble de nos observations dans un article qui a été accepté pour publication dans le journal *Transgenic Research*. Le texte intégral est rapporté dans les pages suivantes.

En conclusion, étant données les limites actuelles dans la compréhension des phénomènes sous-jacents à ces éventualités de recombinaison non désirée, il est indispensable de prévoir une technique de screening systématique pour tous les modèles développés avec la stratégie Cre-LoxP. Il reste important de continuer la mise à jour des banques de données existantes avec des données standardisées et détaillées de caractérisation des souches, pour que la communauté scientifique soit consciente de la gamme complète du potentiel d'activité de la Cre, et puisse utiliser les souches en pleine connaissance de leurs limites.

Manuscrit 2: Screening strategy to generate cell specific recombination: a case report with the RIP-Cre mice.

3.2.2. Validation du modèle FXRKO-βcell

Pour nous assurer que le système Cre-LoxP avait fonctionné dans notre modèle et que les souris FXRKO-βcell étaient correctement invalidées pour le gène de FXR uniquement dans l'îlot pancréatique, l'expression de FXR a été analysée par PCR quantitative dans les îlots de la souris FXRKO-βcell et des deux contrôles de portée Flox et RIP-Cre, ainsi que dans différents organes. La quantification du transcrite de FXR a été analysée à partir d'ARNm d'îlots isolés par Micro Dissection Laser (MDL), et l'activation non-spécifique du transgène Cre dans d'autres organes a été exclue par analyse d'ARNm de FXR et de la Cre dans le foie, l'intestin et cerveau. Nous avons retrouvé 1) une expression de FXR effondrée dans les îlots de la souris FXRKO-βcell par rapport aux contrôles ($\Delta\text{ct}_{(\text{FXR-cyclophiline})} = 4$ pour Contrôle Cre et Contrôle Flox et 8 pour FXRKO-βcell, **Figure 48A**), et 2) l'expression de la Cre uniquement dans les îlots de la souris FXRKO-βcell et du groupe contrôle Cre (dans ces deux groupes: $\Delta\text{ct}_{(\text{Cre-cyclophiline})} = 10$, et dans les îlots de la souris contrôle Flox: expression de la Cre = non détectable). Dans les autres organes, le niveau d'expression de FXR est comparable pour les trois génotypes (**Figure 48B**), et la Cre Recombinase n'est pas exprimée.

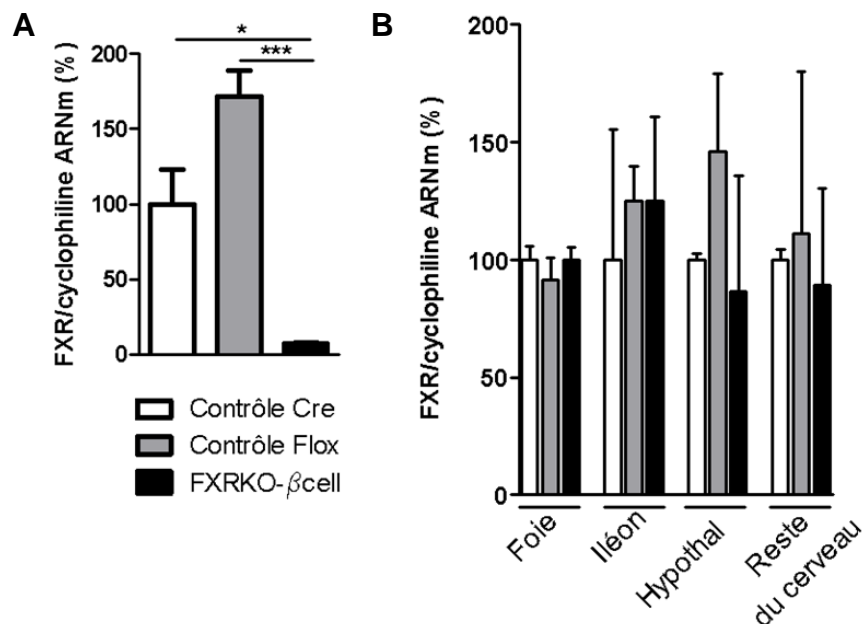


Figure 48. Expression de FXR dans les îlots pancréatiques (A) et dans le foie, l'iléon, l'hypothalamus et le reste du cerveau (B) de la souris FXRKO-βcell et des deux contrôles (n=3/groupe; moyenne +/- SEM; student t-test: * p<0.05, *** p<0.001).

3.2.2.1. Vérification de l'absence d'expression de la Cre dans le cerveau

L'intérêt de vérifier l'absence de la Cre dans le cerveau est particulièrement critique car la littérature rapporte plusieurs cas de fuite de l'expression de la Cre dans les régions cérébrales pour les souches RIP-Cre. D'une manière générale, il est reconnu que la lignée

RIP-Cre présente un niveau d'activation dans certains neurones localisés dans l'hypothalamus (Song et al. 2010, Wicksteed et al. 2010) **Figure 49A**) à tel point que la souche RIP-Cre a été -et est encore utilisée- pour des études d'inactivation spécifique dans l'hypothalamus (Kong et al. 2012b; Wang et al. 2014). La population neuronale où le promoteur de l'insuline est actif n'est pas encore bien caractérisée, si bien que ces neurones sont appelés neurones RIP, juste en fonction de leur identification à la souche RIP-Cre (Kong et al. 2012b). Toutefois, les études décrivant une activation de la Cre dans l'hypothalamus ont été conduites en utilisant la souche Magnuson (Tg(Ins2-cre)25Mgn/J), tandis que la souche que nous avons utilisée dans notre étude est celle de Pedro Herrera (Tg(Ins2-cre)23Herr), qui a été montrée pour avoir une expression moins étendue et beaucoup moins forte, sans une localisation définie mais plutôt ponctuelle dans tout le cerveau (Wicksteed et al. 2010) (**Figure 49B**).

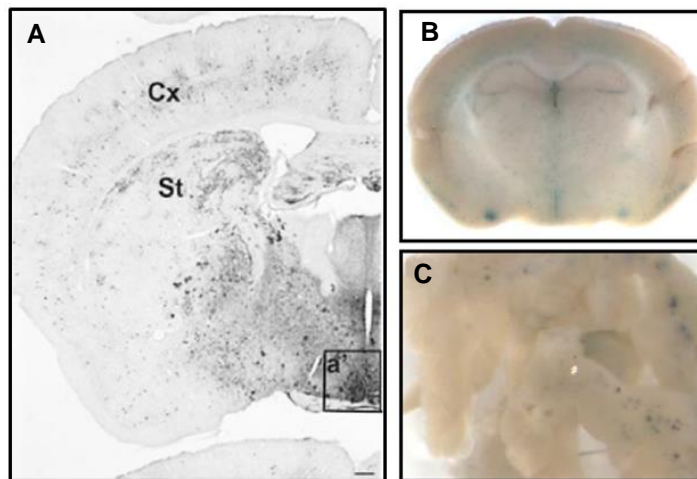


Figure 49. A. Expression de la Cre dans le cerveau de souris RIP-Cre de la souche Magnuson. (immunocoloration à la GFP visualisée avec un anticorps secondaire conjugué au complexe avidine-biotine et développé en solution de diaminobenzidine). B,C. Expression de la Cre dans le cerveau de souris RIP-Cre/R26R (reporter pour β -Gal) de la souche Herrera par coloration à l'X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-D-galactopyranoside). Cx: cortex; St: striatum; a': neurones positifs à la GFP dans le système nerveux central (Adaptée de Song 2010 et Wicksteed 2010)

Pour nous affranchir de ce doute, nous avons testé dans nos mains si notre modèle présente des fuites d'expression de la Cre dans le cerveau. Pour cela, nous avons croisé la souris RIP-Cre avec la souche transgénique pour un gène rapporteur connu, la souris Tomato (ROSA^{mT/mG}) (pour membrane-Tomato/membrane-Green;Gt(ROSA)26Sortm4(ACTB-tdTomato,-EGFP)Luo/J, Jackson Laboratory) (Muzumdar et al. 2007). Cette souche est largement utilisée comme "Cre reporter" dans la caractérisation du profil d'expression spatiale et temporelle de la Cre, pour l'analyse de la morphologie cellulaire *in vivo*, comme outil pour le traçage des lignées et pour les études de transplantation.

Le ROSA^{mT/mG} est un transgène qui permet de visualiser à la fois les cellules recombinées (donc exprimant la Cre ou l'ayant exprimée à un moment donné) et les non recombinées (donc n'exprimant pas la Cre). Le transgène code une protéine membranaire fluorescente à deux couleurs. La protéine émet une fluorescence dans le rouge quand elle n'est pas soumise à l'action de la Cre Recombinase, et dans le vert quand elle a été soumise à l'action de la Cre Recombinase (ce qui signale les cellules qui expriment la Cre ou dérivées des cellules qui ont exprimé la Cre à un moment donné).

Pour étudier le profil d'activation du transgène Cre dans nos souris, nous avons produit la souris Tomato-RIPcre, par croisement de la souris homozygote ROSAmT/mG (ROSA^{mT/mG}^{+/+}) avec nos souris RIP-Cre^{+/?}. La distribution des cellules marquées en vert et en rouge a été analysée par microscopie à fluorescence dans le cerveau et dans le pancréas des souris descendants Tomato-RipCre (ROSA^{mT/mG}^{+/-} RIP-Cre^{+/-}) et leur contrôle négatif (ROSA^{mT/mG}^{+/-} RIP-Cre^{-/-}). Dans le pancréas, le signal d'activation de la Cre (vert) chez la souris Tomato-RIPCre était bien détectable et avec une localisation spécifique à l'îlot (**Figure 50Ab**). En revanche, chez les souris contrôle négatif, qui n'ont pas la Cre Recombinase, le signal vert dans les îlots était absent, ou mieux, inférieure au bruit de fond dans le vert du tissu exocrine (**Figure 50Ae**). Pour vérifier que l'expression de la Cre dans l'îlot était restreinte aux cellules bêta, nous avons analysé la co-localisation de la GFP avec l'insuline et le glucagon (**Figure 50B**). Dans le pancréas de la souris Tomato-RIPCre, les cellules positives pour la GFP co-localisent avec l'insuline (**Figure 50Bd**) mais pas avec le glucagon (**Figure 50Bh**), ce qui confirme la spécificité du RIP-Cre à la cellule bêta pancréatique. Concernant le cerveau, nous n'avons pas trouvé de signal dénotant une expression de la Cre particulièrement dans l'hypothalamus, mais plutôt une faible expression ponctuelle et qui affectait un petit nombre de neurones dispersés sur tout le cerveau (**Figure 50Cb**). Ce résultat, conforme aux résultats des RIP-Cre^{Herr} de Wicksteed (Wicksteed et al. 2010), nous a confortés dans l'idée que notre modèle FXR^{fl/fl} RIP-Cre^{+/-} est invalidé pour FXR exclusivement dans la cellule bêta pancréatique. Même si les neurones Cre-positifs exprimaient FXR, leur nombre serait si faible sur la totalité des neurones FXR-positifs sur la totalité du cerveau, que cela n'impacterait pas la fonctionnalité de FXR dans le cerveau.

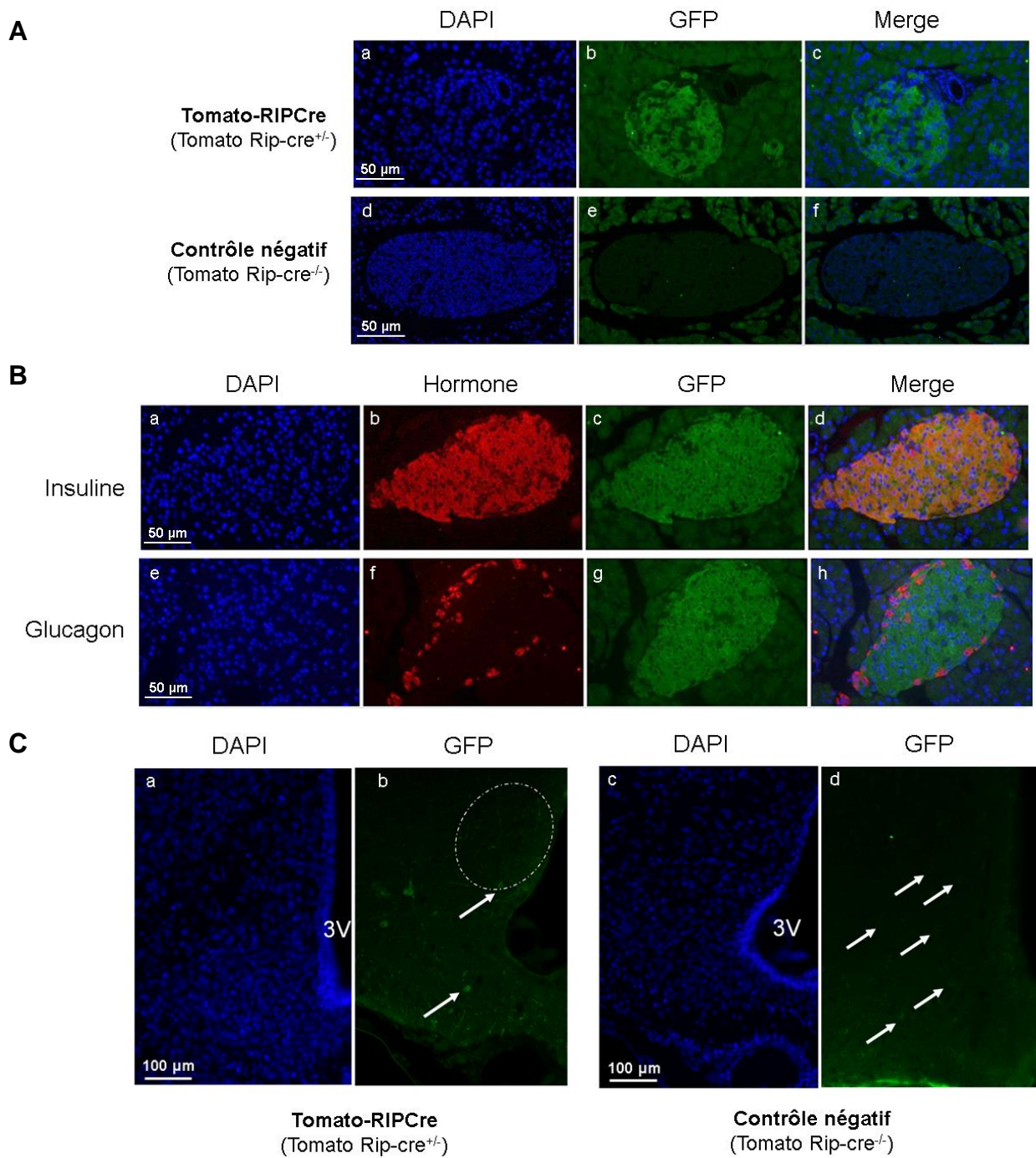


Figure 50. Analyse du profil d'activation du transgène Cre chez la souris Tomato-RIPCre (ROSA^{mT/mG}^{+/+}-RIP-Cre^{+/+}) par microscopie à fluorescence. **A.** Analyse dans le pancréas de la souris Tomato-RIPCre (Aa, Ab, Ac) et de la souris contrôle (Ad, Ae, Af). Noyaux marqués au DAPI (Aa, Ad), marquage GFP (Ab, Ae), merge (Ac, Af) **B.** Analyse dans l'îlot pancréatique chez la souris Tomato-RIPCre par co-marquage avec insuline et glucagon. Noyaux marqués au DAPI (Ba, Be), insuline (Bb), glucagon (Bf), marquage GFP (Bc, Bg), merge insuline-GFP (Bd) et merge glucagon-GFP (Bh). **C.** Analyse dans le cerveau de la souris Tomato-RIPCre (Ca, Cb) et de la souris contrôle (Cc, Cd). 3V: troisième ventricule; flèches en figure Cb: neurones marqués à la GFP; cercle en figure Cb: prolongements neuronaux; flèches en figure Cd: marquage non-spécifique.

3.2.2.2. Vérification de l'absence de perturbation métabolique dans la souche RIP-Cre

Comme détaillé dans le chapitre introductif, il existe en littérature des cas documentés où des souris transgéniques pour la Cre Recombinase (wt/wt cre+/?) développent une gluco-intolérance (Lee et al. 2006). Même si notre collaborateur, le Pr. Pedro Herrera, nous a assuré n'avoir jamais retrouvé cette anomalie dans sa souche RIP-Cre, en parallèle au développement de la souche FXRKO- β cell nous avons suivi le phénotype de la souche RIP-Cre (prise de poids, glycémie et insulïnémie) chez les souris (mâles et femelles) âgées de 4 à 24 semaines par comparaison avec des souris contrôle de portée n'exprimant pas la Cre. Nous avons été rassurés par le fait qu'aucune différence significative n'était observable sur tout l'intervalle de temps analysé, ni dans un sexe ni dans l'autre, en terme de poids corporel, glycémie et insulïnémie à jeun. De plus, un test de tolérance au glucose administré par voie intrapéritonéale (IPGTT, 1g/kg de glucose) n'a pas mis en évidence de différences de gluco-tolérance (**Figure 51A**), et la mesure de l'insuline (Mercodia Insulin ELISA) avant l'administration de glucose (t0, 15h de jeûne) ou 15 minutes après (t15) a montré l'idée que notre souche RIP-Cre ne présente pas d'anomalie métabolique (**Figure 51B**).

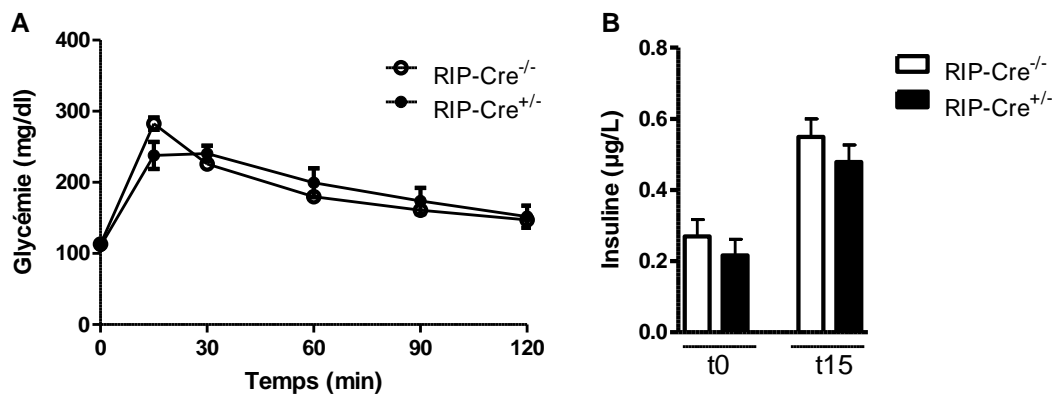


Figure 51: IPGTT (A) et insulïnémie (B) à t0 (15h de jeûne) et 15min après l'injection de glucose (t15) chez des souris mâles WT (RIP-Cre^{-/-}) (n= 4) et transgénique pour la Cre (RIP-Cre^{+/-}) (n=4) de 12 semaines d'âge. Moyenne +/- SEM

3.2.3. Caractérisation du modèle FXRKO- β cell

Nous nous sommes appliqués à rechercher les conditions métaboliques appropriées pour mettre en évidence le phénotype de la souris FXRKO- β cell, conditions dans lesquelles nous pourrions ensuite étudier les mécanismes impliqués et les gènes cibles de FXR. Etant donné la logistique lourde et complexe de production des souris et d'analyse des deux contrôles et des deux sexes, nous avons limité notre étude à un seul sexe et à un seul contrôle.

Nous avons choisi 1) le sexe mâle, couramment utilisé pour les études métaboliques, et 2) les souris contrôle Cre, dans la logique que si la modification du génome a des répercussions sur le phénotype, les effets de la présence d'une protéine exogène (Cre Recombinase) pourraient être plus conséquents que ceux dus à la présence de deux séquences LoxP dans les introns d'un gène (contrôle Flox).

3.2.3.1. Caractérisation du phénotype métabolique

Les premiers tests avaient pour objectif d'évaluer si l'inactivation de FXR dans la cellule bêta pancréatique se répercutait sur l'homeostasie du glucose chez la souris en régime standard (Chow Diet, Safe Diets A04C). Nous avons mesuré la glycémie (**Figure 52A**) et l'insulinémie (**Figure 52B**) chez la souris en condition de jeûne physiologique (4h : 8am-12am) comparée avec le contrôle Cre. Aucune différence significative n'a pu être observée. Pour tester la capacité de l'îlot à répondre à la stimulation aiguë par le glucose, nous avons mesuré la glycémie sur un période de deux heures après IPGTT. L'insulinémie a été mesurée avant le début du test (t0) et 15 min après l'administration de glucose (t15). Nous avons observé une intolérance au glucose (**Figure 52C**) accompagnée par une diminution de l'insulinémie (**Figure 52D**).

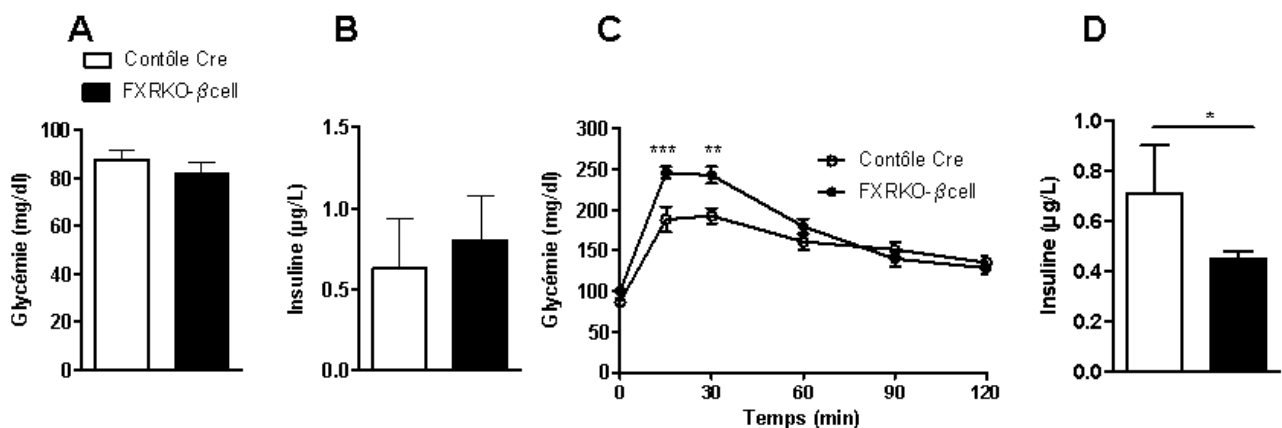


Figure 52: Glycémie (A) et insulinémie (B) chez des souris mâles de 35 semaines en Chow Diet après un jeûne de 4h (Contrôle Cre: n=6 et FXRKO-βcell: n=10). IPGTT (C) chez des souris mâles de 21 semaines nourries en Chow Diet (n=7/groupe), insulinémie mesurée 15 min après l'injection intrapéritoneale de glucose (D). Moyenne +/- SEM; Student T-test (A-B-D), Two-Way ANOVA post-Hoc Bonferroni (C), * p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

Cependant, le phénotype mis en évidence par le test de tolérance au glucose était difficilement reproductible sur plusieurs lots de souris, et ne nous a pas permis d'établir des conditions convaincantes pour continuer l'analyse des mécanismes moléculaires.

Pour précipiter le phénotype, nous avons soumis le modèle à une situation de stress métabolique. Les tests métaboliques sur la souris nourrie en High Fat Diet (Research Diet,

HFD 60%) ont été menés à partir de 5 semaines de régime, quand les souris ont pris 30% de leur poids corporel initial. Nous avons ainsi répété les tests de tolérance au glucose chez la souris mâle en High Fat Diet, jusqu'à l'âge de 28 semaines (20 semaines de régime), et nous avons effectivement pu confirmer le phénotype observé en Chow Diet pour la souris FXRKO- β cell, avec une différence de sécrétion d'insuline plus nette et un développement d'une intolérance au glucose aggravée (**Figure 53**).

Effectivement, l'application d'un stress métabolique a permis d'exacerber le phénotype, mais le résultat a aussi été peu reproductible. Cette difficulté ne nous a pas encouragés à suivre la caractérisation avec des analyses de puces sur les îlots en condition HFD, comme initialement prévu, mais plutôt de continuer dans la recherche des conditions où un phénotype clair et stable nous aurait convaincu de l'importance de FXR dans la cellule bêta.

Devant la difficulté d'identifier des conditions où la souris FXRKO- β cell présente un phénotype métabolique reproductible, nous avons émis l'hypothèse que la fonction de FXR dans la cellule bêta se manifeste d'une façon transitoire dans les conditions dynamiques de passage d'un état métabolique à un autre.

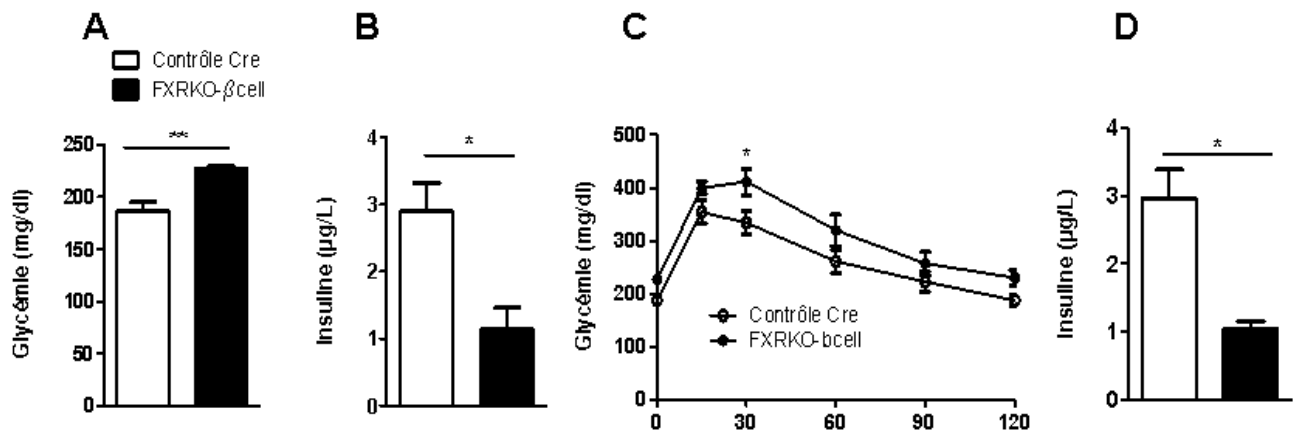


Figure 53. Glycémie (A) et insulïnémie (B) chez des souris mâles de 18 semaines nourries en High Fat Diet (pendant 10 semaines) après un jeûne de 4h (Contrôle Cre: n=8 et FXRKO- β cell: n=5). IPGTT (C) chez des souris mâles de 18 semaines nourries en High Fat Diet (pendant 10 semaines) (Contrôle Cre: n=8 et FXRKO- β cell: n=5) et insulïnémie mesurée à 15 min après l'injection ip de glucose (D) Moyenne +/- SEM; Student t-test (A-B-D), Two-WAY ANOVA post-Hoc Bonferroni (C), * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

En effet, il a été rapporté que FXR régule des étapes de changement nutritionnel: 1) dans la transition "fasting-refeeding", FXR participe dans le foie à la régulation de la glycolyse et de la lipogénèse par interférence directe avec les facteurs ChREBP et HNF4 α (Caron et al. 2013), et de la néoglucogénèse (les gènes de cette voie sont plus

fortement réprimés dans la transition “fasting-refeeding” chez la souris FXRKO par rapport au WT); 2) dans la réponse adaptative au jeûne sur le court terme, FXR agit comme régulateur positif de la néoglucogenèse hépatique (la souris FXRKO est hypoglycémique est présente des valeurs d’expression de la PEPCK plus faibles après 6 heures de jeûne, et plus après 24 ou 48 heures de jeûne (Cariou et al. 2005).

Comme décrit dans l’introduction (§3.5.2) la sécrétion de l’insuline a une rythmicité circadienne avec des oscillations sur le nyctémère. Ces oscillations sont dues à une régulation fine par l’horloge centrale (SNC) et par l’horloge périphérique de l’îlot, ce qui participe à la régulation complexe de l’homéostasie du glucose sur les 24 heures. Puisque le métabolisme du glucose est régulé par l’horloge centrale et les horloges internes aux différents organes, la désynchronisation de l’horloge dans un des tissus peut amener à la perturbation de l’homéostasie du glucose et aux désordres métaboliques.

Notre hypothèse était que FXR pouvait avoir un impact sur la régulation de la rythmicité circadienne de la sécrétion de l’insuline, hypothèse confortée par la dérégulation de Rev-Erb α dans l’analyse transcriptomique des îlots FXRKO total (§3.1 de ce chapitre). Nous avons mesuré la glycémie et l’insulinémie de la souris FXRKO- β cell comparée au contrôle Cre toutes les 4 heures pendant 24 heures, pour mettre en évidence un décalage potentiel dans la rythmicité ou dans l’amplitude de leurs oscillations. Les résultats sont présentés en **Figure 54**.

Chez la souris contrôle Cre, la glycémie augmente pendant la “phase lumière”, reflétant l’augmentation de la production hépatique du glucose (comme expliqué au §3.5.2.1). Avec le passage à la “phase noire” (débutant à 7pm dans notre animalerie, et représentée avec un trait noir en **Figure 54A**), la glycémie augmente encore (suite à la métabolisation de la nourriture que la souris ingère dès que la lumière s’éteint) et atteint son pic à 12pm, pour redescendre aux premières heures du matin. La souris FXRKO- β cell présente une glycémie plus basse sur la “phase lumière” de la journée (avec une significativité statistique à 4pm), ce qui dans les conditions physiologiques correspond à la phase d’inactivité de la souris, là où le métabolisme anabolique est favorisé. Ces différences disparaissent dès que la souris est nourrie (à 8pm) De manière surprenante, les glycémies à 8am et 12am (les deux derniers points) avaient des valeurs légèrement supérieures par rapport au jour précédent, probablement dus au stress induit par la manipulation récurrente de l’animal. (**Figure54A**).

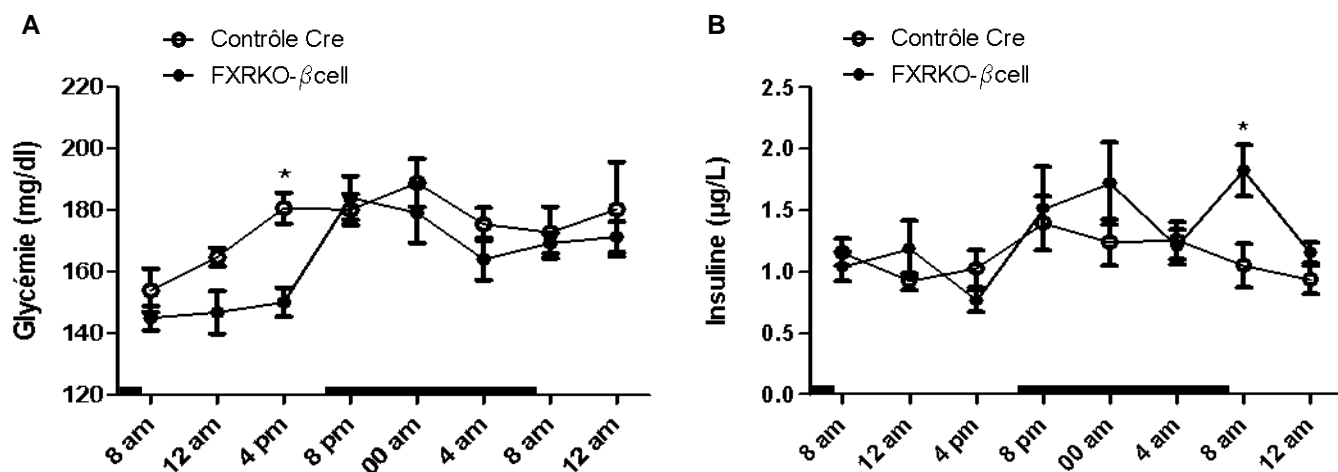


Figure 54. Glycémie (A) et insulïnémie (B) mesurées pendant 24 heures chez la souris mâle contrôle Cre et FXRKO-βcell (n=9/groupe), de 15 semaines d'âge, en état "fed". Moyenne +/- SEM, student t-test *p<0.05. Le trait noir sur l'axe des abscisses indique la phase d'obscurité.

Les variations de l'insulïnémie suivent le profil de la glycémie, avec une augmentation après le passage à la "phase noire", quand la souris se nourrit (8pm-12pm) (**Figure 54B**). De manière étonnante, la différence de glycémie de la souris FXRKO-βcell à 4pm n'est pas accompagnée par une différence d'insulïnémie au même temps, suggérant une altération possible dans le "glucose sensing" par l'îlot de la souris FXRKO-βcell (**Figure 54B**).

Cette analyse montre que la déficience de FXR dans la cellule bêta n'altère pas l'oscillation de sécrétion d'insuline (ni en terme de décalage ni en terme d'amplitude).

Le fait que la différence observée (glycémie à 4pm) concerne une période de "jeûne physiologique" de la souris, nous a conduit à répéter l'expérience en condition de jeûne imposé, de manière à éventuellement exacerber la différence en glycémie observée à 4pm. Les souris ont donc été mises à jeun le matin à 8am et la glycémie mesurée toutes les 4 heures sur 24 heures. Nous avons observé que la glycémie de la souris FXRKO-βcell à 8pm, après un jeûne de 12 heures sur la journée, est plus basse que celle de la souris contrôle Cre (**Figure 55A**). De plus, cette différence ne s'exacerbe pas avec le prolongement du jeûne sur la nuit, mais reste transitoire et restreinte au moment du passage "lumière-noir".

Pour comprendre si la différence de glycémie observée à 8pm est la conséquence d'une différence d'activation de la néoglucogénèse, nous avons soumis les souris à un test de tolérance au pyruvate (PTT, 2g/kg de pyruvate) au moment où la différence en glycémie était la plus visible, à 8pm, après 12 heures de jeûne, pour tester leur capacité à produire du glucose à partir de ce substrat. Les résultats sont présentés en **Figure 56**.

Nous avons observé que à t0 (début de la manip, 8pm) la glycémie des souris FXRKO- β cell était plus basse que celle des contrôle Cre, et cette différence était maintenue tout au long du test, avec la courbe de la glycémie en réponse au pyruvate de la souris contrôle Cre au-dessus de celle des FXRKO- β cell (**Figure 56A**). Cependant, lorsque les résultats étaient exprimés en pourcentages de la glycémie initiale (**Figure 56B**), cette différence n'était plus présente. La différence entre les deux courbes observée en **Figure 56A** étaient le reflet d'une glycémie différente au départ. Nous en avons conclu que **la néoglucogénèse hépatique n'est pas régulée d'une façon différente entre les deux génotypes.**

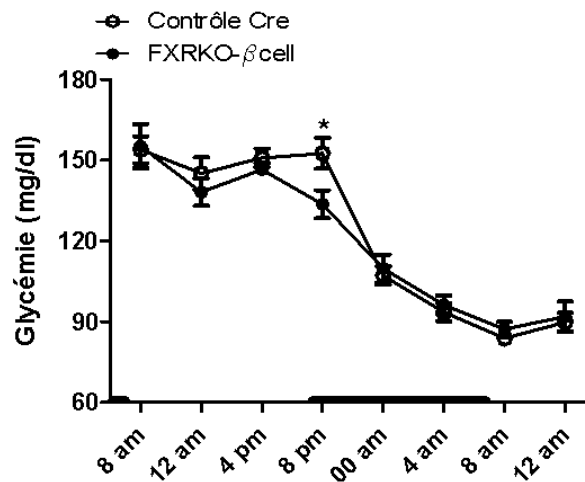


Figure 55 Glycémie sur les 24 heures chez la souris mâle contrôle Cre et FXRKO- β cell (n=9/groupe) de 22 semaines d'âge, en état de jeûne à partir de 8am. Moyenne +/- SEM, student t-test *p<0.05. Le trait noir sur l'axe des abscisses indique la phase d'obscurité.

Le résultat montré en **Figure 55** a été reproduit plusieurs fois sur le même lot de souris, ainsi que sur un deuxième lot de souris d'âge différent. Ainsi, confortés par la reproductibilité de ce résultat, nous avons voulu rechercher l'origine de cette différence de glycémie observée à 8pm.

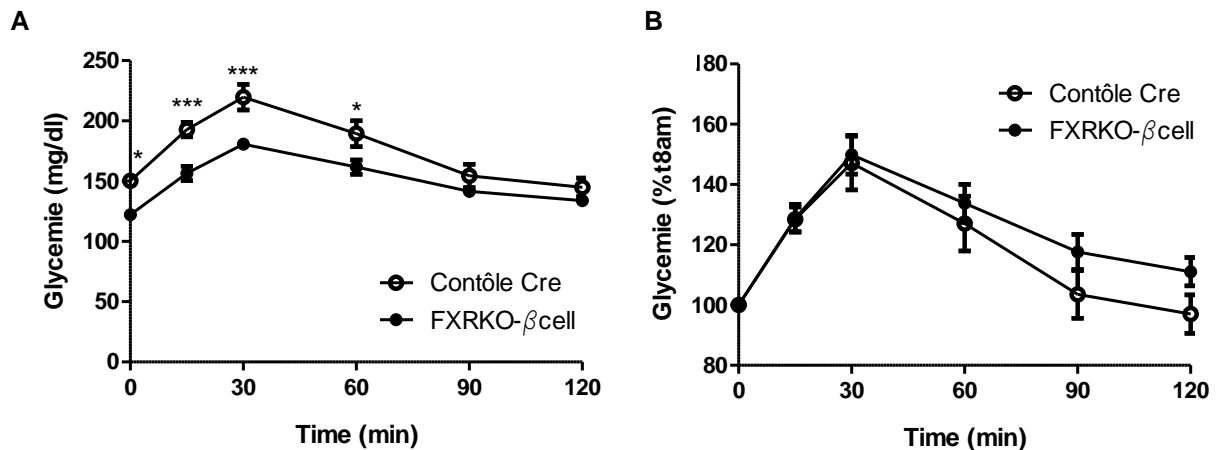


Figure 56 Courbes de glycémie au cours d'un PTT chez la souris mâle de 20 semaines (n=12/groupe), exprimée valeur absolu (A) ou en pourcentages par rapport à la glycémie initiale (B). Moyenne +/- SEM; Two-WAY ANOVA post-Hoc Bonferroni, * p<0.05, ***p<0.001.

Puisque la différence de glycémie n'est pas expliquée par des taux différents de néoglucogenèse, nous avons émis des hypothèses qui impliquent d'autres voies responsables de la production/consommation du glucose, avec les analyses à faire pour les vérifier:

a) Production du glucose par le foie:

- mobilisation du **glycogène hépatique**: analyse des stocks de glycogène et de l'expression des gènes de la glycogénolyse;

- production du glucose par **néoglucogenèse**: analyse de l'expression de la **lactate déshydrogénase**, pour comprendre si la diminution de la production hépatique du glucose de la souris FXRKO- β cell est due à une différence de production de ses substrats;

- Analyses des voies métaboliques principales (cétogenèse, β -oxydation..) par dosage des paramètres biochimiques circulants et analyse de l'expression génique dans le foie.

b) Utilisation du glucose par les organes périphériques, en particulier par les muscles: analyse des concentrations plasmatiques de **lactate** et analyse de l'expression de la **lactate déshydrogénase**, pour évaluer si l'apport en substrat de la néoglucogenèse hépatique est le même dans les deux génotypes.

c) Libération des substrats énergétiques par le tissu adipeux, ce qui peut fournir les substrats (glycérol) pour la néoglucogenèse hépatique: analyses de paramètres lipidiques circulants.

L'analyse des paramètres circulants a été faite à partir du sang retro-orbital prélevé chez les souris à 8pm après un jeûne de 12 heures. Les résultats du dosage du lactate, bêta-hydroxybutyrate (β -OH), AGL, triglycérides et cholestérol total sont montrés en **Figure 57**.

La souris FXRKO- β cell présente une concentration de lactate plus faible (**Figure 57A**), ce qui pourrait expliquer les taux plus faibles de néoglucogenèse. Nous n'avons pas observé de différences de concentrations plasmatiques en β -OH, TG et cholestérol (**Figure 57B, D, E**), mais la souris FXRKO- β cell présente une concentration d'AGL plus élevée (**Figure 57C**).

Dans notre modèle FXR est invalidé dans la cellule bêta pancréatique, il est intuitif de penser que le phénotype observé soit la conséquence d'une dérégulation d'un signal en provenance du pancréas. Par contre, la différence de glycémie observée à 8pm n'était pas accompagnée par une différence d'insuline (**Figure 58A**). Ce résultat pourrait être dû à une capacité différente de la cellule bêta à métaboliser le glucose, ce qui demandera l'analyse de la régulation génique des voies de métabolisation du glucose dans les îlots pancréatiques de la souris FXRKO- β cell.

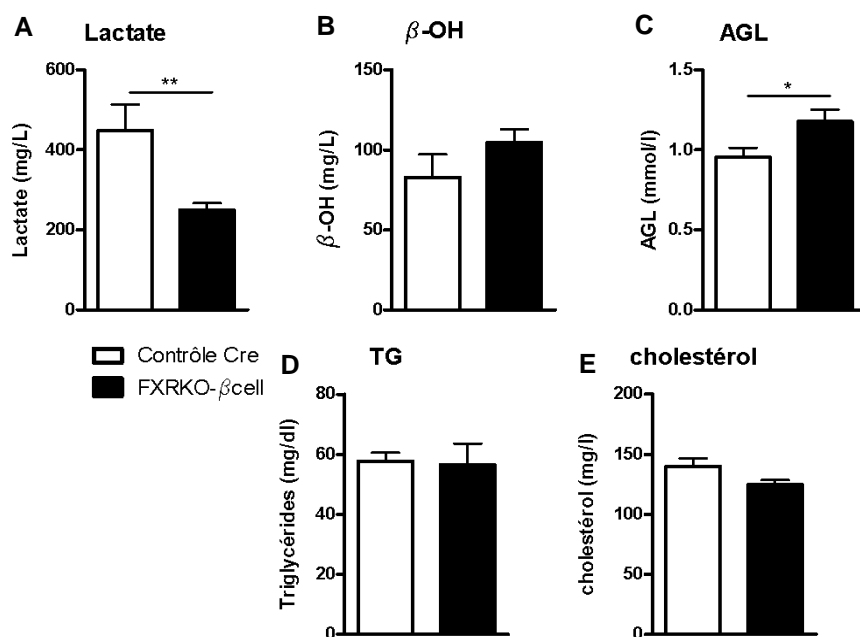


Figure 57 Concentrations plasmatiques de lactate (A), bêta-hydroxybutyrate (β -OH) (B), acides gras libres (AGL) (C), triglycérides (TG) (D) et cholestérol (E) chez la souris mâle contrôlé Cre (n=12) et FXRKO- β cell (n=12), de 21 semaines d'âge à 8pm, après un jeûne de 12 heures. Moyenne +/- SEM, student t-test *p<0.05, **p<0.01.

Puisque l'hormone majeure de régulation à l'état de jeûne est le glucagon, nous avons dosé sa concentration plasmatique (Glucagon Quantikine ELISA Kit, (R&D Systems Europe)) à 8pm pour tester l'hypothèse d'une action paracrine de FXR dans la cellule bêta sur la production du glucagon par la cellule alpha. Nous n'avons observé aucune différence entre les deux génotypes (**Figure 58B**). Une autre hormone qui régule le métabolisme du glucose à l'état de jeûne est la corticostérone. L'analyse des concentrations de corticostérone circulantes (Assay max corticosterone ELISA kit, Euromedex) à 8pm chez les deux groupes de souris a montré des concentrations plus élevées pour la souris FXRKO- β cell par rapport au contrôle Cre (**Figure 58C**). Cette augmentation pourrait résulter de la tentative de la souris FXRKO- β cell de rétablir des concentrations de glycémie normale par la libération de substrats énergétiques par le tissu adipeux.

Pour comprendre et expliquer le phénotype observé, nous allons compléter l'analyse des altérations métaboliques dans le foie et les tissus périphériques de la souris FXRKO- β cell, avec l'analyse de l'expression géniques des voies métaboliques dans les organes collectés à 8pm (ex. glycogénolyse, cétogenèse, β -oxydation dans le foie, lactate déshydrogénase dans le foie et muscle, lipolyse dans le tissu adipeux, récepteur de la corticostérone dans le foie...) et le dosage du contenu hépatique en glycogène. Les souris ont été sacrifiées à 6pm, dans l'idée que si les altérations phénotypiques que l'on observe à 8pm sont le résultat d'une dérégulation

d'expression génique, celle-ci devrait être déjà mesurable deux heures à l'avance. Les analyses sur les organes collectés sont actuellement en cours.

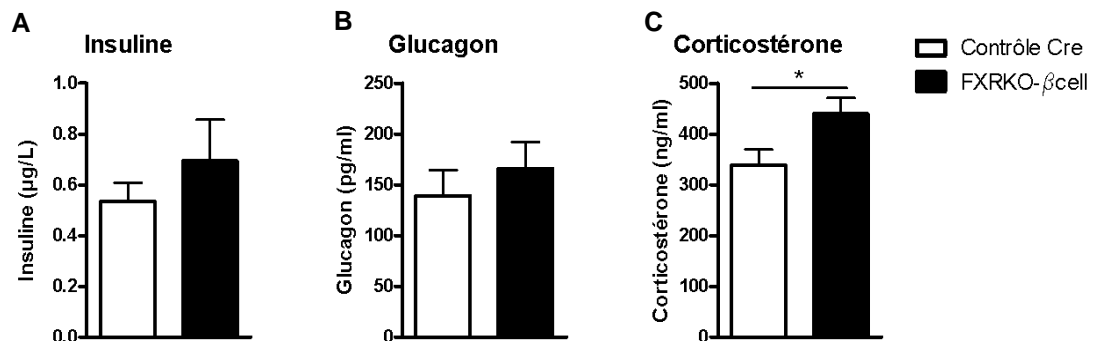


Figure 58 Concentrations plasmatiques d'insuline (A), glucagon (B), corticostérone (C), chez la souris FXRKO-βcell (n=12) et contrôle Cre (n=12), 21 semaines à 8pm, après un jeûne de 12 heures. Moyenne +/- SEM, student t-test *p<0.05.

Une fois caractérisée les voies de régulation altérées, il restera à élucider comment l'invalidation de FXR dans la cellule bêta peut avoir des répercussions sur les tissus périphériques. Comme nous l'avons montré, les différences entre les deux génotypes sont transitoires, au moment du passage "phase lumière-phase noire", quand la souris commence à se nourrir. Pour expliquer le mécanisme à la base de la différence de phénotype à 8pm, il faudra comparer les concentrations d'insuline et glucagon et l'expression génique de l'îlot chez la souris FXRKO-βcell et la souris contrôle Cre à deux temps: 1) au moment où les deux phénotypes sont différents, et 2) au moment où les deux souris ne présentent pas de différences de phénotype. Cela permettra de comprendre comment la régulation génique de l'îlot est altérée chez la souris FXRKO-βcell dans les conditions dynamiques d'adaptation au jeûne.

En résumé, la souris FXRKO-βcell nourrie en régime standard présente une légère intolérance au glucose par comparaison aux souris contrôles. Soumise au stress métabolique du HFD, elle développe une intolérance au glucose associée à une diminution de la sécrétion d'insuline en réponse à une administration de glucose. De plus, FXR dans la cellule bêta pourrait être nécessaire dans les dynamiques d'adaptation au jeûne prolongée, mais le lien entre le pancréas et les autres organes dans ce contexte reste à élucider.

Avec les résultats obtenus *in vivo*, nous montrons que FXR dans la cellule bêta est nécessaire pour le maintien de l'homéostasie du glucose dans l'organisme entier, avec une légère altération de la réponse au glucose en régime standard, qui est aggravée quand la souris est nourrie en régime riche en graisse, avec une diminution de la

sécrétion de l'insuline. Son importance se manifeste en particulier en condition de stress métabolique et dans l'adaptation au jeûne.

3.2.3.2. Détermination des gènes cibles de FXR dans l'îlot pancréatique: étude dans des conditions d'augmentation des ligands de FXR induite par cholestase chirurgicale

3.2.3.2.1 Rationnel de l'étude

Notre objectif était de déterminer les gènes cibles de FXR dans la cellule bêta pancréatique. Puisque dans l'îlot FXR est exprimé dans la cellule bêta, nous avons analysé les gènes modulés par FXR dans l'îlot total de la souris FXRKO- β cell. Initialement nous avons prévu de faire cette analyse transcriptomique dans des conditions métaboliques où une différence de phénotype entre la souris FXRKO- β cell et son contrôle était manifeste (*fasting, fed, Chow Diet, High fat Diet*), mais il ne nous a pas été possible de déterminer un contexte métabolique reproductible montrant une différence de phénotype.

Nous avons adopté une autre stratégie, qui consiste à **augmenter le pool des ABs**, ligands de FXR, et étudier dans ces conditions les gènes différemment exprimés dans les îlots des deux génotypes.

Pour augmenter massivement les ligands naturels de FXR circulants et dans les îlots *in vivo*, nous avons utilisé la technique de **ligature chirurgicale du canal biliaire** (Bile Duct Ligation - BDL). Le principe est que l'obstruction mécanique obtenue avec la ligature du canal biliaire induit une cholestase extrahépatique, avec augmentation des concentrations d'ABs dans le sang et par conséquent dans les organes vascularisés, ici compris les îlots pancréatiques.

3.2.3.2.2. Protocole expérimental

Le protocole expérimental est décrit en **Figure 59**. Huit souris FXRKO- β cell et huit souris contrôle Cre ont été opérées selon la procédure de BDL (n=4 par génotype) ou sham (n=4 par génotype). Six heures et 24 heures après l'opération, un prélèvement sanguin à la veine caudale a été effectué pour doser les ABs plasmatiques totaux (méthode enzymatique, Diazyme Total Bile Acids Assay) et vérifier l'augmentation des ABs. En effet, déjà 6 heures après l'opération, la concentration des ABs totaux plasmatiques était augmentée chez les souris BDL comparée au Sham (indépendamment du génotype), et encore plus 24 heures après (**Figure 60A**).

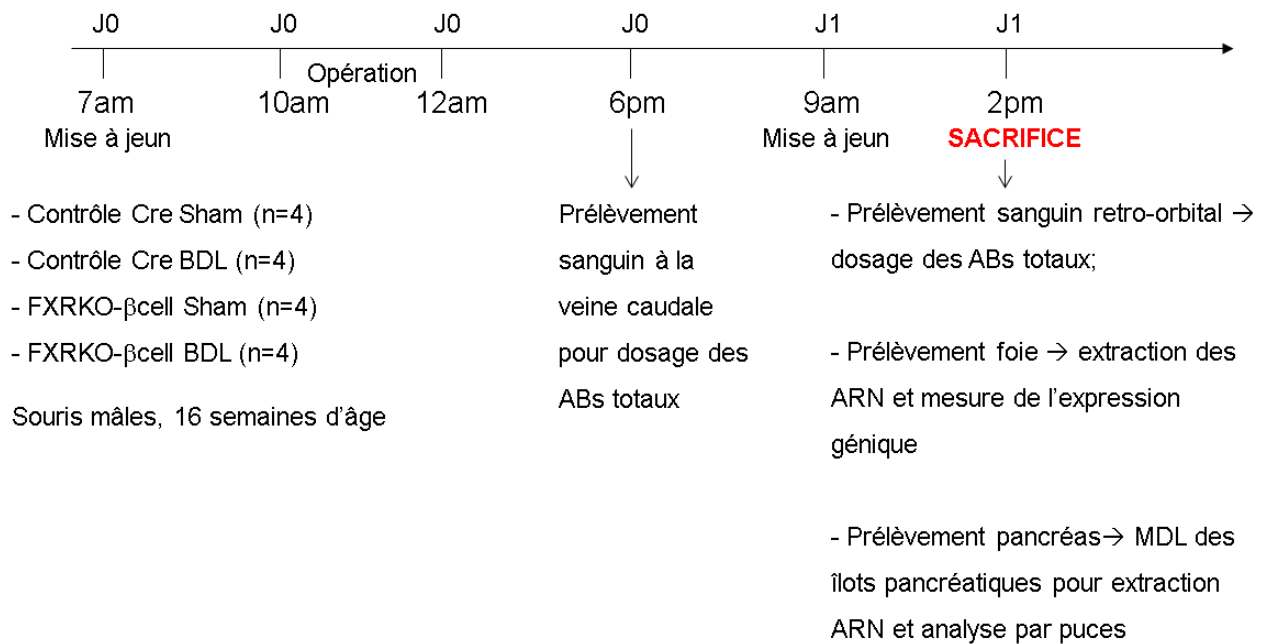


Figure 59. Protocole expérimental pour la procédure de BDL pour l'analyse transcriptomique des îlots pancréatiques.

Les souris ont été sacrifiées en état de jeûne (5 heures), 24 heures après l'opération. Cet intervalle a été choisi pour permettre l'activation transcriptionnelle de FXR et en même temps prévenir les phénomènes secondaires à l'augmentation des ABs, comme la cytotoxicité et la réponse inflammatoire massive. Le foie et le pancréas ont été prélevés. Les ARN du foie ont été extraits par la méthode du phénol-chloroforme et l'expression génique de NTCP, MRP3, MRP4, marqueurs de cholestase (Wagner et al. 2003; Zollner et al. 2005), analysée par RT-qPCR. Effectivement, une diminution de l'expression de NTCP et une augmentation de MRP3 et MRP4 (même si pas toujours significative), comme rapporté dans la littérature (**Figure 60B, C, D**), a validé notre expérience de BDL.

Les ARN des îlots pancréatiques ont été obtenus selon la procédure détaillée en Annexe 1 et schématisée en **Figure 61**. En bref, les îlots ont été isolés à partir du pancréas par MDL (procédure qu'à nécessité d'environ une demi-journée pour souris), à l'utilise d'une moyenne de 2-3 lames pour souris avec 3 coupes de pancréas chacune, ce qui correspond à environ 130-150 surfaces d'îlots par échantillon. Les ARN ont été purifiés sur colonne, leurs concentrations déterminées au Bioanalyser. Les ARN ont été amplifiés selon les instructions du fabricant et puis déposés sur puces Affymetrix. Pour cette expérience nous avons collecté une moyenne de 900 000 UA (unités Arbitraires) de surface de tissu pancréatique, qui nous a permis d'isoler une moyenne de 4 ng d'ARN avec un RIN compris entre 6 et 7. Une partie de ces ARN a été amplifiée avec l'obtention d'une moyenne de 7-10 µg d'ADNc pour

échantillon (les détails de l'analyse pour chaque échantillon sont rapportés en Annexe 1). Cinq μg ont été utilisés pour l'analyse sur puces.

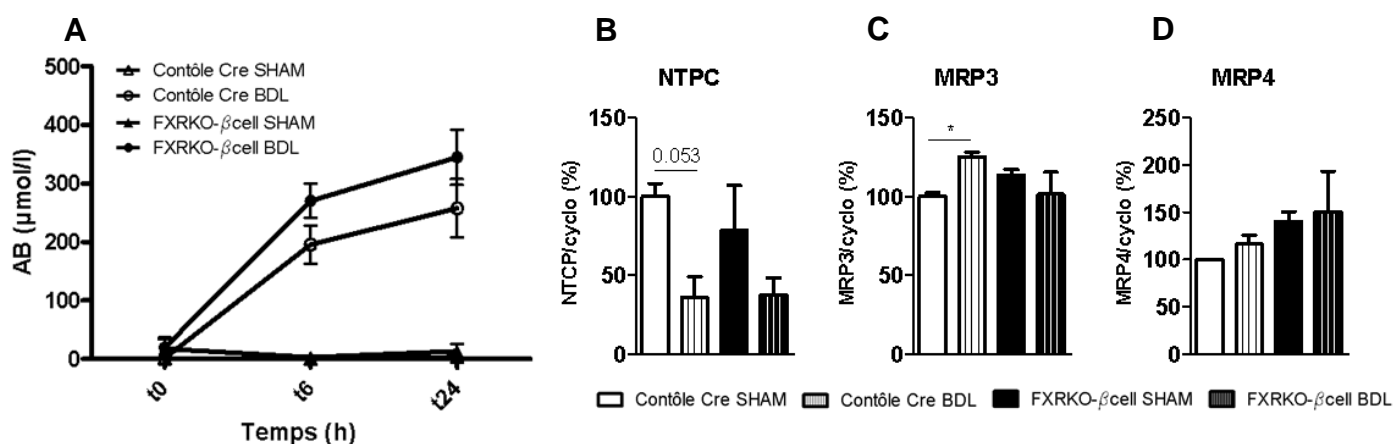


Figure 60. A. Concentrations d'ABs plasmatiques avant l'opération (t_0), 6 heures et 24 heures après l'opération chez les souris contrôle Cre (blanc) et FXRKO- β cell (noir) BDL (cercles) et Sham (triangles) ($n=4/\text{groupe}$). Expression hépatique des gènes NTPC (B), MRP3 (C) et MRP4 (D). $n=4/\text{groupe}$, Moyenne \pm SEM, Student t-test * $p<0.05$.

3.2.3.2.3 Analyse transcriptomique

Dans l'interprétation de la grande quantité de données issues de cette analyse, nous avons généré plusieurs listes de gènes, obtenues en comparant différents groupes/génotype (FXRKO- β cell-contôle Cre)/opération (BDL-Sham).

Pour extraire les gènes régulés par FXR en condition d'augmentation de ses ligands nous avons eu besoins de comparer plusieurs conditions génotype/opération selon le rationnel suivant: dans les îlots pancréatiques de la souris contrôle Cre, les altérations de l'expression génique induites par l'augmentation du pool des ABs (groupe contrôle Cre, BDL) incluent les gènes régulés par FXR et les gènes indépendants du contrôle de FXR. En revanche, dans les îlots de la souris FXRKO- β cell, l'augmentation du pool des ABs (groupe FXRKO- β cell, BDL) permet de mettre en évidence seulement les gènes dérégulés de manière FXR indépendante. Ainsi, la soustraction de ces gènes à l'ensemble des gènes dérégulés par la BDL dans les îlots de la souris contrôle Cre devrait alors résulter dans l'ensemble de gènes dérégulés d'une façon FXR dépendante (de manière directe ou indirecte).

Dans cette logique, nous avons généré deux listes de gènes:

1) La liste "effet BDL", obtenue par comparaison du groupe contrôle Cre BDL au contrôle Cre Sham, avec une valeur minimum de p-value d'au moins 0,05. Cette analyse a généré 1317 entité géniques dérégulées (en rouge dans la **Figure 62**);

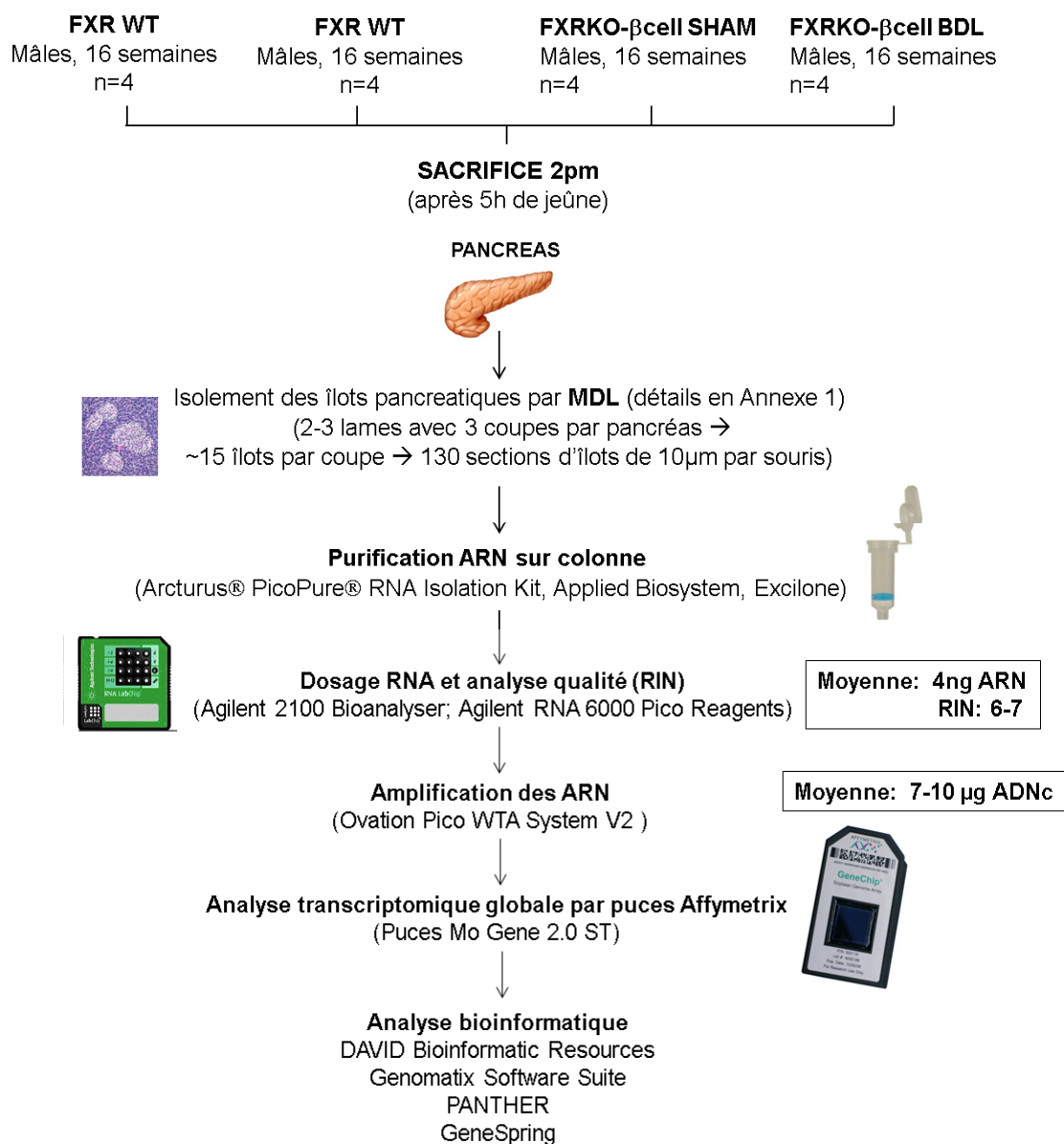


Figure 61. Protocole expérimentale d'analyse transcriptomique globale pour identifier les gènes cibles de FXR dans l'îlot pancréatique murin dans le modèle FXRKO-βcell.

Pour soustraire à la liste des gènes dérégulés par l'augmentation du pool des ABs (liste 1) les gènes dérégulés de manière non dépendante de FXR, nous avons croisé les deux listes, et enlevé de la liste 1 les gènes issus de cette intersection (67 gènes, en **figure 62B**).

2) La liste “*effet BDL en absence de FXR*”, obtenue par comparaison du groupe FXRKO-βcell BDL avec le groupe FXRKO-βcell Sham, avec une valeur minimum de p-value d'au moins 0,05. Cette analyse a généré 1279 entités géniques dérégulées (en bleu dans la **Figure 62**);

Cette soustraction a généré une nouvelle liste (Liste 3, en jaune dans la **Figure 62B, C**) composée de 1250 entités dérégulées. De ces éléments, 467 correspondaient à des régions non codantes, et 783 à des séquences codantes, avec 379 gènes down-régulés et 404 up-régulés.

Cependant, l'analyse avec plusieurs logiciels informatiques (DAVID pathways, Panther, Genomatix) n'a mis en évidence aucun "pathway" potentiel.

Toutefois, de manière intéressante, l'analyse a sorti un nombre important de microRNA dérégulés par la BDL et pas en absence de FXR (**Figure 63**). De manière intéressante, certains de ces miRNA sont associés au diabète, car ils sont retrouvés dans les îlots de souris ou de rat diabétiques (Guay et al. 2011, 2012; Guay et Regazzi 2013, 2015a, 2015b). C'est le cas par exemple des miRNA-409 et -139 (unrégulés dans les îlots de souris et rat diabétiques), ou des miRNA129, -210, downrégulés dans ces modèles animaux.

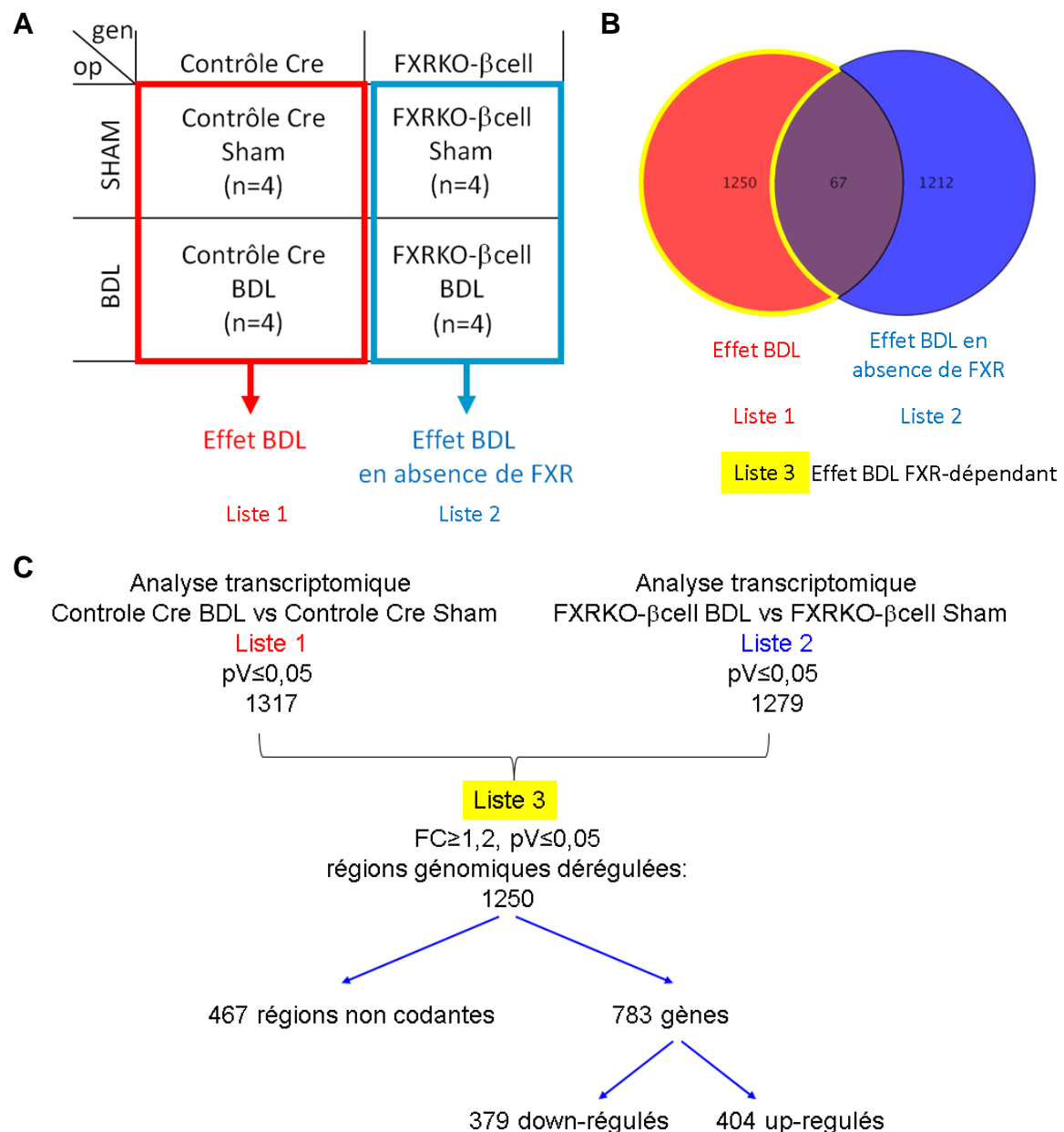


Figure 62. Stratégie d'analyse de l'étude transcriptomique (A) et ensemble de gènes retenus pour l'analyse (B). Gen=genotype; op=opération. C. Résultat de l'analyse transcriptomique des îlots de la souris FXRKO-βcell comparée au contrôle Cre en condition de pool d'ABs élevés.

CONDITION BDL

A	Gene Symbol	FC	pV	B	Gene Symbol	FC	pV
	MirRNA1960	1,64	0,007		MirRNA496	-2,31	0,019
	MirRNA743	1,63	0,047		MirRNA654	-2,05	0,039
	MirRNA409	1,60	0,017		MirRNAlet7e	-1,75	0,011
	MirRNA707	1,53	0,004		MirRNA129-1	-1,64	0,031
	MirRNA3087	1,32	0,045		MirRNA1953	-1,59	0,007
	MirRNA25	1,21	0,049		MirRNA139	-1,58	0,049
	MirRNA9-1	1,16	0,025		MirRNA3098	-1,48	0,027
	MirRNA3109	1,12	0,006		MirRNA341	-1,37	0,009
	MirRNA5099	1,12	0,045		MirRNA135b	-1,29	0,038
					MirRNA547	-1,22	0,019
					MirRNA210	-1,21	0,043
					MirRNA134	-1,12	0,045

Figure 63. miRNA upregulés (A) et downregulés (B) par l'augmentation massive des ABs (en condition BDL) dans les îlots de la souris contrôle Cre mais pas dans les îlots de la souris FXRKO- β cell.

De manière encourageante, dans l'idée que FXR participe à la régulation du métabolisme du glucose avec une action dans l'îlot pancréatique qui passerait par la régulation de miRNA, l'analyse des gènes dérégulés en comparant le transcriptome des îlots de la souris FXRKO- β cell (Sham) avec la souris contrôle Cre (Sham), un grand nombre de miRNA dérégulés sont identifiés aussi (**Figure 64**). Parmi ceux-là, on en retrouve de ceux associés au diabète dans des modèles animaux (Guay et Regazzi 2015b), comme les miRNA344, -181c, -362 parmi les miRNA un-regulés, ou les miRNA-195, -302 et -30c parmi ceux qui sont up-regulés.

CONDITION SHAM

A	Gene Symbol	FC	pV	B	Gene Symbol	FC	pV
	Mir505	3,04	0,032		Mir302c	-2,95	0,007
	Mir344e	2,37	0,011		Mir302b	-2,49	0,036
	Mir154	1,92	0,046		Mir3060	-1,91	0,005
	Mir1898	1,65	0,043		Mirlet7e	-1,50	0,047
	Mir377	1,47	0,028		Mir1932	-1,45	0,025
	Mir181c	1,41	0,044		Mir367	-1,36	0,015
	Mirlet7c-1	1,4	0,032		Mir5120	-1,35	0,018
	Mir362	1,34	0,02		Mir1945	-1,34	0,027
	Mir155	1,25	0,034		Mir195	-1,33	0,047
					Mir878	-1,22	0,037
					Mir1190	-1,22	0,023
					Mir30c-1	-1,51	0,043

Figure 64. miRNA upregulés (A) et downregulés (B) dans les îlots de la souris FXRKO- β cell comparées au souris contrôle Cre (en condition Sham).

Pour la famille des miRNAlet7 présente dans la liste des miRNA down-regulés issus des deux types d'analyse, une fonction dans le métabolisme du glucose, et de façon

intéressante, dans la sécrétion de l'insuline, est connue. Plus précisément, la down régulation *in vivo* de ces miRNA prévient le développement de la gluco-intolérance chez des souris soumises au régime HFD, tandis que l'over expression *in vivo* affecte négativement la sécrétion de l'insuline en réponse au glucose (Frost et Olson 2011).

La fonction et le mécanisme d'action exact de la plupart de ces miRNA dans l'îlot n'ont pas encore été élucidés, mais l'association entre la condition pathologique et leur dérégulation dans les modèles animaux laisse supposer une participation de FXR à la régulation du métabolisme du glucose dans l'îlot *via* ces intermédiaires.

Ces résultats donc, bien que non exhaustifs, confortent l'idée d'un rôle de FXR bêta pancréatique sur la régulation du “*all body glucose metabolism*” et ouvrent des pistes intéressantes à explorer.

3.3.3.3. Détermination de la composition du pool des ABs plasmatiques et pancréatiques

En parallèle à l'analyse du transcriptome dans l'îlot en condition de pool d'ABs élevé, nous nous sommes interrogés sur la composition du pool des ABs dans le pancréas et sur les effets que la déficience de FXR dans la cellule bêta pancréatique et la BDL peuvent avoir sur sa composition. Plus précisément, nous avons différentes questions:

Q1: Est-ce que le pool d'ABs pancréatique reflète la composition plasmatique?

Q2: Est-ce que le pool d'ABs dans le pancréas est modifié après la BDL?

Q3: Est-ce que la déficience en FXR dans la cellule bêta pancréatique modifie le pool d'ABs dans le pancréas?

Q4: Est-ce que la déficience en FXR dans la cellule bêta pancréatique modifie le pool d'ABs dans le pancréas après BDL?

Pour répondre à ces questions, nous avons appliqué le protocole de BDL à un deuxième lot de souris et nous avons analysé la composition du pool des ABs plasmatiques et pancréatiques des souris FXRKO- β cell et des contrôles Cre en condition BDL et Sham (**Figure 65**). Plus particulièrement, 8 souris FXRKO- β cell et 8 souris contrôle Cre ont été opérées selon la procédure de BDL (n=4 par génotype) ou Sham (n=4 par génotype) (souris mâles, 21 semaines d'âge). Les ABs plasmatiques totaux ont été dosés par la méthode enzymatique (Diazyme Total Bile Acids Assay) sur du sang prélevé à la veine caudale 6 heures et 24 heures après l'opération, et l'augmentation des ABs a été vérifiée pour valider la BDL. Les souris ont été sacrifiées 24 heures après l'opération, après 5 heures de jeûne. Nous

avons prélevé du sang retro-orbital pour l'analyse de la composition du pool des ABs circulants (ce qui demande des quantités de plasma plus grandes que un dosage enzymatique). Le pancréas a été prélevé après perfusion intracardiaque avec une solution saline physiologique (NaCl 0.9%), appliquée pour priver l'organe du sang circulant et n'analyser que les ABs tissulaires.

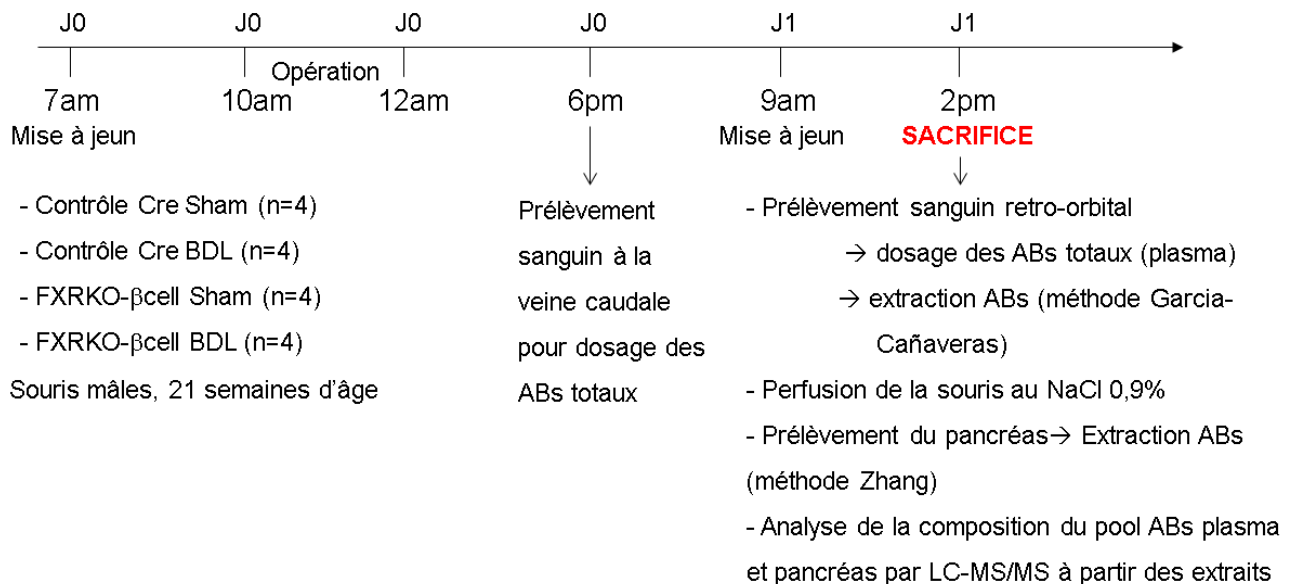


Figure 65. Protocole expérimental pour la procédure de BDL pour l'analyse de la composition du pool d'ABs dans le plasma et dans le pancréas de la souris FXRKO-βcell et contrôle Cre, BDL et Sham.

Les ABs plasmatiques ont été extraits selon le protocole publié par Garcia-Cañaveras (García-Cañaveras et al. 2012) (Annexe 2). Les ABs pancréatiques ont été extraits selon un protocole utilisé pour le foie (Zhang et Klaassen 2010) et appliqué au pancréas (Annexe 2). Les extraits de plasma et de tissus ont été dosés par LC-MS/MS en collaboration avec le Centre Universitaire de Mesuration et Analyse (CUMA, Lille), qui permet de quantifier 24 espèces d'ABs différents.

Les espèces glyco-conjugués, minoritaires chez la souris et le plus souvent indétectables, ne sont pas présentées dans les résultats. Leurs concentrations ont été prises en compte pour le calcul des concentrations totales (dernière colonnes des graphes).

Q1: Est-ce que le pool d'ABs pancréatique reflète la composition plasmatique?

Pour savoir si les ABs dans le pancréas reflètent la composition du pool plasmatique ou s'il y a une captation spécifique dans le pancréas qui pourrait impliquer une accumulation intracellulaire spécifiquement de certaines espèces d'AB (agonistes ou antagonistes de FXR),

nous avons comparé les profils des ABs du pancréas et du plasma des souris contrôle Cre (Sham) (**Figure 66**).

De manière intéressante, nous avons observé que le pancréas contient des ABs, dont la concentration est de l'ordre du pmol/mg de tissu, et que la distribution des espèces d'ABs dans le pancréas est différente de celle du plasma. En effet, dans le pancréas, les espèces tauro-conjuguées sont plus abondantes que les espèces libres (**Figure 66A**), avec un rapport des ABs tauro-conjugués/ABs libres de 39 fois et une abondance en TCA-T β MCA-T α MCA. Au contraire, dans le plasma, les ABs libres sont majoritaires (**Figure 66B**), avec un rapport ABs tauro-conjugués/ABs libres de 1,12. Le CA, β MCA, ω MCA et DCA sont les espèces majoritaires.

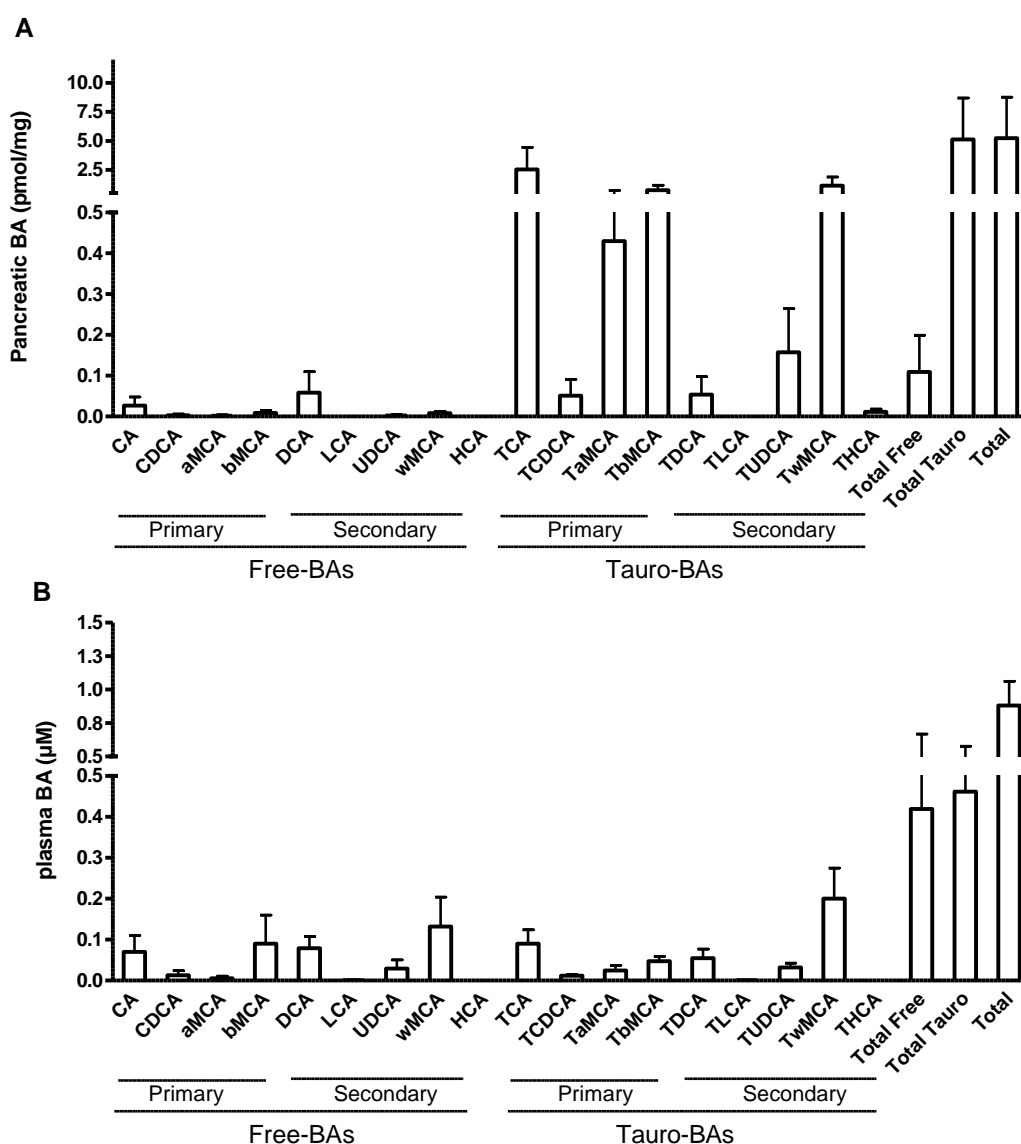


Figure 66. Composition du pool d'ABs dans le pancréas (n=4) (**A**) et dans le plasma (n=4) (**B**) de souris contrôle Cre Sham après un jeûne de 5 heures; Moyenne \pm SEM. Les graphes montrent les ABs libres (Free-BAs) et tauro-conjugués (Tauro-BAs), classés sur base de leur nature primaire (Primary) ou secondaire (Secondary). Les trois dernières colonnes sont la somme des espèces libres primaires et secondaires (colonne Total Free), des espèces tauro-conjuguées primaires et secondaires (Total Tauro) et de la totalité des espèces (glyco-conjugués inclus, colonne Total).

Ainsi, la composition du pool des ABs dans le pancréas diffère de celui du plasma.

Pour tester si cette différence dans le profil d'ABs pouvait être expliquée par une captation différente des ABs par le pancréas, l'expression des transporteurs connus dans le foie pour les ABs a été analysée à partir des ARN des îlots de ces souris. Tous les gènes analysés (*NTCP*, *OST α* , *OST β* , *I-BABP*, *ASBP*) ont produit un signal très faible ou indétectable en qPCR, ce qui semble indiquer l'absence d'expression des transporteurs classiques dans le pancréas. Le pancréas et les îlots pourraient exprimer des transporteurs qui leur seraient spécifiques.

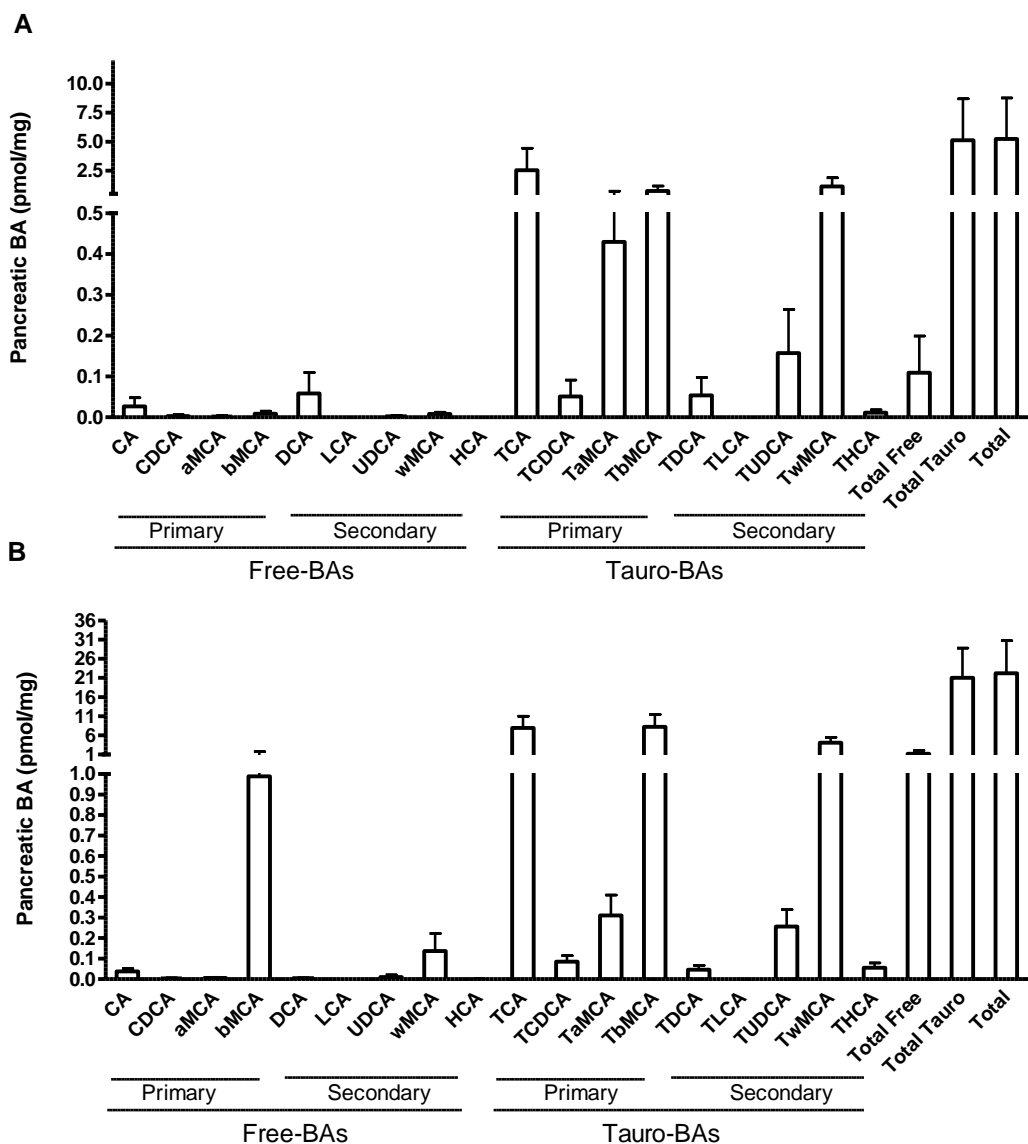


Figure 67. Composition du pool d'ABs dans le pancréas des souris contrôle Cre Sham (n=4) (A), contrôle Cre BDL (n=4) (B). Moyenne +/- SEM. Les graphes montrent les ABs libres (Free-BAs) et tauro-conjugués (Tauro-BAs), classés sur base de leur nature primaire (Primary) ou secondaire (Secondary). Les trois dernières colonnes sont la somme des espèces libres primaires et secondaires (colonne Total Free), des espèces tauro-conjuguées primaires et secondaires (Total Tauro) et de la totalité des espèces (glyco-conjugués inclus, colonne Total).

Q2: Est-ce que le pool d'ABs dans le pancréas est modifié après la BDL?

Le profil des ABs dans le pancréas a été analysé dans les souris contrôle Cre Sham et les souris contrôle Cre BDL. Les résultats sont montrés en **Figure 67**. La comparaison du profil des ABs pancréatiques de la souris contrôle Cre Sham (**Figure 67A**) et 24 heures après la BDL (**Figure 67B**) a permis d'apprécier l'augmentation attendue de la concentration totale d'AB pancréatiques (Fold change {ABs totaux pancréas souris contrôle Cre BDL/ ABs totaux pancreas souris contrôle Cre Sham} =4; 5 pmol/mg → 21 pmol/mg) suite à la chirurgie, avec une augmentation des espèces qui à l'état basal étaient les plus représentées (TCA, TβMCA, TωMCA) et le βMCA (**Figure 67B**).

Ainsi, le pool des ABs pancréatiques est augmenté après la BDL.

Q3: Est-ce que la déficience en FXR dans la cellule bêta pancréatique modifie le pool d'ABs dans le pancréas?

Pour répondre à cette question nous avons comparé la composition du pool des ABs dans le pancreas de la souris FXRKO-βcell Sham (**FIGURE 68A**) avec celui de la souris contrôle Cre Sham (**FIGURE 68B**).

Nous observons que la concentration total des ABs est comparable entre les deux groupes, comme aussi celle des espèces tauro-conjuguées et celle des espèces libres (la différence n'est pas statistiquement significative). Le profil des espèces individuelles est le même entre les deux génotypes, même si le pancréas de la souris FXRKO-βcell Sham semble être plus riche en CA par rapport à la souris contrôle Cre Sham, différence pas statistiquement significative.

Cette comparaison nous a permis de conclure que **l'invalidation de FXR dans la cellule bêta pancréatique n'a pas de répercussions sur la composition du pool d'ABs dans le pancréas.**

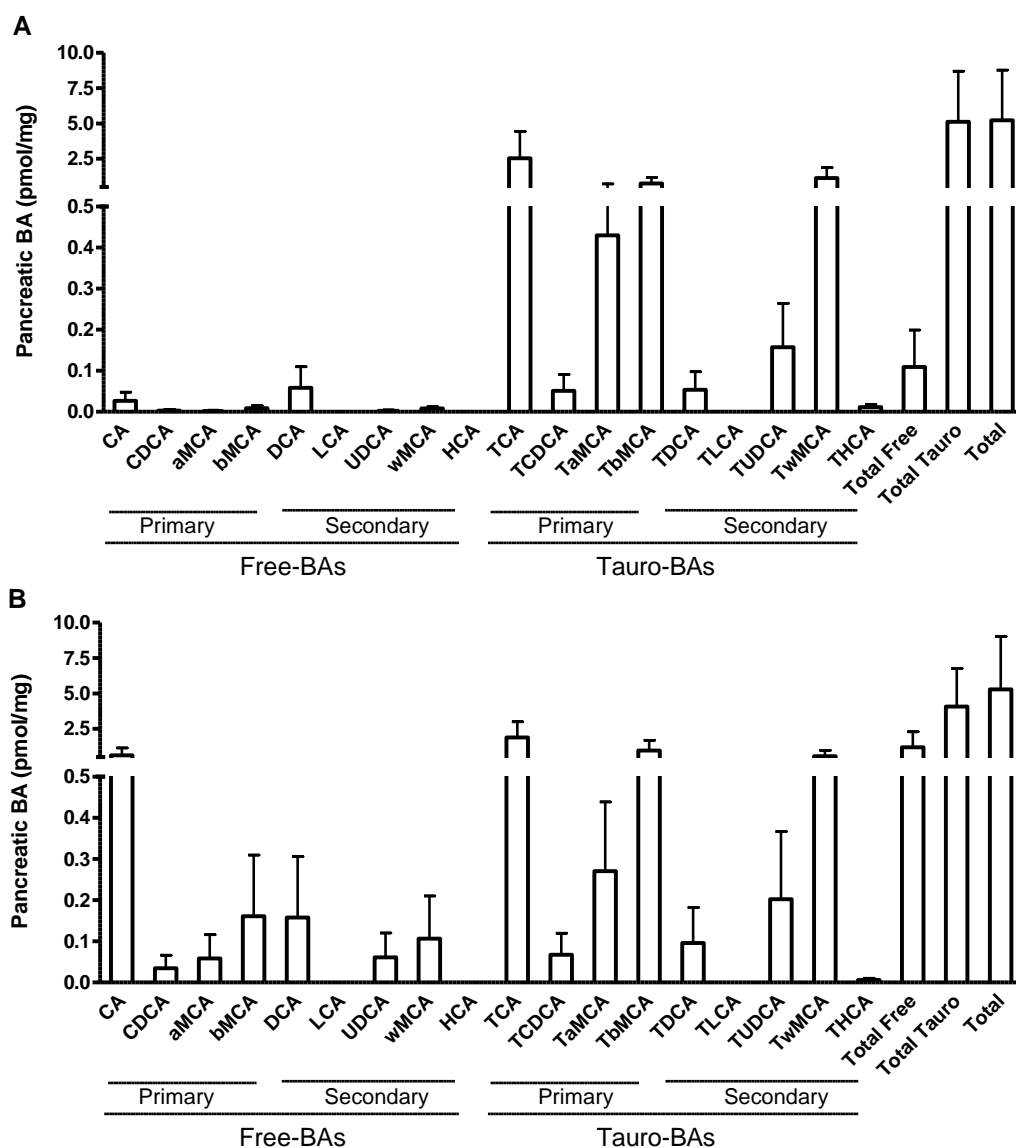


Figure 68. Composition du pool d'AB dans le pancréas de la souris contrôle Cre Sham (n=4) (A) et de la souris FXRKO- β cell Sham (n=4) (B). Moyenne \pm SEM. Les graphes montrent les ABs libres (Free-BAs) et tauro-conjugués (Tauro-BAs), classés sur base de leur nature primaire (Primary) ou secondaire (Secondary). Les trois dernières colonnes sont la somme des espèces libres primaires et secondaires (colonne Total Free), des espèces tauro-conjuguées primaires et secondaires (Total Tauro) et de la totalité des espèces (glyco-conjugués inclus, colonne Total).

Q4: Est-ce que la déficience en FXR dans la cellule bêta pancréatique modifie le pool d'ABs dans le pancréas après BDL?

Pour évaluer si l'invalidation de FXR dans la cellule bêta pancréatique pouvait avoir un impact sur la composition du pool d'ABs dans le pancréas dans des conditions d'augmentation massive des ligands de FXR, nous avons comparé le pool d'ABs pancréatiques de la souris contrôle Cre (**Figure 69A**) à celui de la souris FXRKO- β cell après BDL (**Figure 69B**). Nous n'avons observé aucune différence de composition.

Ainsi, l'invalidation de FXR dans la cellule bêta n'influence pas la composition des ABs dans le pancréas, ni sa manière de répondre à l'augmentation massive des ABs.

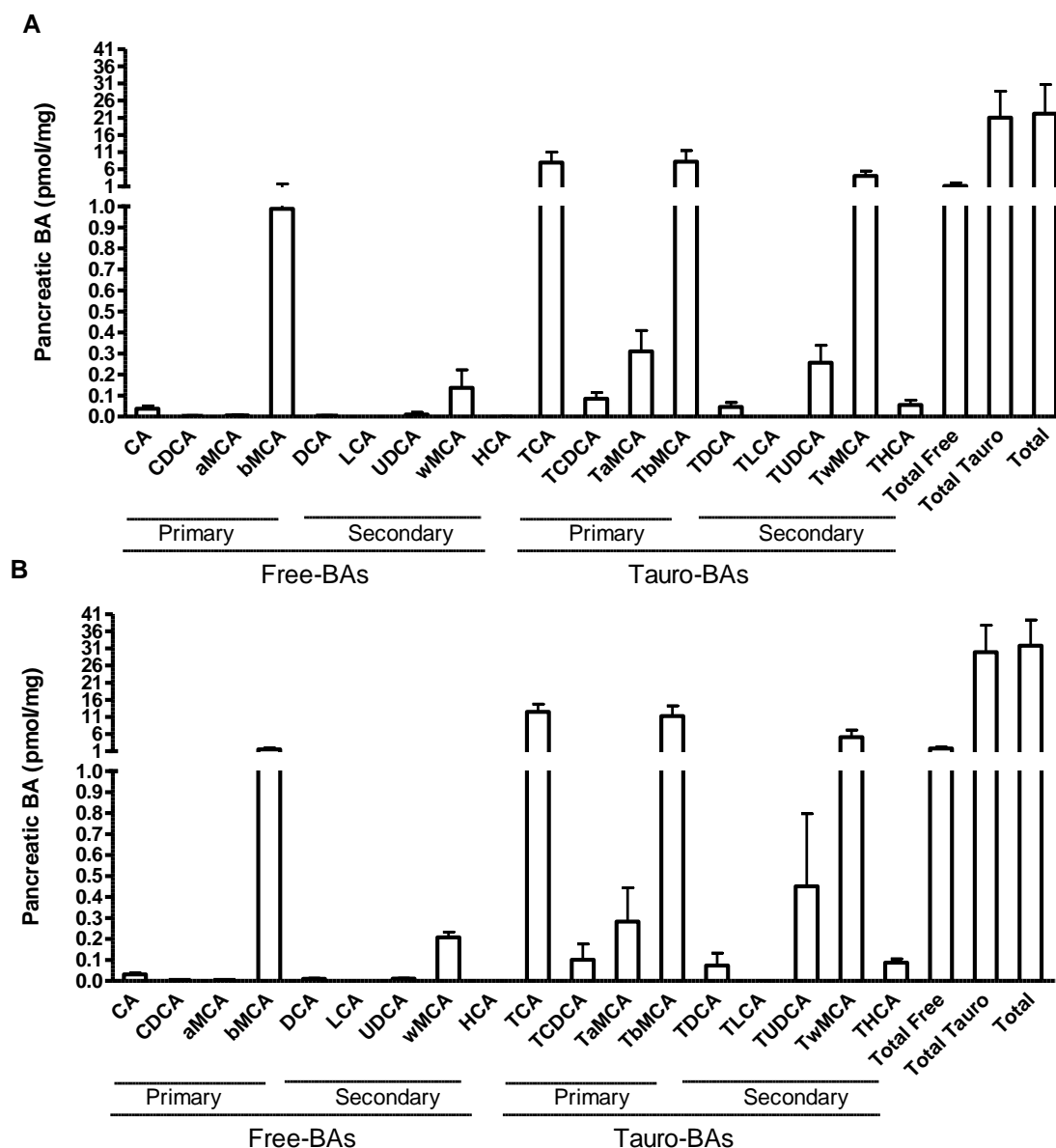


Figure 69. Composition du pool d'ABs 24 heures après la BDL dans le pancréas de la souris contrôle Cre (n=4) (A) et de la souris FXRKO-βcell (n=4) (B). Moyenne +/- SEM. Les graphes montrent les ABs libres (Free-BAs) et tauro-conjugués (Tauro-BAs), classés sur base de leur nature primaire (Primary) ou secondaire (Secondary). Les trois dernières colonnes sont la somme des espèces libres primaires et secondaires (colonne Total Free), des espèces tauro-conjuguées primaires et secondaires (Total Tauro) et de la totalité des espèces (glyco-conjugués inclus, colonne Total).

L'avantage de connaître la composition du pool pancréatique après BDL est que, en supposant que le profil observé reflète celui des îlots, il n'y a pas de différences de composition du pool d'ABs pancréatiques d'une souris contrôle Cre à une souris FXRKO-βcell. Ainsi, les différences transcriptomiques observées (§3.2.3.2.3) sont bien dues à l'absence de FXR et non pas dues à une différence de quantité de ligands activateurs. Par

contre, comme il a été précisé, le dosage étant fait sur le pancréas entier, nous n'avons pas la certitude que les îlots présentent le même profil. Si c'était le cas, on remarque qu'après BDL on a une augmentation dans les espèces à la fois agonistes et antagonistes de FXR (**Figure 69**), ce qui ne nous permet pas de conclure sur le lien entre augmentation des ABs et activation ou plutôt répression de l'activité de FXR dans l'îlot en condition de BDL.

4. Discussion et perspectives

L'importance de FXR dans la régulation du métabolisme du glucose est établie depuis plusieurs années. Le maintien du contrôle sur l'homéostasie du glucose se joue principalement entre la capacité hépatique de stocker ou de libérer les réserves énergétiques en fonction des besoins de l'organisme, la capacité périphérique d'utiliser le glucose, et la capacité du pancréas à répondre de manière appropriée aux variations des concentrations plasmatiques de glucose, avec la production d'hormones agissant sur le foie et les tissus périphériques, l'ensemble associé à la communication neuro-hormonale et le contrôle du SNC.

La présence de FXR dans le pancréas, et précisément dans la cellule bêta pancréatique, a été prouvée il y a quelques années, et de nombreuses données sont en faveur de sa participation à la régulation de la production de l'insuline. Néanmoins, au cours de mes travaux de thèse, j'ai rencontré des difficultés à reproduire ces résultats à la fois *in vitro* dans la lignée cellulaire, et *in vivo* dans le modèle murin de déficience de FXR β cell spécifique. Ces résultats laissent supposer des difficultés techniques plutôt qu'une contradiction avec la littérature. Il est possible que l'action de FXR dans la cellule bêta ait des effets très légers sur l'homéostasie du glucose *in vivo*, ainsi les différences des paramètres comme la glycémie et l'insulinémie dans des groupes d'animaux différents, pourraient être facilement masquées par la variabilité inter-souris. Cela pourrait justifier la difficulté à obtenir un résultat de manière reproductible et la variabilité des résultats d'un lot de souris à l'autre. De toute manière, nous avons fait tout ce qui était en notre pouvoir pour limiter au maximum ces inconvénients: stratégie de croisement pour avoir la souris invalidée et ses contrôles sur même fond génétique, élevage de grandes dimensions avec un grand nombre de couples pour avoir dans chaque groupe un effectif d'au moins 10 souris, même parents d'origine pour les différents lots de souris.

Pour des raisons techniques, les taux de recombinaison du gène de FXR au niveau bêta cell ne peuvent pas être systématiquement vérifiés pour chaque souris incluse dans l'étude. On

présume que la présence de la Cre et des allèles flox au sein d'une même souris conduit à la recombinaison prévue. Cependant, l'inactivation de FXR pourrait s'être faite dans un pourcentage de cellules différent de souris à souris, à l'origine de la variabilité inter-souris.

FXR pourrait avoir une fonction majoritaire dans un processus dynamique ou d'adaptation difficile à identifier pour son caractère transitoire.

L'ensemble des limitations du modèle RIP-Cre dont nous avons pris conscience pendant le développement du projet montrent que les modèles murins tissus spécifiques ne sont pas l'instrument plus approprié/efficace dans l'étude de fonctions subtiles comme celle que FXR peut avoir dans la cellule bêta. Pour continuer l'étude du rôle de FXR dans la cellule bêta et s'affranchir de la variabilité qui peut accompagner l'utilisation du système Cre-LoxP, une possibilité est celle de restaurer l'expression de FXR dans la cellule bêta dans le modèle de knock-out totale de FXR, ce qui peut être obtenu par transfection avec un adénovirus à tropisme spécifique pour la cellule bêta (AAV8, Wang et al. 2006c; Gaddy et al. 2012). Cette stratégie offre aussi l'avantage de demander beaucoup moins de temps pour la production du modèle, si le knock-out total est disponible, par rapport au système Cre-LoxP.

Même si identifier un phénotype clair n'a pas été mis en évidence dans notre modèle, les analyses transcriptionnelles de l'ensemble de ce travail ont permis d'ouvrir des pistes qui méritent d'être approfondies:

- L'identification de nombreuses lincRNAs, identifiés dans l'analyse du transcriptome de l'îlot de la souris FXRKO: la fonction précise de chaque lincRNA reste à caractériser. L'étude de la fonction et des cibles d'un (ou des) lincRNA les plus fortement dérégulés dans les îlots de la souris FXRKO, associée à la validation de sa (leur) régulation par FXR via l'analyse après siFXR dans des modèles cellulaires, pourrait amener à la compréhension du rôle de FXR dans la fonction de la cellule bêta.

- L'identification des miRNA associés à la condition de diabète, mis en évidence par l'analyse du transcriptome de l'îlot de la souris FXRKO- β cell après BDL: en première chose, il faudrait valider la régulation par FXR de ces miRNA, ce qui pourrait être fait in vitro dans la lignée cellulaire Min6 (ou dans des lignées bêta cellulaires de rat, INS-1 ou β TC6), par l'analyse de leur expression après l'inactivation de FXR par siRNA. Une fois établie la régulation par FXR, il faudrait étudier le rôle de ces miRNA dans la cellule bêta, par inactivation ou surexpression, d'une part en évaluant leur impact sur les fonctions de la cellule bêta (sécrétion d'insuline en réponse au glucose, prolifération cellulaire, mort cellulaire) et d'autre côté en analysant les gènes cibles de ces miRNA en relation avec les fonctions cellulaires analysées.

PARTIE 2

INFLUENCE DE LA CHIRURGIE
BARIATRIQUE DE TYPE ROUX-EN-Y
GASTRIC BYPASS SUR LE CYCLE
ENTERO-HEPATIQUE DES ACIDES
BILIAIRES ET LEURS
CONCENTRATIONS SYSTEMIQUES

Influence de la chirurgie bariatrique de type Roux-en-Y gastrique bypass sur le cycle entero-hépatique des acides biliaires et leurs concentrations systemiques

1. Contexte scientifique

1.1. La technique de Roux-en-Y Gastric Bypass

Le Roux-en-Y Gastric Bypass (RYGB) est une des techniques chirurgicales les plus employées pour induire une perte de poids substantielle et stable chez les patients obèses.

Dans cette technique, une petite poche (poche gastrique, **Figure 70**) est créée dans la partie de l'estomac en continuation de l'œsophage, en générant ce qui devient le nouvel estomac du patient. La poche gastrique est directement connectée à la portion médiane de l'intestin grêle, en excluant ("bypassing") le reste de l'estomac et la portion initiale de l'intestin grêle. Aucune partie de l'intestin ou de l'estomac n'est enlevée pendant l'opération. La partie d'intestin exclue (duodénum) est anastomosée au jéjunum (la localisation de l'anastomose intestinale varie en fonction de la technique de RYGB). Ainsi, le bol alimentaire passe de la poche gastrique proximale dans le jéjunum (anse alimentaire, **Figure 70**). Les sécrétions digestives de la partie d'estomac exclus et de l'intestin proximal sont déversées dans l'anse commune par l'anse biliopancréatique, où elles sont mélangées aux nutriments provenant de l'anse alimentaire (**Figure 70**).

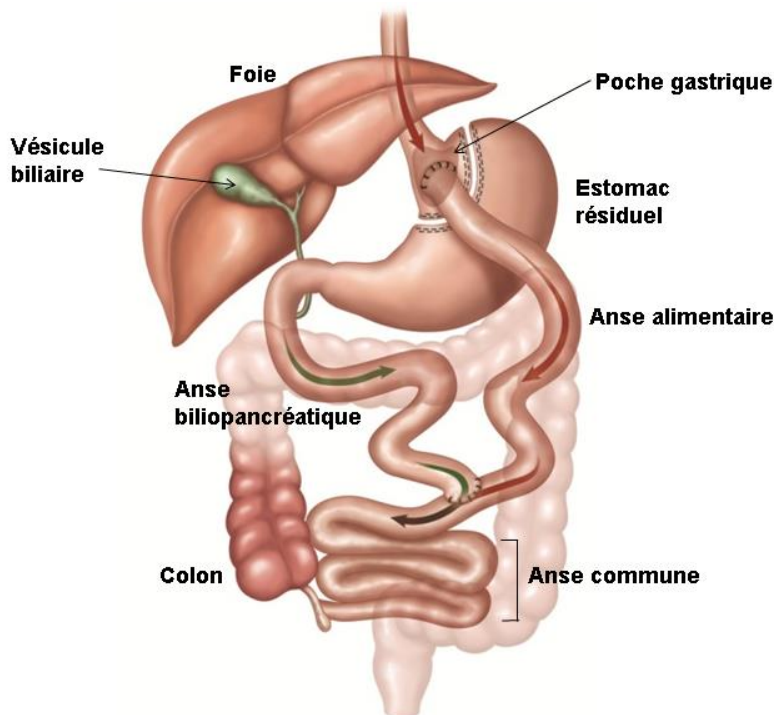


Figure 70. Représentation du bypass gastrique de type Roux-en-Y ; rouge: parcours du bol alimentaire, vert: parcours des sécrétions digestives (bile et jus pancréatique) (Adaptée de *Johnson and Johnson and Ethicon Endo-Surgery (Europe- www.ethicon.com/www.uwmedicine.org)*)

1.2. Les effets métaboliques du Roux-en-Y Gastric Bypass

Cette technique, employée depuis ~50 ans chez les patients obèses, pour la plupart diabétiques, amène à une perte de poids rapide et durable, avec une diminution de la masse corporelle de plus de 25% dans les 5 ans après le RYGB (Caiazzo et al. 2014). Les effets majeurs sur la perte de poids sont dus à la diminution de la prise alimentaire induite par la nouvelle connexion entre poche gastrique et intestin (la sensation de satiété est atteinte avec des quantités moindres de nourriture) et par la modification de la façon dont les nutriments sont digérés. De plus, ce qui rend cette pratique encore plus intéressante, est le fait qu'elle est suivie d'une amélioration métabolique avant même la diminution de la masse corporelle (Pories et al. 1995; Wickremesekera et al. 2005), indiquant que des mécanismes indépendants de la perte de poids sont responsables des effets métaboliques bénéfiques du RYGB.

Le RYGB améliore la tolérance au glucose: une meta-analyse à partir de 621 études conduites entre 1990 et 2006 a montré une rémission du diabète chez environ 80% des patients obèses diabétiques, avec des améliorations rapides dans le contrôle de la glycémie, la fonction pancréatique, la production de GLP-1 et la sensibilité à l'insuline dès la première semaine qui suit le RYGB (Pories et al. 1995; Wickremesekera et al. 2005; Buchwald et al. 2009), suggérant un rôle mécanistique important pour l'ensemble des changements qui suivent le RYGB dans la résolution du DT2 (Pories et al. 1995; Reed et al. 2011; Lindqvist et al. 2013). Cette amélioration est même plus efficace que le traitement du diabète par thérapie conventionnelle, avec un pourcentage de rémission de 38-75% pour le RYGB, contre 0-12% des thérapies conventionnelles (Tailleux et al. 2015).

Le RYGB améliore les dyslipidémies: plusieurs études de suivi des patients dans le temps rapportent une amélioration voire une résolution des dyslipidémies chez les patients opérés. Une revue regroupant les résultats des études avec un suivi des patients d'environ 2 ans après RYGB, montre une diminution de LDL-C et TG et une augmentation des HDL-C chez 80% des patients (Vest et al. 2012). Une autre revue qui considère les études avec un de suivi des patients au-delà de 2 ans rapporte une amélioration de ces paramètres chez 60% des patients (Puzziferri et al. 2014). Des résultats similaires sont montrés dans l'étude *Longitudinal Assesment of Bariatric Surgery 2*, avec une amélioration des dyslipidémies chez 62% des patients 3 ans après RYGB (Courcoulas et al. 2013), et l'efficacité de ces améliorations est confirmée 6 ans après l'intervention (Adams et al. 2012). De plus, le RYGB s'est montré efficace aussi dans la réduction des LDLox, avec une diminution de 25% des LDLox plasmatiques un an après l'opération (Julve et al. 2014).

De manière intéressante, le RYGB est efficace pour traiter la NAFLD et la NASH, avec une complète résolution de NASH chez 50-90% des patients selon l'étude (analyse histologiques ou sur biopsie) et une amélioration des paramètres de NAFLD (Mummadi et al. 2008; Mathurin et al. 2009; Chavez-Tapia et al. 2010; Caiazzo et al. 2014; Lassailly et al. 2015).

D'autres effets bénéfiques du RYGB: le RYGB a des effets positifs sur l'apnée du sommeil (Ashrafian et al. 2012; Dixon et al. 2012) et le cancer (Ashrafian et al. 2011).

Le RYGB réduit les facteurs de risque cardiovasculaire et la mortalité toutes causes confondues (Arterburn et al. 2015; Eliasson et al. 2015; Tailleux et al. 2015).

1.3. Les mécanismes à l'origine des effets métaboliques bénéfiques du RYGB

La compréhension des mécanismes moléculaires à la base des améliorations métaboliques du RYGB serait utile pour pouvoir reproduire ces effets sans nécessairement passer par des actes lourds et invasifs comme la chirurgie, ce qui pourrait fournir des nouvelles cibles thérapeutiques pour le traitement de l'obésité et du diabète. L'ensemble des hypothèses qui ont été émises pour expliquer les effets métaboliques du RYGB sont regroupées sous l'acronyme **BRAVE**, pour : **B**ile flow alteration, **R**eduction of gastric size, **A**natomical gut rearrangement and altered flow of nutrients, **V**agal manipulation and **E**nteric gut hormone modulation (Ashrafian et al. 2010). Comme précédemment dit, les changements anatomiques induits par la restriction du volume de l'estomac et la malabsorption intestinale sont directement responsables de la perte de poids. Ainsi, ces altérations déterminent des changements métaboliques tels que l'augmentation de la production d'**hormones intestinales (GLP-1, FGF19)**, le changement de la **flore bactérienne** et l'altération qualitative et quantitative du pool d'**ABs** (qui se traduit par une variation des voies de signalisation de FXR et TGR5). L'ensemble de ces variations contribue à déterminer les améliorations métaboliques qui précèdent la perte de poids, d'une façon qui pourrait être synergique et/ou causale entre eux.

1.3.1. Les acteurs potentiels de l'amélioration métabolique:

Les hormones intestinales: les niveaux plasmatiques post-prandiaux de **GLP-1** sont augmentés après le RYGB dans des modèles animaux (Verhaeghe et al. 2014; Osto et al. 2015) et chez l'Homme (Umeda et al. 2011; Dirksen et al. 2013). Outre les effets positifs sur le métabolisme du glucose (amélioration de la sensibilité à l'insuline et de la fonction pancréatique), il a été prouvé que l'augmentation de GLP-1 après le RYGB améliore la fonction endothéliale des HDL, avec la restauration de leurs effets anti-inflammatoires, anti-

apoptotiques et antioxydants (Osto et al. 2015). Cependant, ces variations ne semblent pas être les seules responsables des effets bénéfiques de la chirurgie, puisque l'inactivation génétique du récepteur au GLP-1 ne prévient pas les améliorations glycémiques (Mokadem et al. 2014).

Outre GLP-1, d'autres hormones intestinales augmentent rapidement après RYGB (PYY, oxyntomoduline) avec leurs effets anorexigènes et l'induction de la satiété (Wu et al. 2013a).

Une autre hormone intestinale qui augmente après le RYGB est **FGF19** (Dutia et al. 2015; Jørgensen et al. 2015), effet qui pourrait être expliqué par l'activation de FXR intestinal par les ABs. FGF19 a des effets favorables sur le profil glycémique, lipidique et les lipoprotéines. En effet, FGF19 diminue la glycémie post-prandiale par son action dans le foie, où il inhibe la néoglucogenèse et induit la glycogénogenèse, sans stimuler la lipogenèse (Kir et al. 2011), et il induit une diminution de la glycémie de manière insulino-indépendante dans le cerveau (Morton et al. 2013). Dans le foie, il réduit le contenu en lipides, en cholestérol total et en TG, et protège du NAFLD/NASH (Liu et al. 2015; Rysz et al. 2015). L'administration intrapéritonéale de FGF19 diminue l'expression de l'apo (a) (une lipoprotéine très athérogène) chez la souris transgénique pour apo(a) humain (Chennamsetty et al. 2012), comme aussi l'administration chronique de FGF19 diminue la concentration de lipides circulantes chez la souris (Fu et al. 2004). FGF19 régule également l'expression hépatique de PON1 (paraoxonase 1) (Gutierrez et al. 2006), l'un des composants anti-athérosclérotique principaux des HDL.

La flore intestinale: Un autre candidat pour expliquer les améliorations métaboliques du RYGB est la flore bactérienne (Sweeney et Morton 2013). En effet, la seule transplantation de la flore intestinale de la souris opérée de RYGB à la souris "germ-free" est suffisante pour induire une perte de poids et une amélioration métabolique, avec des changements dans la lipogenèse, la prise alimentaire et la dépense énergétique. Cet effet a été attribué à la variation dans la production d'acides gras à chaîne courte opérée par les enzymes bactériens (Liou et al. 2013). Chez le rat, les changements de la flore bactérienne après RYGB sont similaires à ceux qui suivent la perte de poids obtenue avec un régime contrôlé (Osto et al. 2013).

Les acides biliaires: Une autre explication pour les améliorations métaboliques met en jeu l'altération du pool des ABs. Il est connu que la concentration plasmatique des ABs augmente après le RYGB, comme montré chez l'Homme (Patti et al. 2009; Steinert et al. 2013; Werling et al. 2013; De Giorgi et al. 2014; Dutia et al. 2015) et chez le rat (Kohli et al. 2013a; Bhutta et al. 2015; Osto et al. 2015). Chez l'Homme, la variation quantitative des ABs

totaux à jeun plus d'un mois après l'opération a été rapportée à la fois chez des patients obèses diabétiques (Gerhard et al. 2013; Dutia et al. 2015; Jørgensen et al. 2015) et chez des patients obèses non-diabétiques (Nakatani et al. 2009; Patti et al. 2009; Jansen et al. 2011; Pournaras et al. 2012; Simonen et al. 2012; Kohli et al. 2013b; Werling et al. 2013; De Giorgi et al. 2014; Scholtz et al. 2014). Outre la variation quantitative, le RYGB induit une modification qualitative de la composition du pool d'ABs. En effet, des analyses conduites chez l'Homme sur des périodes allant de 5 mois à 4 ans après le RYGB, montrent que le CA, le DCA et les ABs tauro- et glyco-conjugués sont augmentés (Patti et al. 2009; Ahmad et al. 2013; Gerhard et al. 2013; Werling et al. 2013), même si une étude ne confirme pas les différences en tauro-conjugués un an après RYGB (Simonen et al. 2012).

Puisque le sujet de mon travail de thèse porte sur l'étude et la compréhension des variations des ABs, ce thème sera plus particulièrement développé dans le prochain paragraphe.

1.3.2. Les acides biliaires comme acteurs de l'amélioration métabolique après le RYGB

L'implication des ABs dans les améliorations métaboliques induites par la chirurgie bariatrique est un thème d'étude vif et débattu, avec des éléments qui conduisent à des hypothèses contradictoires. En effet, chez des patients obèses non-diabétiques, les concentrations systémiques d'ABs totaux à jeun diminuent rapidement dans la première semaine après le RYGB (Steinert et al. 2013; Jørgensen et al. 2015), puis augmentent quelques mois après l'intervention. Ces résultats semblent indiquer que les ABs ne seraient pas responsables des améliorations métaboliques précoces (car leur augmentation n'a lieu que quelque mois après le RYGB, quand les changements hormonaux et métaboliques ont déjà eu lieu).

Cependant, une étude récente chez le rat montre que la modification du chemin intestinal de la bile, avec diversion directe du canal biliaire pre-pancréatique dans l'iléon médian ou dans le jéjunum médian, est suffisante pour induire l'augmentation des ABs plasmatiques et les améliorations du métabolisme du glucose, paramètres réversibles avec le traitement par un BAS, ce qui suggère que les ABs sont des acteurs majeurs dans les effets bénéfiques du RYGB (Goncalves et al. 2015). Ce résultat est conforté par une étude similaire chez la souris, qui montre aussi des améliorations métaboliques semblables à celles induites par le RYGB après la diversion du canal biliaire à l'iléon (Flynn et al. 2015). De manière intéressante, ces résultats ont été confirmés chez l'Homme, chez des patients soumis à la

technique chirurgicale de diversion bilio-pancréatique, qui induit aussi des effets métaboliques bénéfiques majeurs, et qui est associée à l'altération de l'homéostasie des ABs (Ferrannini et al. 2015). Toutefois, la diversion bilio-pancréatique a un impact sur le métabolisme des ABs différent de celui du RYGB, avec l'augmentation de leur synthèse hépatique contre une diminution pour le RYGB, et l'augmentation plasmatique des espèces libres contre l'augmentation des espèces conjuguées pour le RYGB (Ferrannini et al. 2015).

L'ensemble de ces observations est donc en faveur de la participation des ABs aux améliorations du métabolisme après RYGB. De plus, outre le RYGB, d'autres procédures de chirurgie bariatrique qui perturbent la circulation entéro-hépatique des ABs sont associées à des changements dans l'homéostasie des ABs. En effet, la gastrectomie verticale chemisée ou "sleeve" (VSG), technique bariatrique qui enlève une grande partie de l'estomac et qui induit des effets métaboliques semblables au RYGB, augmente les concentrations d'ABs plasmatiques dans les modèles animaux (Stefater et al. 2011; Cummings et al. 2012; Ryan et al. 2014) et chez l'Homme (Steinert et al. 2013). De plus, les niveaux d'ABs plasmatiques augmentent aussi après la chirurgie d'interposition iléale (IT), qui consiste en une inversion des parties initiales et finales de l'intestin grêle chez le rongeur (Cummings et al. 2010, 2013; Kohli et al. 2010; Mencarelli et al. 2013). L'utilisation de ces différentes techniques de manipulation de l'anatomie de l'intestin permet d'obtenir des informations complémentaires pour la compréhension des mécanismes par lesquels les ABs contribuent à l'amélioration métabolique après le RYGB.

Puisque les ABs ont une action sur la régulation du métabolisme via leurs récepteurs FXR et TGR5, les effets métaboliques du RYGB pourraient être au moins en partie dépendants de l'activation des récepteurs suite au changement du pool des ABs. En effet, il a été récemment montré que FXR est impliqué dans les améliorations métaboliques chez la souris soumise à la VSG, qui augmente le pool d'ABs et les changements de la flore intestinale de manière FXR dépendante (Ryan et al. 2014). De plus, les variations de la flore bactérienne associées au RYGB pourraient aussi avoir un impact sur le métabolisme *via* FXR, comme il a été montré chez la souris, où la modification de la composition du pool d'ABs par les enzymes de la flore intestinale se traduit dans une variation de l'activation des voies de signalisation de FXR, suite à la variation du rapport des ABs agonistes/antagonistes de FXR (Sayin et al. 2013). Même si les mécanismes sous-jacents de l'activation des récepteurs aux ABs après le RYGB sont encore à éclaircir, les effets que l'augmentation des ABs après RYGB pourrait avoir *via* FXR et TGR5 ont été regroupés sous le nom de "SLIMMER effect" (Penney et al. 2015) pour effets sur Satiety, Lipid and cholesterol metabolism,

Incretins and glucose homeostasis, energy Metabolism, gut Microbiota and Endoplasmic Reticulum stress (Penney et al. 2015).

2. Partie I

2.1. Résultats Partie I

L'observation que la chirurgie bariatrique induit des améliorations métaboliques précédant la perte de poids, a suscité un fort intérêt pour la compréhension des mécanismes sous-jacents ces améliorations. Différents modèles animaux de chirurgie bariatrique ont été développés pour reproduire les effets métaboliques observés chez l'Homme et en étudier les mécanismes, et, en particulier, expliquer comment les altérations dans l'homéostasie des ABs se mettent en place et participent aux changements métaboliques après la chirurgie. Toutefois, bien que les modèles animaux constituent un outil d'analyse essentiel, il est important de ne pas négliger les différences espèce-spécifiques qui peuvent se répercuter sur l'analyse, et donc nécessitent une attention particulière quand les conclusions d'une étude préclinique veulent être transposées à l'Homme. C'est le cas pour les analyses concernant les ABs, qui, comme discuté dans le chapitre 2 de l'introduction, présentent des caractéristiques de composition particulières en fonction de l'espèce animale. En particulier, il est important de noter que les différences dans la composition du pool d'ABs se traduisent en activation différente de FXR et TGR5, aussi par la présence d'espèces d'ABs agonistes ou antagonistes des deux récepteurs dans une espèce animale, ce qui ne permet pas de transposer des conclusions à l'Homme sans précautions.

Pour concrétiser ces réflexions et pour fournir un instrument indicatif d'évaluation dans les études sur les ABs, j'ai comparé les profils d'ABs plasmatiques à jeun avant et après RYGB chez l'Homme et dans deux modèles précliniques, le rat et le minipig, dans le but d'évaluer les similarités et les différences de ces modèles concernant la composition du pool des ABs et des effets du RYGB.

Cette analyse comparative a été réalisée grâce à la collaboration du Dr. Elena Osto (Center for Molecular Cardiology, University of Zurich), qui nous a fourni le plasma de rats opérés de RYGB et leurs contrôles Sham, et à la collaboration du Pr. François Pattou (INSERM U1190, Lille), qui nous a permis d'avoir accès aux échantillons de plasma de patients sélectionnés de la banque ABOS (Atlas for Severe Obesity – ClinicalTrials.gov; NCT01129297) et des "minipig" opérés de RYGB. Les profils d'ABs ont été déterminés par chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS), grâce à la technique validée au CUMA (Centre Universitaire de Mesures et

d'Analyses) de Lille. Les résultats ont fait l'objet d'une publication actuellement en révision dans le *International Journal of Obesity*.

2.2. Discussion Partie I

Ce travail nous a permis d'observer et confirmer que, indépendamment de l'espèce animale, le RYGB induit une augmentation de la concentration d'ABs totaux circulants. De manière intéressante, cette augmentation est due aux espèces libres du CA, CDCA et du DCA chez l'Homme, comme attendu, mais aussi chez le rat et le minipig, ce qui constitue un avantage pour ces deux modèles pour l'étude des effets du RYGB sur le métabolisme via les ABs.

- **RAT:** Le résultat confirme les observations publiées par Bhutta et al. (Bhutta et al. 2015). D'autre part, nous avons aussi pu remarquer que chez le rat il y a une forte augmentation des espèces tauro-conjuguées, fortement représentées déjà avant l'opération et pas présents chez l'Homme. Ceci constitue un inconvénient dans l'utilisation du rat comme modèle, car parmi les espèces tauro-conjuguées, on trouve des ABs antagonistes de FXR, ce qui conduirait à un état d'activation de FXR chez le rongeur différent de chez l'humain, avec un effet biologique différent.

- **MINIPIG:** La composition en ABs plasmatiques chez le minipig est publiée pour la première fois dans notre travail. Il présente des niveaux beaucoup plus faibles de CA et DCA, et les espèces le plus abondantes sont plutôt le HCA et l'UDCA, minoritaires chez l'Homme.

En conclusion, les deux modèles présentent des différences avec l'Homme qui rendent impossible une transposition directe des résultats du modèle préclinique à l'Homme. En même temps, ils ont aussi des forts éléments de similarités qui confirment l'intérêt et l'utilité de ces modèles pour les études sur les effets du RYGB sur les ABs. Cet aspect confirme les modèles précliniques comme un élément fondamental dans la recherche translationnelle pour l'apport conceptuel qui peuvent fournir à la compréhension de phénomènes globales. Cependant, il faut être conscients des limites et des différences inter-espèces, qui imposent certaines considérations avant la transposition à l'Homme des résultats générés dans un modèle animal.

Manuscrit 3: Influence of Roux-en-Y gastric bypass on plasma bile acid profiles: a comparative study between rats, pigs and humans

**Influence of Roux-en-Y gastric bypass on plasma bile acid profiles:
a comparative study between rats, pigs and humans**

Valeria Spinelli^{# 1, 2, 3, 4}, Fanny Lalloyer^{# 1, 2, 3, 4}, Grégory Baud^{3, 5}, Elena Osto⁶, Mostafa Kouach⁷, Mehdi Daoudi^{3, 5}, Emmanuelle Vallez^{1, 2, 3, 4}, Violeta Raverdy^{3, 5}, Jean-François Goossens⁷, Amandine Descat⁷, Thomas A. Lutz⁶, Sophie Lestavel^{1, 2, 3, 4}, Bart Staels*^{£, 1, 2, 3, 4}, François Pattou^{£ 3, 5}, Anne Tailleux^{£ 1, 2, 3, 4}

¹ Univ Lille, U1011, EGID, F-59000 Lille, France

² Inserm, U1011, F-59000 Lille, France

³ CHU Lille, F-59000 Lille, France

⁴ Institut Pasteur de Lille, U1011, F-59000 Lille, France

⁵ Univ Lille, Inserm, UMR1190, EGID, F-59000 Lille, France

⁶ Centre for Molecular Cardiology, University of Zurich and University Heart Center, Cardiology, University Hospital Zurich, Switzerland

⁷ Centre Universitaire de Mesures et d'Analyses, Univ Lille, F-59000 Lille France

^{#, £} These authors equally contributed to the work

* Corresponding author:

Prof Bart STAELS

Institut Pasteur de Lille, 1 rue du professeur Calmette, BP245, 59019 LILLE - France

Tel : +33320877388 - Fax : +33320877360

e-mail : Bart.Staels@pasteur-lille.fr

The authors declare that they have no conflict of interest.

ABSTRACT

Background

Roux-en-Y gastric bypass (RYGBP) is the most widely used bariatric surgery procedure, which induces profound metabolic and physiological beneficial effects, such as substantial improvements in obesity, type 2 diabetes and their co-morbidities. Increasing evidence identifies bile acids (BAs) as signaling molecules which contribute to the metabolic improvement after RYGBP. However, how and to which extent BAs mediate the metabolic effects of RYGBP still remains unclear and requires mechanism of action studies using preclinical models. In this study, we compared plasma BA profiles before and after RYGBP in two animal models, rats and pigs, to humans to evaluate their translational potential.

Methods and Results

Plasma BAs were profiled in rats, pigs and humans by liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) before and after RYGBP. RYGBP increased baseline plasma total BA concentrations in humans and in the two animal models to a similar extent (~3-fold increase), despite differences in pre-surgery BA levels and profiles between the models. However, qualitatively, RYGBP differently affected individual plasma BA species, with similar increases in some free species (CA, CDCA, DCA), different increases in glyco-conjugated species depending on the model, and globally no increase in tauro-conjugated species whatever the model.

Conclusions

The tested animal models share similarities to humans in RYGBP-induced changes in BA profiles, which render them useful for mechanistic studies. However, they also present peculiar differences which may result in different signaling responses. Such differences need to be taken into account when translating results to humans.

INTRODUCTION

Obesity is a major public health problem worldwide, and recent studies report an increasing prevalence of overweight and obesity in the last decades.¹ Lifestyle interventions (healthy diet, behavior modification therapy and exercise) can be successful, even though a high rate of recidivism often occurs with individuals returning to or exceeding their previous weight. Morbid obesity can be treated with a limited number of medications, but the most effective intervention inducing a consistent weight loss is bariatric surgery (BS). BS consists in the restriction of food amount in the stomach and/or the anatomical reorganization of the gastrointestinal tract. Three main procedures are currently used: gastric banding, sleeve gastrectomy (VSG) and Roux-en-Y gastric bypass (RYGBP) surgery, which is nowadays considered as the gold standard. In addition to sustained and consistent weight loss (35-40% body weight loss from baseline),² RYGBP improves glucose control and induces remission of type 2 diabetes (T2D) in 80% of patients.³ This amelioration seems partially independent of weight loss, since it is usually already observed within the first week following the surgery,⁴ meaning that, beside its effects on food intake and absorption, surgery also induces complex signaling changes between endocrine tissues and peripheral organs, which can contribute to the metabolic ameliorations. In addition to improved glucose control, patients undergoing RYGBP display an improvement of non-alcoholic fatty liver diseases (NAFLD),^{5,6} hyperlipidemia⁷ and cardiovascular risk factors.⁸ Among the most investigated mechanisms explaining the improvement of metabolic homeostasis after RYGBP are increased secretion of insulin and the incretin hormone glucagon-like peptide 1 (GLP-1),⁹ increased production of gut hormones (PYY, oxyntomodulin, ghrelin) that suppress hunger, reduce appetite and induce satiation,¹⁰ and changes of the intestinal microbiota.¹¹ Interestingly, increasing evidence identifies bile acids (BAs) and their receptors as metabolic regulators of the BS-induced beneficial effects.^{12,13} However, how and to which extent BAs mediate the metabolic effects of RYGBP still remains unclear.

The pool of BAs is constituted of >20 different species. Primary BAs (cholic acid (CA) and chenodeoxycholic acid (CDCA) in man), are synthesized in the liver from cholesterol by the sequential actions of hepatic enzymes.^{14,15} CDCA is converted to α - and β -murocholic acid (α -MCA and β -MCA) in the murine liver. Primary BAs are secreted in bile as taurine- (mainly in rodents) or glycine- (mainly in humans) conjugates.¹⁶ After assisting in intestinal absorption of dietary fat and fat-soluble vitamins, most of the BAs are reabsorbed in the intestine and recirculate to the liver through a mechanism

called the enterohepatic circulation. Primary BAs are converted to secondary BAs by the gut microbiota. Thus, CA is converted to deoxycholic acid (DCA), CDCA to lithocholic acid (LCA), β -MCA to ω -MCA. In addition, CDCA can be converted in other species such as ursodeoxycholic acid (UDCA), hyocholic acid (HCA) and hyodeoxycholic acid (HDCA). ~95% of BAs are reabsorbed in the distal ileum and transported back to the liver through the portal vein, whereas only 5% are lost in the feces. Small, but measurable amounts of BAs escape uptake by the liver, appear in systemic blood and reach peripheral organs. Thus, the systemic BA pool is constituted of the primary and secondary BAs, in their free-, taurine- and glycine-conjugated forms. In addition to their role in dietary lipid absorption, BAs may influence metabolic homeostasis acting as signaling molecules in several metabolic organs. BAs are the natural ligands of the nuclear receptor Farnesoid-X-Receptor (FXR) and the membrane receptor TGR5 (encoded by GPBAR1),¹⁷ expressed in numerous metabolic tissues where they control lipid, glucose, and also BA metabolic pathways. As the different BA species differently activate the two receptors,¹⁷ qualitative and/or quantitative changes of the BA pool after RYGBP may impact glucose and lipid homeostasis associated to metabolic disorders.

To further delineate the underlying mechanisms that contribute to the metabolic benefits of RYGBP, and particularly the role of changes in BA pool size and composition, studies in preclinical models of RYGBP, which should resemble human conditions, is crucial. Comprehension of these mechanisms could lead to the identification of therapeutic targets mimicking the effects of RYGBP without necessarily requiring surgery. In rodents, RYGBP has been performed mainly in the rat,¹⁸ even though studies in mouse models are developing thanks to the improvement of the surgical skills, but post-surgery mortality remains high.¹⁹ In these animals, RYGBP leads to significant and sustained weight loss, as seen in humans,^{20,21} reproducing most of the hormonal and glycemic changes reported in obese patients after RYGBP, such as increases in GLP-1, PYY and amylin.^{22,23} Interestingly, the pig is a large diurnal mammal preclinical model often also studied for its resemblance to humans. Until now, pigs were mainly used for the acquaintance of the RYGBP technique,²⁴⁻²⁷ but recently this model has also proven to be appropriate for the study of post-surgical metabolic changes during BS, showing weight loss, increased ghrelin secretion and improved glucose homeostasis after RYGBP.²⁸⁻³⁰ However, plasma BA pool composition as well as the BA response to RYGBP has not been explored yet. Recently, we developed a RYGBP large animal model using the non-obese Göttingen minipig,³¹

which displays increased insulin and GLP-1 secretion after surgery, and thus presents an interesting preclinical model to study the underlying mechanisms of RYGBP-induced BA changes.

The aim of this study was to analyze the changes of plasma BA profiles induced by RYGBP in two animal models (rats and pigs) and to compare them to humans. Our results show that RYGBP increases fasting plasma total BA concentrations both in the animal models and in humans to a similar extent, but differently modifies individual plasma BA species. Such different qualitative BA modifications should be taken into account when interpreting results from animal models to humans.

MATERIAL AND METHODS

Patients and Surgical Procedures

7 obese non-diabetic patients (1M/6F) were selected from the ABOS cohort (Atlas for Severe Obesity – ClinicalTrials.gov; NCT01129297) for inclusion in this study. Patients had BMI: 43 [40.5 - 48.4] kg/m², age: 29 [18 – 52] years, fasting glucose: 4.8 [4.6 – 5.3] mmol/L, absence of medical or psychological contraindications for bariatric surgery, absence of clinical or laboratory evidence of obesity secondary to endocrinopathy, absence of addiction to alcohol or narcotics, absence of cholecystectomy prior to inclusion. Patients were eligible for bariatric surgery according to the French recommendations.³² Informed written consent was obtained from all patients, and the study was conducted in accordance with the Helsinki Declaration.

All patients were examined by a surgeon who explained in details the procedures of bariatric surgery. The RYGBP procedure consisted of creating a stomach pouch and bypassing it to the jejunum to establish gastrointestinal continuity as previously described.⁶ EDTA blood samples were collected in overnight fasted patients before and 1 year after surgery for BA composition analysis.

Animals and Experimental Procedures

Rat model and surgical procedure

Adult male Wistar rats (Janvier, France) fed a high fat-high cholesterol diet (60% kcal fat and 1.25% cholesterol) (Research Diet, USA) for seven weeks prior to surgery were randomly allocated to either RYGBP or sham operation as previously described¹⁸. Eight days after surgery, RYGBP (n=5) and sham-operated (n=6) rats were fasted for 4 hours (8am-12am) and postoperative blood was collected

at the time of euthanasia by heart puncture under isoflurane anaesthesia for BA pool composition analysis. All experiments were approved by the Zurich Cantonal Veterinary Office.

Minipig model and surgical procedure

RYGBP surgery was performed on adult Göttingen non-obese non-diabetic minipigs (n=6, 2M/4F, 44.7 ± 4.7 kg, Pannier's breeding, Wylder, France). Pigs were fasted overnight and RYGBP performed under general anaesthesia by midline laparotomy as described.³¹ Briefly, a small gastric pouch (30-50 ml) was constructed and the intestine was divided at seventy centimeters from the duodeno-jejunal junction, using a linear staplers device. The jejunal end of the Roux-en-Y limb was brought up and anastomosed to the gastric pouch by a linear stapler (Ethicon, Issy-les-Moulineaux, France). After surgery, minipigs were closely monitored and treated by fentanyl transdermal (Recuvyra[®] 2,6 mg/kg, Eli Lilly, Neuilly-sur-Seine, France). The surgical interventions were performed in the Department of Experimental Research of the Lille 2 University, France, in accordance with French regulations for animal experimentation [approval code: CEEA 152012]. Before and 14 days after surgery, blood samples were taken from the jugular vein of 16h-fasted vigil animals, to the K₂EDTA plastic blood collection tubes (BD Vacutainer[™], New Jersey, US). After centrifugation, the plasma samples were collected for BA pool composition analysis.

Plasma bile acid analyses

BAs were precipitated from plasma and pellets solubilized in MeOH as previously described.³³ The separation of BAs was carried out on a Symmetry C18 Luna column (250 mm×2.1 mm, particle size 5 µm) from Phenomenex. The oven temperature was set at 30°C. Solvent A was water containing 20 mM ammonium acetate, adjusted to pH8 and solvent B was acetonitrile. Solvents were delivered at a total flow rate of 500 µL/min. After a 5 min plateau with 28% B, the gradient profile was from 28% B to 90% B linearly in 15 min, followed by a 2 min plateau with 90% B. Column re-equilibration was performed for 4 min. The injection cycle was 26 min. The quantification of 24 different BAs (unconjugated, Glyco- and Tauro-conjugated BA species within the range of 1.5 –2 000 nmol/L) was then performed by high performance liquid chromatography (UFLC-XR device, Shimadzu) coupled to tandem mass spectrometry MS/MS (QTRAP[®] 5500 hybrid system, equipped with a Turbo VTM ion source, AB Sciex, Foster City, CA, USA). Instrument control, data acquisition and processing were

performed using the associated Analyst 1.5.2 software. The inter- and intra-day precisions of the BA concentration assay are <15%, except for HCA and LCA (<30%) (Detailed methods are provided in supplemental data).

Statistical analysis

Results are expressed as the means \pm SEM. Data were analyzed using the Graphpad Prism version 5 statistical software. Effects of RYGBP on total BAs and BA species were tested using Wilcoxon's matched-pairs signed-rank test in humans and pigs, and using the Mann-Whitney's rank sum test for unpaired data in RYGBP vs sham-operated rats. A value of $p < 0.05$ was considered as statistically significant.

RESULTS

Humans, rats and pigs display quantitatively similar increases in total BA concentrations after RYGBP

Fasting plasma total BA concentrations were measured in humans, rats and pigs before and after RYGBP surgery (or sham vs operated). We first compared the plasma BA profiles before surgery in humans and in the two animal models (Figure 1a). In humans, glyco-BAs (52%) and free-BAs (42%) were most abundant, with very low levels of tauro-BAs (6%). Interestingly, pigs display a quite similar plasma BA profile with a large proportion of glyco-BAs (42%) and free-BAs (55%), and a small proportion of tauro-BAs (3%). By contrast, in rats, the most abundant BA species are tauro-BAs (90%), with only 9% of free-BAs and 1% of glyco-BAs. Qualitative analysis of the BA species in the three models before surgery (Figure 1b) showed that plasma BAs are essentially composed of CDCA (44%), DCA (25%) and CA (20%) in humans, with a minority of UDCA (9%), LCA (1%) and HCA (1%). In rats, the plasma BA pool also contains large proportions of CA (38%), somewhat less CDCA (18%) and DCA (12%) and a minority of UDCA (1%), HCA (1%) and LCA (0.16%). However, the MCA forms are in large quantities representing 29% of the total BA pool. On the other hand, in pigs, UDCA (44%), HCA (41%) and CDCA (14%) are the most represented species, with a minority of CA (0.44%), LCA (0.43%) and DCA (0.13%).

We then compared the increase of BA pool between humans and the two animal models after surgery (Figure 2). In humans, plasma total BA levels increased ~3-fold one year after RYGBP (Figure 2a).

Despite higher plasma total BA levels in rats (Figure 2b) and pigs (Figure 2c), a similar rise of plasma total BA levels was also observed in the two animal models after RYGBP.

Thus, despite different pre-surgery plasma BA profiles, total plasma BA levels increased in the three models after RYGBP (Figure 2).

Qualitative differences in plasma BA species in humans, rats and pigs after RYGBP

We then analyzed and compared the BA profile modifications induced by RYGBP in the three models (Figure 3). Interestingly, the increase of plasma BA levels after RYGBP in humans was mainly due to an increase of the free species, with no significant differences in the conjugated (glyco and tauro) species (Figure 3a). More precisely, the increase on the free-BA concentration after RYGBP in humans was due to an augmentation on the primary-BAs (CA and CDCA), on the major secondary BA DCA and on the minor BA HCA (Figure 3b). No modification in the levels of conjugated BAs was observed after surgery (Figure 3a), except for a minor albeit significant increase of GHCA (Figure 3b).

In rats, the increase of the total BA concentration after RYGBP was due to a sharp increase of both free-BAs and glyco-BAs, whereas tauro-BAs, the most abundant species in this model, showed a tendency to increase (Figure 3c). Like in humans, the concentrations of the free BA species CA, CDCA and DCA were increased after RYGBP (Figure 3d). In addition, the free species UDCA, α MCA and β MCA, also significantly increased post-surgery. In contrast to humans, a significant increase in glyco-conjugated BAs was observed post-surgery due to a rise in almost all the conjugated BA species (GCA, GCDCA, GDCA, GUDCA, GHCA). Moreover, the increase of tauro-conjugated species was due to a significant increase of TUDCA, T α MCA and T β MCA.

Finally, in pigs, the concentrations of free and glyco-conjugated BA species increased after RYGBP, with no significant difference in tauro-BAs species (Figure 3e). Among the free species, like in humans, the CA and DCA levels significantly increased. UDCA also significantly increased with a trend to an increase of CDCA and the other free species. The post-surgery increase of the glyco-conjugated species was due both to primary (GCA and GCDCA) and secondary species (GDCA, GLCA, GUDCA).

These results show that the effects of RYGBP on the plasma BA profile differs between the models. To better appreciate the effects of RYGBP on the increase of each BA species and to compare these effects among the three models, the change of each BA species is represented as the ratio of the

post-surgical concentrations over the pre-surgical or sham concentrations (Figure 4). Irrespective of their concentrations in the pre-surgical state, the free- and glyco-conjugated BAs increased most pronouncedly after RYGBP whatever the model, while the tauro-conjugated species did not display major changes. In humans, the increases of BA levels were exclusively due to the free BA species and specifically the two primary BAs CA and CDCA. Interestingly, HCA and its conjugated form GHCA also exhibited a strong increase after RYGBP in humans, corresponding to the appearance of these species in plasma post-surgery, given that their levels were almost absent before surgery (see Figure 1b). In rats, like in humans, the free CA and CDCA species also strongly increased, as did the different free MCA forms. Surprisingly, whereas the glyco-conjugated species are minor before surgery in rats (1%, see Figure 1a), they increased post-surgery (especially GCA, GCDCA, GDCA, GUDCA). On the contrary, whereas the tauro-conjugated species were the most represented in rats pre-surgery (90%, see Figure 1a), they were not affected by surgery. Finally, in pigs, the increase of free CA and CDCA was not as important post-surgery as in humans and rats. In fact, in pigs, both primary and secondary free BAs globally increased to the same extent post-surgery as well as the primary and secondary glyco-BAs. Comparable to humans, tauro-BAs were not modified after RYGBP in pigs.

DISCUSSION

Increasing evidence identifies BAs as key regulators of metabolic improvements after RYGBP,¹³ but their exact role still remains unclear. An appropriate animal model reproducing the qualitative/quantitative BA pool changes after RYGBP is necessary to thoroughly understand the role and the mechanisms of action of BAs and to test mechanistic hypothesis to be then translated to humans. In this study, we present for the first time a comparative analysis of the fasting plasma BA profiles in two animal models, rats and pigs, compared to humans, before and after RYGBP.

First, in humans, the modifications of plasma total BA and individual species after RYGBP confirmed and extend previous reports. Indeed, plasma total BA concentrations in the fasted state increased ~3-fold one year after RYGBP surgery. This increase of total fasting plasma BA has been observed in most of the studies in non-diabetic obese patients after RYGBP, with variable increases of BA species, mainly of the free and glycine-conjugated species.³⁴⁻⁴¹ A few studies reported a rapid decrease of total fasting plasma BA in the first week after RYGBP, prior to the increase after one year,^{42,43} but with

minor changes of BA composition,⁴³ which may suggest different implications of BAs in the early vs late effects of RYGBP. In our study, the increase of total plasma BA levels was due to a rise of the free species concentrations, specifically DCA, CA and CDCA, as already reported,^{40,37,44} without any significant difference in the conjugated (glyco and tauro) species. Interestingly, we also noticed a significant increase in the minor form HCA and its glycine-conjugated form GHCA.

Then, we analyzed plasma BA profiles before and after RYGBP in two animal models and compared them to humans. We were especially interested in the rat model which is the most classical animal model used in RYGBP studies and globally in bariatric surgery. Indeed, thanks to the relative simplicity of logistical management (small animal size, breeding facilities, etc.), the shorter time-effects and the similar gastrointestinal tract despite the small size of the organs, the rat model offers the possibility to evaluate the effects of BA changes during RYGBP in an easier and shorter manner translatable to human. Interestingly, this model has been reported to reproduce many of the metabolic aspects of RYGBP reported in patients^{22,23,45} and has already been used to assess the impact of altering BA flux in the gastrointestinal tract.⁴⁶⁻⁴⁸ However, very few studies have investigated BA modifications during RYGBP in rats.^{18,23,49} In our study, we were also interested in pigs which offer the advantages of sharing genetic, anatomic and physiological analogies to humans (anatomy of gastrointestinal tract, stomach and neural innervations, metabolism, lipoprotein profile) as well as similar omnivorous feeding behavior.^{31,50} In addition, the dimension of this species allows collection of larger blood volumes and tissue samples compared to small animal models.⁵⁰ A number of studies have validated pigs as a feasible and reproducible model of RYGBP, with similar metabolic changes observed in humans after RYGBP.²⁸⁻³⁰ However, until now, no study has evaluated changes in BA profiles before and after RYGBP in pigs. To that aim, we used our new model of minipig which has been validated as a relevant model of RYGBP.³¹

Therefore, the main question we addressed in our study was about the similarities between these two animal models and humans concerning modifications of BA profiles during RYGBP, which may justify their further use in the study of BA in bariatric surgery. 1) First, when we compared the pre-surgery profiles, as expected, the major BA species in humans were CDCA, DCA and CA, with major free- and glyco-conjugated forms, and minor tauro-conjugated forms. Interestingly, in rats, we found similarities with the human distribution in BA species with a strong representation of CA, CDCA and DCA, and negligible quantities of LCA. Interestingly, the pig was the one for which the repartition of the BA pool

in free-, glyco- or tauro-conjugated forms was closer to the humans, with a comparable repartition in free and glyco-BAs and just small amounts of tauro-BAs. 2) When we evaluated the quantitative changes of BA after RYGBP, total BA increased both in rats and pigs like in humans, and to a similar extent (approximately 3-fold increased). In humans, it is hypothesized that the altered anatomy after RYGBP affects bile delivery to the terminal ileum and leads to elevated plasma BA. Delivered BAs would have less time to mix with food prior to be delivered in the ileum, thus enabling a swifter reuptake of free BAs in the ileum. It seems that the same mechanisms could also be implicated in rats and pigs despite some differences in gastrointestinal tract anatomy. 3) In the two animal models, as in humans, we found an increase in the free CA, CDCA and DCA species after RYGBP, suggesting common mechanisms. The beneficial metabolic effects of vertical sleeve gastrectomy (VSG), such as improved glucose tolerance and weight loss, have been suggested to occur via FXR¹² through the increased concentration of its natural ligands BAs. Indeed, *in vitro*, it has been shown that different BA species can activate FXR with different potencies (CDCA>DCA>LCA>CA).⁵¹ However, in contrast to VSG, the importance of FXR in RYGBP is still unknown. Moreover, some BA species affected by RYGBP also activate TGR5 with different potencies (LCA>=DCA>CDCA>CA),⁵² consequently the modulation of TGR5 signaling may also contribute to the metabolic effects of RYGBP. 4) Finally, in the two animal models as in humans, tauro-conjugated BA levels were almost not affected by RYGBP, even though their pre-surgery concentrations were different according to the animal model (high levels in rats, low levels in pigs).

However, despite these similarities, researchers have to keep in mind that some precautions have to be taken when using these animal models to further understand the effects of BA metabolism changes after RYGBP. In rats, first, the major drawback is the presence of a huge part of the BA pool as MCAs (29% of total BAs in the pre-surgery state), which are synthesized only in rodents but not in humans. In our study, these MCAs species (α MCA and β MCA, both free and tauro-conjugated) increased after RYGBP. This can be problematic in the translation of the mechanisms from rats to humans. Indeed, contrary to the primary human BAs which are FXR agonists, MCAs are much less hydrophobic and both α MCA and β MCA have been shown to function rather as FXR antagonists,⁵³ which can differently affect FXR activity before and after RYGBP compared to humans. Second, in line, some FXR agonists (CA, CDCA, DCA) are increased both in humans and rats after RYGBP, but given BAs can have different affinities for FXR and/or TGR5 according to the model. For example, the EC₅₀ of

CDCA is 50 μ M on murine FXR and 10 μ M human FXR.⁵⁴ This diversity can be due to the differences in particular amino acids residues (notably the Asn354 and Ile372), which confer to the human FXR-LBD a 10-fold higher affinity and a 3-fold stronger maximal response to CDCA than the murine FXR-LBD.⁵⁵ Finally, in rats, a strong increase of glyco-conjugated BA species was observed after RYGBP, without any modifications in humans. However, some human studies reported increases of glyco-conjugated species after RYGBP.^{34,40} This discrepancy may be due to the different timing of sampling after the surgery, to different rates of BA conjugation in the liver and/or to different transformations of BA in the intestine related to the changes in the gut microbiota after RYGBP between studies. Indeed, it is now clearly established that gut microbiota can impact BA levels and composition by promoting deconjugation, epimerization, dehydrogenation, and dehydroxylation of primary BA in the small intestine and colon.^{53,56-58} However, microbial enzymes can differ between humans and animal models with respect to pH changes, substrate specificity, enzyme activity and/or function. Concerning pigs, the major disadvantage when using these animals to investigate the effects of RYGBP on BA changes, is the already quite different pre-surgery plasma BA composition from humans, with a strong proportion of HCA and UDCA, two minor BA species in humans, and with almost no presence of two major human BA species CA and DCA. Even though activities of the different BA species on pig FXR are unknown, this pattern of BA composition can be a confounding factor in terms of pre-surgery FXR activation, and consequently can mask the effects of FXR modulation during RYGBP. Indeed, UDCA does not activate FXR and may be even a partial antagonist on human FXR,⁵⁹ although one report suggested agonistic properties *in vivo* in mice.⁶⁰ Thus, it will be important to assess the activity of the different BA species on the pig receptors, when trying to extrapolate findings from pigs to humans. Finally, when we analyzed the RYGB-induced changes in plasma BA profiles, many glyco-conjugated BA species were increased post-surgery in pigs, which may also suggest, like in rats, a different impact of gut microbiota on BA composition, compared to humans.

Thus, this comparison of plasma BA profiles in humans and two animal models during RYGBP points out some limitations when using the preclinical animal models to study the implications of BA during RYGBP. Nevertheless, unlike studies in humans, facing practical and ethical issues, analysis of links between BAs and metabolic parameters remains easier in animal models of RYGBP, which provide unique and exciting opportunities to elucidate the underlying mechanisms of RYGBP. Thanks to standardized techniques of surgery and many comparable physiological effects of the surgery

between humans and animal models, animal models remain essential to further understand the role of BAs in RYGBP, especially by combining data obtained in different animal models.

To conclude, our study reveals similarities and differences in RYGBP-induced BA profiles in rats, pigs and humans, pointing out that caution needs to be taken when extrapolating findings on BAs from preclinical animal models to humans.

ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank C.Corteville for technical support in rat surgery. VS was supported by a grant from the Fondation pour la Recherche Médicale (FRM) Grant FDT20140930804. This work was supported by grants from “European Genomic Institute for Diabetes” (E.G.I.D., ANR-10-LABX-46), European Commission, Région Nord-Pas de Calais, FEDER, INSERM, A.N.R. (FXREn), Université Lille and Université Lille Nord de France. BS is a member of the Institut Universitaire de France.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that they have no conflict of interest.

Supplementary information is available at *International Journal of Obesity's* website.

REFERENCES

- 1 Ng M, Fleming T, Robinson M, Thomson B, Graetz N, Margono C *et al*. Global, regional, and national prevalence of overweight and obesity in children and adults during 1980–2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *The Lancet* 2014; **384**: 766–781.
- 2 Cummings DE, Overduin J, Foster-Schubert KE. Gastric bypass for obesity: mechanisms of weight loss and diabetes resolution. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; **89**: 2608–2615.
- 3 Buchwald H, Estok R, Fahrenbach K, Banel D, Jensen MD, Pories WJ *et al*. Weight and type 2 diabetes after bariatric surgery: systematic review and meta-analysis. *Am J Med* 2009; **122**: 248–256.

- 4 Pories WJ, Swanson MS, MacDonald KG, Long SB, Morris PG, Brown BM *et al.* Who would have thought it? An operation proves to be the most effective therapy for adult-onset diabetes mellitus. *Ann Surg* 1995; **222**: 339–350.
- 5 Mummadi RR, Kasturi KS, Chennareddygar S, Sood GK. Effect of bariatric surgery on nonalcoholic fatty liver disease: systematic review and meta-analysis. *Clin Gastroenterol Hepatol Off Clin Pract J Am Gastroenterol Assoc* 2008; **6**: 1396–1402.
- 6 Caiazzo R, Lassailly G, Leteurtre E, Baud G, Verkindt H, Raverdy V *et al.* Roux-en-Y gastric bypass versus adjustable gastric banding to reduce nonalcoholic fatty liver disease: a 5-year controlled longitudinal study. *Ann Surg* 2014; **260**: 893–899.
- 7 Ricci C, Gaeta M, Rausa E, Macchitella Y, Bonavina L. Early impact of bariatric surgery on type II diabetes, hypertension, and hyperlipidemia: a systematic review, meta-analysis and meta-regression on 6,587 patients. *Obes Surg* 2014; **24**: 522–528.
- 8 Tailleux A, Rouskas K, Pattou F, Staels B. Bariatric surgery, lipoprotein metabolism and cardiovascular risk. *Curr Opin Lipidol* 2015. doi:10.1097/MOL.0000000000000197.
- 9 Lindqvist A, Spégel P, Ekelund M, Mulder H, Groop L, Hedenbro J *et al.* Effects of ingestion routes on hormonal and metabolic profiles in gastric-bypassed humans. *J Clin Endocrinol Metab* 2013; **98**: E856–861.
- 10 Wu Q, Xiao Z, Cheng Z, Tian H. Changes of blood glucose and gastrointestinal hormones 4 months after Roux-en-Y gastric bypass surgery in Chinese obese type 2 diabetes patients with lower body mass index. *J Diabetes Investig* 2013; **4**: 214–221.
- 11 Sweeney TE, Morton JM. The human gut microbiome: a review of the effect of obesity and surgically induced weight loss. *JAMA Surg* 2013; **148**: 563–569.
- 12 Ryan KK, Tremaroli V, Clemmensen C, Kovatcheva-Datchary P, Myronovych A, Karns R *et al.* FXR is a molecular target for the effects of vertical sleeve gastrectomy. *Nature* 2014; **509**: 183–188.

- 13 Penney NC, Kinross JM, Newton RC, Purkayastha S. The role of bile acids in reducing the metabolic complications of obesity after bariatric surgery: A systematic review. *Int J Obes* 2005 2015. doi:10.1038/ijo.2015.115.
- 14 Russell DW. The enzymes, regulation, and genetics of bile acid synthesis. *Annu Rev Biochem* 2003; **72**: 137–174.
- 15 Lefebvre P, Cariou B, Lien F, Kuipers F, Staels B. Role of bile acids and bile acid receptors in metabolic regulation. *Physiol Rev* 2009; **89**: 147–191.
- 16 Claus SP, Ellero SL, Berger B, Krause L, Bruttin A, Molina J *et al*. Colonization-induced host-gut microbial metabolic interaction. *mBio* 2011; **2**: e00271–00210.
- 17 De Aguiar Vallim TQ, Tarling EJ, Edwards PA. Pleiotropic roles of bile acids in metabolism. *Cell Metab* 2013; **17**: 657–669.
- 18 Osto E, Doytcheva P, Corteville C, Bueter M, Dörig C, Stivala S *et al*. Rapid and Body Weight-Independent Improvement of Endothelial and High-Density Lipoprotein Function After Roux-en-Y Gastric Bypass: Role of Glucagon-Like Peptide-1. *Circulation* 2015; **131**: 871–881.
- 19 Bruinsma BG, Uygun K, Yarmush ML, Saeidi N. Surgical models of Roux-en-Y gastric bypass surgery and sleeve gastrectomy in rats and mice. *Nat Protoc* 2015; **10**: 495–507.
- 20 Arble DM, Sandoval DA, Seeley RJ. Mechanisms underlying weight loss and metabolic improvements in rodent models of bariatric surgery. *Diabetologia* 2015; **58**: 211–220.
- 21 Seyfried F, le Roux CW, Bueter M. Lessons learned from gastric bypass operations in rats. *Obes Facts* 2011; **4 Suppl 1**: 3–12.
- 22 Shin AC, Zheng H, Townsend RL, Sigalet DL, Berthoud H-R. Meal-induced hormone responses in a rat model of Roux-en-Y gastric bypass surgery. *Endocrinology* 2010; **151**: 1588–1597.
- 23 Bhutta HY, Rajpal N, White W, Freudenberg JM, Liu Y, Way J *et al*. Effect of Roux-en-Y Gastric Bypass Surgery on Bile Acid Metabolism in Normal and Obese Diabetic Rats. *PLoS One* 2015; **10**: e0122273.

- 24 Potvin M, Gagner M, Pomp A. Laparoscopic Roux-en-Y gastric bypass for morbid obesity: a feasibility study in pigs. *Surg Laparosc Endosc* 1997; **7**: 294–297.
- 25 Cagigas JC, Martino E, Escalante CF, Ingelmo A, Estefanía R, Gutierrez JM *et al*. Technical alternatives in laparoscopic distal gastric bypass for morbid obesity in a porcine model. *Obes Surg* 1999; **9**: 166–170.
- 26 Scott DJ, Provost DA, Tesfay ST, Jones DB. Laparoscopic Roux-en-Y gastric bypass using the porcine model. *Obes Surg* 2001; **11**: 46–53.
- 27 Gentileschi P, Gagner M, Milone L, Kini S, Fukuyama S. Histologic studies of the bypassed stomach after Roux-en-Y gastric bypass in a porcine model. *Obes Surg* 2006; **16**: 886–890.
- 28 Flum DR, Devlin A, Wright AS, Figueredo E, Alyea E, Hanley PW *et al*. Development of a porcine Roux-en-Y gastric bypass survival model for the study of post-surgical physiology. *Obes Surg* 2007; **17**: 1332–1339.
- 29 Sham JG, Simianu VV, Wright AS, Stewart SD, Alloosh M, Sturek M *et al*. Evaluating the mechanisms of improved glucose homeostasis after bariatric surgery in Ossabaw miniature swine. *J Diabetes Res* 2014; **2014**: 526972.
- 30 Lindqvist A, Spégel P, Ekelund M, Garcia Vaz E, Pierzynowski S, Gomez MF *et al*. Gastric bypass improves β -cell function and increases β -cell mass in a porcine model. *Diabetes* 2014; **63**: 1665–1671.
- 31 Verhaeghe R, Zerrweck C, Hubert T, Tréchet B, Gmyr V, D’Herbomez M *et al*. Gastric bypass increases postprandial insulin and GLP-1 in nonobese minipigs. *Eur Surg Res Eur Chir Forsch Rech Chir Eur* 2014; **52**: 41–49.
- 32 Laville M, Romon M, Chavier G, Guy-Grand B, Krempf M, Chevallier JM *et al*. Recommendations regarding obesity surgery. *Obes Surg* 2005; **15**: 1476–1480.
- 33 García-Cañaveras JC, Donato MT, Castell JV, Lahoz A. Targeted profiling of circulating and hepatic bile acids in human, mouse, and rat using a UPLC-MRM-MS-validated method. *J Lipid Res* 2012; **53**: 2231–2241.

- 34 Patti M-E, Houten SM, Bianco AC, Bernier R, Larsen PR, Holst JJ *et al.* Serum bile acids are higher in humans with prior gastric bypass: potential contribution to improved glucose and lipid metabolism. *Obes Silver Spring Md* 2009; **17**: 1671–1677.
- 35 Nakatani H, Kasama K, Oshiro T, Watanabe M, Hirose H, Itoh H. Serum bile acid along with plasma incretins and serum high-molecular weight adiponectin levels are increased after bariatric surgery. *Metabolism* 2009; **58**: 1400–1407.
- 36 Pournaras DJ, Glicksman C, Vincent RP, Kuganolipava S, Alaghband-Zadeh J, Mahon D *et al.* The role of bile after Roux-en-Y gastric bypass in promoting weight loss and improving glycaemic control. *Endocrinology* 2012; **153**: 3613–3619.
- 37 Simonen M, Dali-Youcef N, Kaminska D, Venesmaa S, Käkelä P, Pääkkönen M *et al.* Conjugated bile acids associate with altered rates of glucose and lipid oxidation after Roux-en-Y gastric bypass. *Obes Surg* 2012; **22**: 1473–1480.
- 38 De Giorgi S, Campos V, Egli L, Toepel U, Carrel G, Cariou B *et al.* Long-term effects of Roux-en-Y gastric bypass on postprandial plasma lipid and bile acids kinetics in female non diabetic subjects: A cross-sectional pilot study. *Clin Nutr* 2014. doi:10.1016/j.clnu.2014.09.018.
- 39 Scholtz S, Miras AD, Chhina N, Prechtel CG, Sleeth ML, Daud NM *et al.* Obese patients after gastric bypass surgery have lower brain-hedonic responses to food than after gastric banding. *Gut* 2014; **63**: 891–902.
- 40 Werling M, Vincent RP, Cross GF, Marschall H-U, Fändriks L, Lönroth H *et al.* Enhanced fasting and post-prandial plasma bile acid responses after Roux-en-Y gastric bypass surgery. *Scand J Gastroenterol* 2013; **48**: 1257–1264.
- 41 Jansen PLM, van Werven J, Aarts E, Berends F, Janssen I, Stoker J *et al.* Alterations of hormonally active fibroblast growth factors after Roux-en-Y gastric bypass surgery. *Dig Dis Basel Switz* 2011; **29**: 48–51.

- 42 Steinert RE, Peterli R, Keller S, Meyer-Gerspach AC, Drewe J, Peters T *et al.* Bile acids and gut peptide secretion after bariatric surgery: a 1-year prospective randomized pilot trial. *Obes Silver Spring Md* 2013; **21**: E660–668.
- 43 Jørgensen NB, Dirksen C, Bojsen-Møller KN, Kristiansen VB, Wulff BS, Rainteau D *et al.* Improvements in glucose metabolism early after gastric bypass surgery are not explained by increases in total bile acids and fibroblast growth factor 19 concentrations. *J Clin Endocrinol Metab* 2015; **100**: E396–406.
- 44 Gerhard GS, Styer AM, Wood GC, Roesch SL, Petrick AT, Gabrielsen J *et al.* A role for fibroblast growth factor 19 and bile acids in diabetes remission after Roux-en-Y gastric bypass. *Diabetes Care* 2013; **36**: 1859–1864.
- 45 Zhou D, Jiang X, Ding W, Zhang D, Yang L, Zhen C *et al.* Impact of bariatric surgery on ghrelin and obestatin levels in obesity or type 2 diabetes mellitus rat model. *J Diabetes Res* 2014; **2014**: 569435.
- 46 Kohli R, Bradley D, Setchell KD, Eagon JC, Abumrad N, Klein S. Weight loss induced by Roux-en-Y gastric bypass but not laparoscopic adjustable gastric banding increases circulating bile acids. *J Clin Endocrinol Metab* 2013; **98**: E708–712.
- 47 Kohli R, Kirby M, Setchell KDR, Jha P, Klustaitis K, Woollett LA *et al.* Intestinal adaptation after ileal interposition surgery increases bile acid recycling and protects against obesity-related comorbidities. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2010; **299**: G652–660.
- 48 Goncalves D, Barataud A, De Vadder F, Vinera J, Zitoun C, Duchamp A *et al.* Bile Routing Modification Reproduces Key Features of Gastric Bypass in Rat. *Ann Surg* 2015. doi:10.1097/SLA.0000000000001121.
- 49 Lutz TA, Bueter M. Physiological mechanisms behind Roux-en-Y gastric bypass surgery. *Dig Surg* 2014; **31**: 13–24.
- 50 Birck MM, Vegge A, Støckel M, Gögenur I, Thymann T, Hammelev KP *et al.* Laparoscopic Roux-en-Y gastric bypass in super obese Göttingen minipigs. *Am J Transl Res* 2013; **5**: 643–653.

- 51 Parks DJ, Blanchard SG, Bledsoe RK, Chandra G, Consler TG, Kliewer SA *et al.* Bile acids: natural ligands for an orphan nuclear receptor. *Science* 1999; **284**: 1365–1368.
- 52 Kawamata Y, Fujii R, Hosoya M, Harada M, Yoshida H, Miwa M *et al.* A G protein-coupled receptor responsive to bile acids. *J Biol Chem* 2003; **278**: 9435–9440.
- 53 Sayin SI, Wahlström A, Felin J, Jäntti S, Marschall H-U, Bamberg K *et al.* Gut microbiota regulates bile acid metabolism by reducing the levels of tauro-beta-muricholic acid, a naturally occurring FXR antagonist. *Cell Metab* 2013; **17**: 225–235.
- 54 Makishima M, Okamoto AY, Repa JJ, Tu H, Learned RM, Luk A *et al.* Identification of a nuclear receptor for bile acids. *Science* 1999; **284**: 1362–1365.
- 55 Cui J, Heard TS, Yu J, Lo J-L, Huang L, Li Y *et al.* The amino acid residues asparagine 354 and isoleucine 372 of human farnesoid X receptor confer the receptor with high sensitivity to chenodeoxycholate. *J Biol Chem* 2002; **277**: 25963–25969.
- 56 Midtvedt T. Microbial bile acid transformation. *Am J Clin Nutr* 1974; **27**: 1341–1347.
- 57 Ridlon JM, Kang D-J, Hylemon PB. Bile salt biotransformations by human intestinal bacteria. *J Lipid Res* 2006; **47**: 241–259.
- 58 Swann JR, Want EJ, Geier FM, Spagou K, Wilson ID, Sidaway JE *et al.* Systemic gut microbial modulation of bile acid metabolism in host tissue compartments. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011; **108 Suppl 1**: 4523–4530.
- 59 Mueller M, Thorell A, Claudel T, Jha P, Koefeler H, Lackner C *et al.* Ursodeoxycholic Acid Exerts Farnesoid X Receptor-antagonistic Effects on Bile Acid and Lipid Metabolism in Morbid Obesity. *J Hepatol* 2015. doi:10.1016/j.jhep.2014.12.034.
- 60 Song P, Rockwell CE, Cui JY, Klaassen CD. Individual bile acids have differential effects on bile acid signaling in mice. *Toxicol Appl Pharmacol* 2015; **283**: 57–64.

FIGURE LEGENDS

Figure 1: The plasma BA profile differs in humans, rats and pigs before surgery. **(a)** Free-, glyco-conjugated and tauro-conjugated BA repartition in human, rat and pig. **(b)** BA families repartition in human, rat and pig. F: Free BAs; G; glyco-conjugated BAs; T: tauro-conjugated BAs.

Figure 2: Roux-en-Y gastric bypass (RYGBP) increases plasma total BA concentrations in humans, rats and pigs. **(a)** Fasting plasma total BA levels in obese non-diabetic patients (n=7) before and 1 year after RYGBP. **(b)** Fasting plasma total BA levels in sham-operated (n=6) and RYGBP-operated rats (n=5) 8 days after surgery. **(c)** Fasting plasma total BA levels in Göttingen minipigs (n=6) before and 14 days after RYGBP. Asterisk denotes a significant difference between groups (*p<0.05, ** p<0.01) according to Mann-Whitney test for rat, Wilcoxon test for human and pig. Values are mean \pm SEM.

Figure 3: Changes in individual plasma BA species in humans, rats and pigs after RYGBP. Plasma concentrations of free-, glyco-conjugated and tauro-conjugated BAs in human **(a)**, rat **(c)** and pig **(e)** before/sham (white bars) and after (black bars) RYGBP. Plasma concentrations of individual BA species in human **(b)**, rat **(d)** and pig **(f)** before/sham (white bars) and after (black bars) RYGBP as measured by LC/MS-MS technology. Asterisk denotes a significant difference between groups (*p<0.05, ** p<0.01) according to Mann-Whitney test for rat, Wilcoxon test for human and pig. Values are mean \pm SEM.

Figure 4: Differential effects of RYGBP on the BA species. Fold change (FC) of each BA species, calculated as the ratio of the post-RYGBP concentrations of each BA species over the pre-surgery/sham concentrations in human (white bars), rat (checkered bars) and pig (black bars). Values are mean \pm SEM.

Figure 1

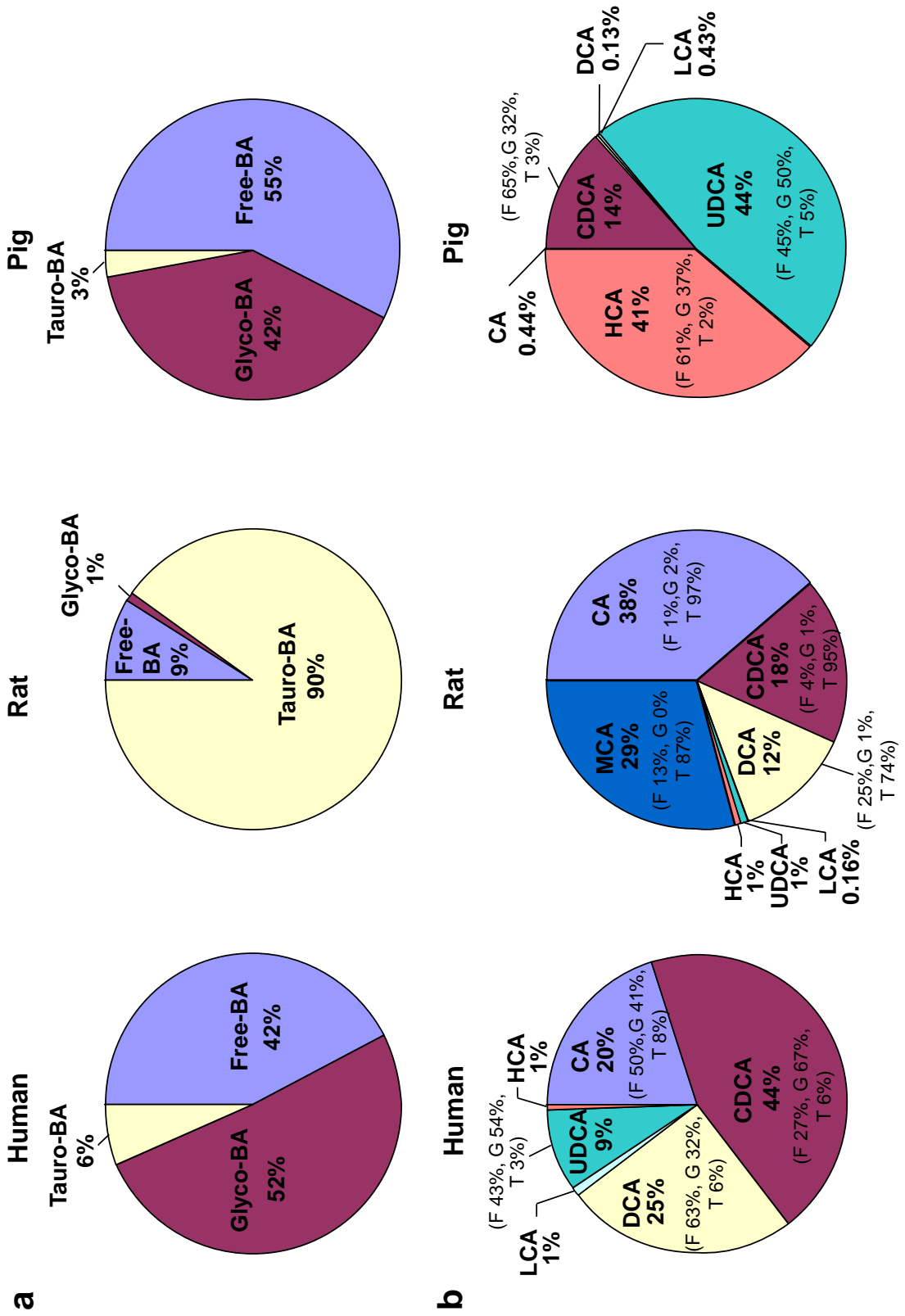


Figure 2

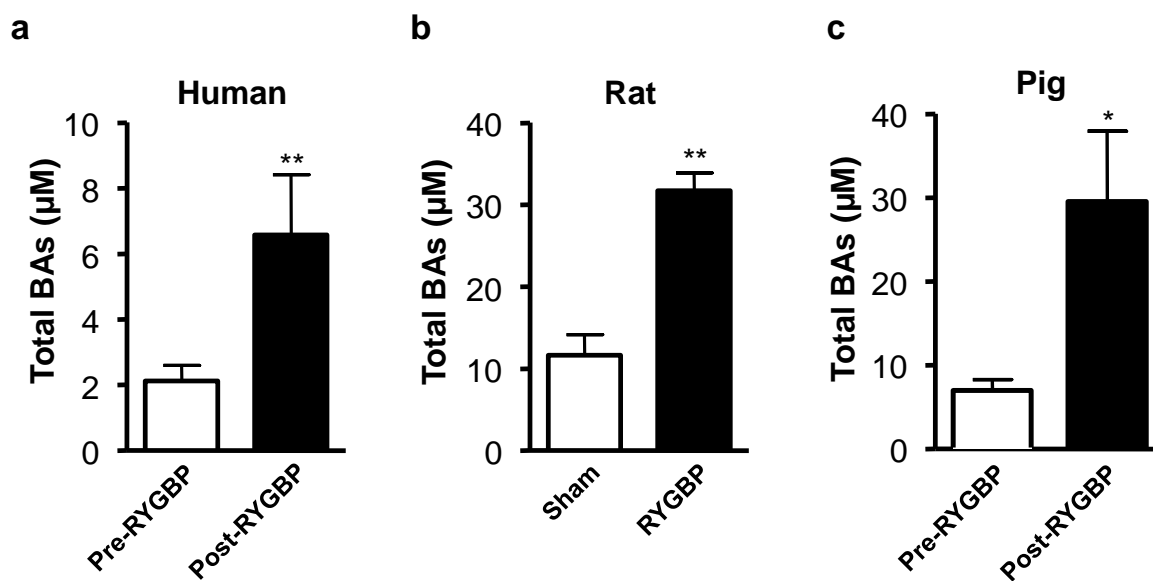


Figure 3

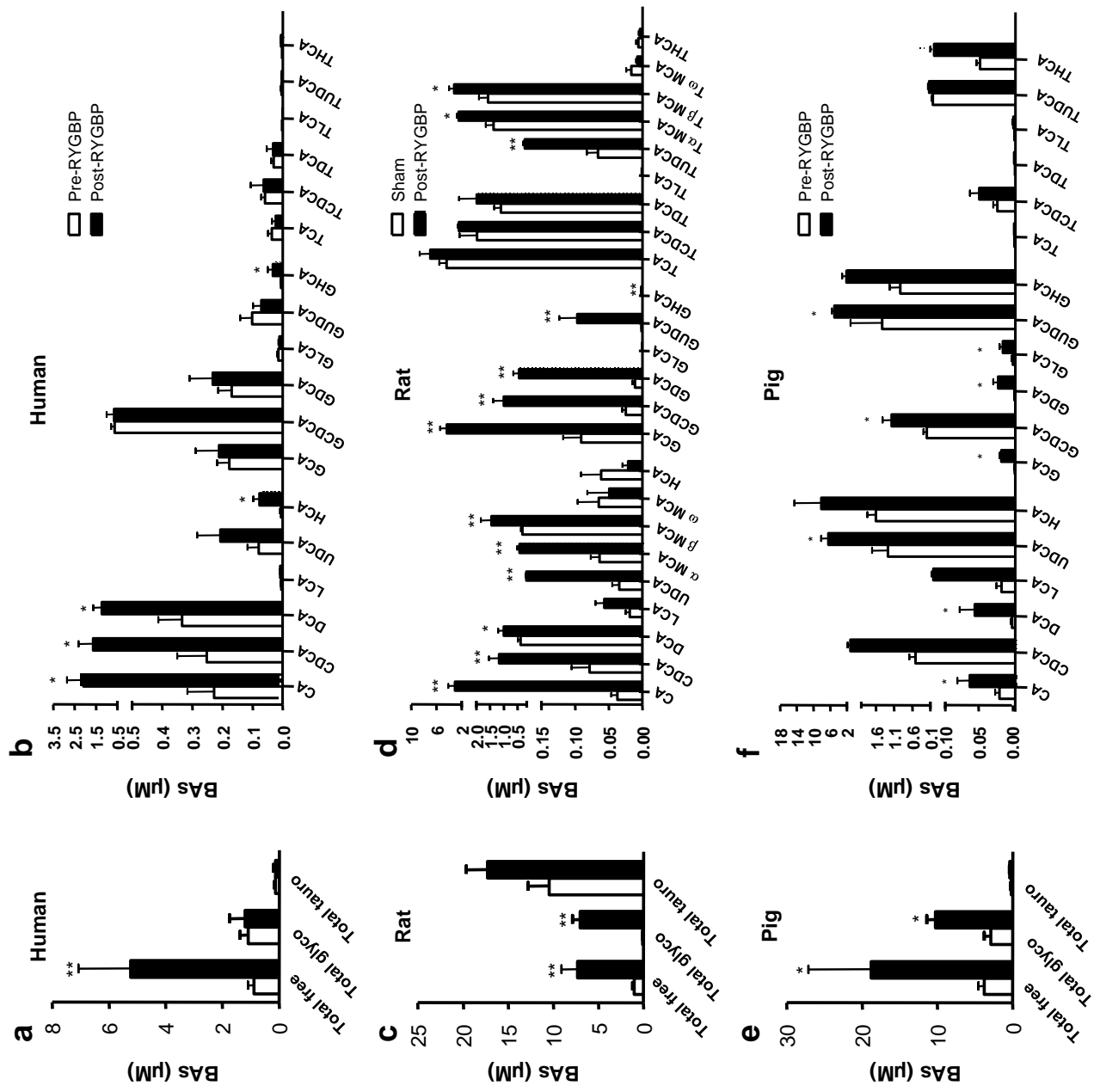
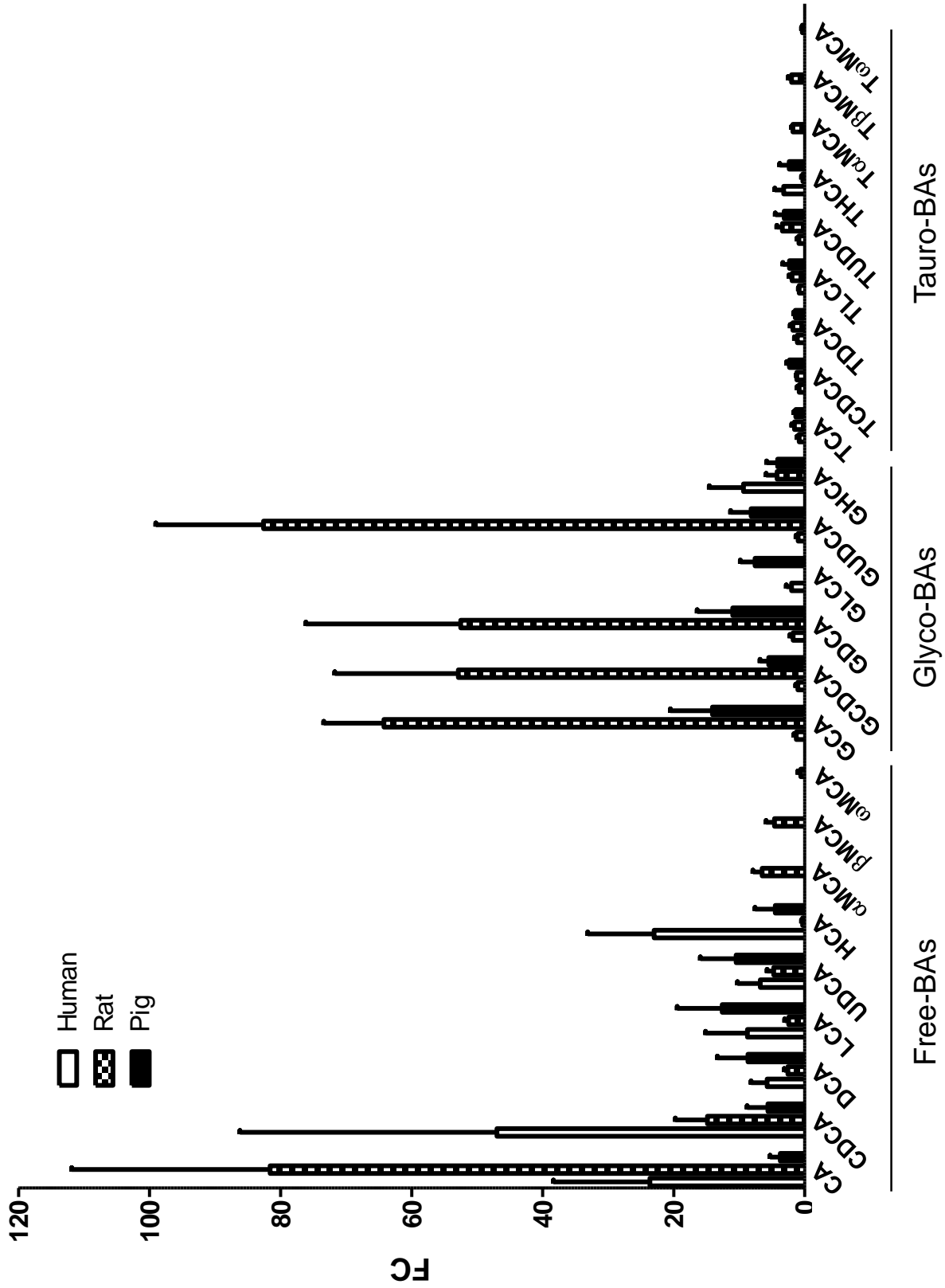


Figure 4



SUPPLEMENTARY INFORMATION

Bile acid analyses

Bile acid and sample preparation

The stock solutions of the individual BAs were prepared separately in methanol (MeOH) at a concentration range from 1.8 to 6.6 mmol/L and stored at -20°C. Calibration standards were prepared by combining appropriate volumes of each BA stock solution and MeOH. The calibration range was from 1.5 to 2 000 nmol/L of each BA in the final solution. Internal standard (IS) solution encompasses 5 deuterated BAs (D4-CA, D4-GCA, D4-TCA, D4-CDCA, D4-GCDCA) at 0.5 µM in MeOH.

Plasma samples were deproteinized as previously described.¹ Briefly, 50 µL of plasma was mixed with 25 µL IS and 225 µL cold MeOH, vortexed for 30 sec, stored for 20 min at -20°C. After centrifugation at 10 000 g for 10 min at +4°C, the supernatant was evaporated. The pellet was then redissolved in MeOH/water (v/v) and injected in the LC-MS/MS system for BA separation and quantification. A BA extraction >95% was measured with the addition of BA standards in plasma samples before and after the deproteinization procedure.

Liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS)

The method allowed the quantification of 24 different BAs (cholic acid (CA), glycocholic acid (GCA), taurocholic acid (TCA), chenodeoxycholic acid (CDCA), glycochenodeoxycholic acid (GCDCA), taurochenodeoxycholic acid (TCDCA), deoxycholic acid (DCA), glycodeoxycholic acid (GDCA), taurochenodeoxycholic acid (TCDCA), lithocholic acid (LCA), glycolithocholic acid (GLCA), tauroolithocholic acid (TLCA), ursodeoxycholic acid (UDCA), glyoursodeoxycholic acid (GUDCA), taoursodeoxycholic acid (TUDCA), α -muricholic acid (α MCA), tauro- α -muricholic acid (T α MCA), β -muricholic acid (β MCA), tauro- β -muricholic acid (T β MCA), ω -muricholic acid (ω MCA), tauro- ω -muricholic acid (T ω MCA), hyocholic acid (HCA), glychohyocholic acid (GHCA), taurohyocholic acid (THCA)), and the 5 deuterated forms (cholic acid-2,2,4,4-D4 (CA-D4), glycochenodeoxycholic acid-2,2,4,4-D4 (GCDCA-D4), chenodeoxycholic acid-2,2,4,4-D4 (CDCA-D4), taurocholic acid-2,2,4,4-D4 (TCA-D4)).

LC–MS/MS analysis was performed on a UFLC-XR device (Shimadzu) coupled to a QTRAP® 5500 MS/MS hybrid system, equipped with a Turbo VTM ion source AB Sciex (Foster City, CA, USA). Instrument control, data acquisition and processing were performed using the associated Analyst 1.5.2 software. The separation was carried out on a Symmetry C18 Luna column (250 mm×2.1 mm, particle size 5 µm) (Phenomenex, CA, USA). The oven temperature was set at 30°C. The injection volume was 5 µL. Elution was performed at a flow rate of 500 µL/min with water containing 20 mM ammonium acetate, pH8 as eluent A and acetonitrile as eluent B, employing a 5 min plateau with 28% B and a linear gradient from 28% B to 90% B in 15 min, followed by a 2 min plateau with 90% B. Then, column re-equilibration was performed for 4 min. The injection duty cycle was 26 min, taking into account the column equilibration time.

The mass spectrometer was initially tuned and calibrated using polypropylene glycol, reserpine and Agilent Tuning Mix (all AB Sciex, Foster City, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. Q1 resolution was adjusted to 0.7 ± 0.1 a.m.u. FWHM, referred to as unit resolution. Q3 was also set to unit resolution in multiple reaction monitoring (MRM) mode. MS analysis was carried out in negative ionization mode using an ion spray voltage of 4,500 V. The nebulizer and the curtain gas flows were set at 25 psi using nitrogen. The Turbo VTM ion source was set at 550 °C with the auxiliary gas flow (air) set at 50 psi. For all bile acids, the following MRM transitions were monitored with a dwell time of 50 ms: CA 407.2 → 407.2 (Collision Energy "CE" = 40eV); GCA 464.1 → 74 (CE = 85eV); TCA 514.1 → 80 (CE = 130eV); CDCA 391.2 → 391.2 (CE = 40eV); GCDCA 448.1 → 74 (CE = 80eV); TCDCA 498.1 → 80 (CE = 125eV); DCA 391.2 → 391.2 (CE = 40eV); GDCA 448.1 → 74 (CE = 80eV); TDCA 498.1 → 80 (CE = 130eV); UDCA 391.1 → 391.1 (CE = 40eV); LCA 375.2 → 375.2 (CE = 40eV); TLCA 482.0 → 80 (CE = 130eV); TUDCA 498.1 → 80 (CE = 126eV); αMCA 407.2 → 407.2 (CE = 40eV); TαMCA 514.1 → 80 (CE = 130eV); βMCA 407.2 → 407.2 (CE = 40eV); TβMCA 514.1 → 80 (CE = 130eV); ωMCA 407.2 → ; 407.2 (CE = 40eV); TωMCA 514.1 → 80 (CE = 130eV); HCA 407.3 → 407.3 (CE = 40eV); GHCA 464.1 → 74 (CE = 80eV); THCA 514.1 → 80 (CE = 130eV); GUDCA 448.1 → 74 (CE = 80eV); GLCA 432.1 → 74 (CE = 80eV); CA-D4 411.2 → 411.2 (CE = 40eV); GCDCA-D4 452.1 → 74 (CE = 80eV); GCA-D4 468.1 → 74 (CE = 85eV); CDCA-D4 395.1 → 395.1 (CE = 40eV); TCA-D4 518.2 → 79.8 (CE = 130eV).

- 1 García-Cañaveras JC, Donato MT, Castell JV, Lahoz A. Targeted profiling of circulating and hepatic bile acids in human, mouse, and rat using a UPLC-MRM-MS-validated method. *J Lipid Res* 2012; **53**: 2231–2241.

3. Partie II

3.1. Contexte

La concentration des ABs systémiques augmente après RYGB dans les modèles pré-cliniques (Bhutta et al. 2015) et chez l'Homme (Dutia et al. 2015). Les dynamiques et les mécanismes moléculaires par lesquels le RYGB induit ces variations n'ont pas encore été élucidées.

3.2. Hypothèse

Différentes hypothèses peuvent être émises pour expliquer l'augmentation des concentrations des ABs systémiques (**Figure 71**):

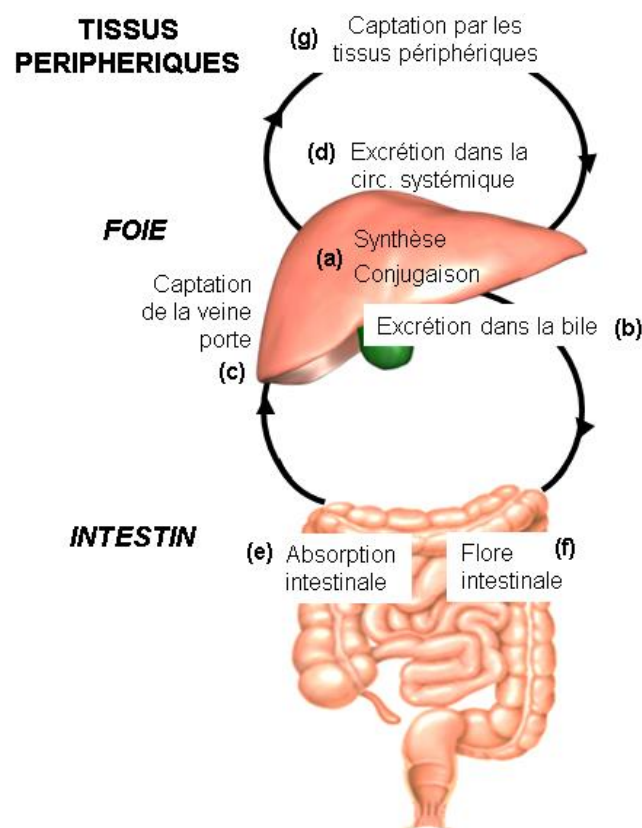


Figure 71. Hypothèses pour expliquer l'augmentation des ABs systémiques après RYGB

- 1) une altération du métabolisme hépatique des ABs:
 - augmentation de la synthèse et/ou conjugaison hépatique (**a**)
 - une augmentation de la sécrétion des ABs dans les canaliculi biliaires (**b**)
 - une diminution de la recapture des ABs de la circulation portale par le foie (**c**)
 - l'apparition de l'excrétion des ABs du foie dans la circulation systémique (**d**)
- 2) une modification du métabolisme intestinal des ABs:

- une augmentation de l'absorption intestinale des ABs (**e**) par voie passive ou par variation de leurs transporteurs (ASBT, IBAT, OST α/β , MRP3)
 - une modification de la flore intestinale, qui se traduit par un changement de la transformation des ABs (**f**) (déconjugaison, transformation des ABs primaires en secondaires,...)
- 3) une altération de la captation des ABs systémiques par les organes périphériques (**g**) (pas l'hypothèse privilégiée dans notre étude).

3.3. Objectif

Dans notre travail nous avons étudié le rôle du **foie** dans les variations d'ABs systémiques induites par le RYGB.

3.4. Stratégie expérimentale:

Modèle d'étude: Gottingen-like minipig: Il s'agit d'un modèle pré-clinique avec une taille proche de l'Homme et une réponse métabolique au RYGB similaire à l'Homme (Caiazzo et al. 2014). De plus, même si son profil d'ABs n'est pas le même que l'Homme, ils ont les mêmes espèces (cf. première étude).

Approche expérimentale:

1) mesure des profils d'ABs dans la veine porte (jamais décrit avant) et dans le sang systémique, au cours d'un repas-test:

Nous avons comparé le profil des ABs du sang de la veine porte, reflet de ce qui est absorbé de l'intestin et qui parvient au foie, aux ABs du sang veineux provenant de l'atrium droit, représentatif de la circulation systémique. Les ABs ont été dosées au cours d'un repas test, moment où la concentration des ABs dans la circulation entero-hépatique est augmentée, chez un modèle pré-clinique de minipig avant et après (15 jours) le RYGB. Cette analyse a été possible grâce à la collaboration avec l'équipe du Pr. F. Pattou, qui a développé un modèle de RYGB chez le minipig, avec le positionnement d'un cathéter dans la veine porte et un cathéter cardiaque à sortie jugulaire, qui offre la possibilité de récupérer du sang portal et du sang provenant du coeur chez l'animal vigile. La composition du pool d'ABs a été analysée par LC-MS/MS en collaboration du CUMA.

2) mesure de l'expression des gènes impliqués dans le métabolisme des ABs dans le foie:

à partir des biopsies hépatiques de minipigs avant et après RYGB

3.5 Résultats et Discussion

Les résultats de ces analyses ont fait l'objet d'un article actuellement soumis pour publication sous forme de Brief Report dans le journal *Diabetes*.

Nous avons observés que l'augmentation des ABs systémiques est due majoritairement à l'augmentation des espèces conjuguées. Après RYGB, la concentration portale des ABs n'est pas augmentée, et en particulier, les espèces conjuguées diminuent. La proportion différente portal-systémique est due à un changement de la réabsorption hépatique des ABs, comme indiqué par la diminution de l'expression génique des transporteurs NTCP, OAT, OATP après RYGB. Ces résultats montrent que le RYGB induit des modifications dans la fonction hépatique qui se traduisent par une recapture sélective des ABs, responsable de l'augmentation des ABs en systémique.

Il reste à explorer l'impact du RYGB sur les autres aspects du métabolisme hépatique des ABs. Notre analyse des variations des ABs avant-après RYGB et de l'expression génique hépatique, donnent des indications sur la réponse adaptative du foie et de l'intestin au RYGB:

(a): L'analyse de l'expression génique des enzymes de la **synthèse** et de la **conjugaison des ABs** montre une diminution de leur expression après RYGB (Cyp7a1, Cyp8b1, BACS). Ce résultat est en cohérence avec l'augmentation de FGF19 qui suit le RYGB (pas analysé dans les minipigs dans notre étude). D'autre part, bien que la Cyp7a1 diminue, nous n'avons pas retrouvé une augmentation de l'expression de FXR et de son gène cible SHP, qui, au contraire, sont aussi diminuées après RYGB.

Pour avoir une réponse concrète sur l'impact du RYGB sur la synthèse des ABs, il faudra évaluer si ces différences au niveau génique se reflètent sur la synthèse protéique, et analyser les taux de synthèse des ABs, par exemple par dosage du C4 circulant, marqueur circulant de la biosynthèse des ABs, et faire une analyse transcriptomique globale.

(b): L'**excrétion** des ABs du foie dans les **canalicules biliaires** est aussi diminuée, comme indiqué par la diminution de l'expression des transporteurs BSEP et MRP2 après RYGB. Outre l'analyse de l'expression protéique de ces transporteurs, doser les ABs dans la bile fournirait la réponse pour ce point (en complément aux données de synthèse hépatique des ABs).

(d): L'**excrétion** des ABs du foie dans la **circulation systémique** semble être diminuée, comme indiqué par la diminution de l'expression (non significative) de MRP3 et OST β après RYGB.

(e): Pour savoir si le RYGB modifie l'**absorption intestinale** des ABs, il faudra analyser si l'expression (génique et protéique) des transporteurs apicaux et baso-latéraux des entérocytes est modifiée après RYGB. L'absence d'une augmentation des ABs dans le sang portal suggère qu'il n'y a pas de changement massif des transporteurs. Par contre, nos résultats montrent une diminution des ABs conjugués en portal après RYGB, ce qui pourrait être la conséquence d'une diminution de l'expression des transporteurs (avec une diminution du passage des ABs conjugués).

(f): La diminution des ABs conjugués en portal après RYGB pourrait aussi être la conséquence d'une augmentation de déconjugation des ABs lors du passage dans l'intestin. Cette diminution refléterait le changement de la flore intestinale. Par contre, si cette hypothèse était vérifiée, l'augmentation de la déconjugaison des ABs devrait entraîner une augmentation des ABs libres, et le pool des ABs totaux en portal ne devrait pas être perturbé, ce qui n'est pas le cas. En effet, les ABs totaux dans la veine porte diminuent (même si ce n'est pas de manière significative), suggérant qu'une altération de l'absorption intestinale serait plus probablement à l'origine de ces résultats. D'autre part, l'analyse du rapport des ABs secondaires/ ABs primaires dans le sang portal a mis en évidence une augmentation des ABs secondaires après RYGB (**Figure 72A**), dû surtout aux ABs libres (**Figure 72B**) et, dans une moindre mesure, in minore mesure, aux ABs glyco-conjugués (**Figure 72C**). Ces différences prouveraient le changement de la flore intestinale après l'opération dans non conditions expérimentales. La manière la plus efficace pour répondre à cette question sera le mappage du microbiote intestinal avant et après RYGB.

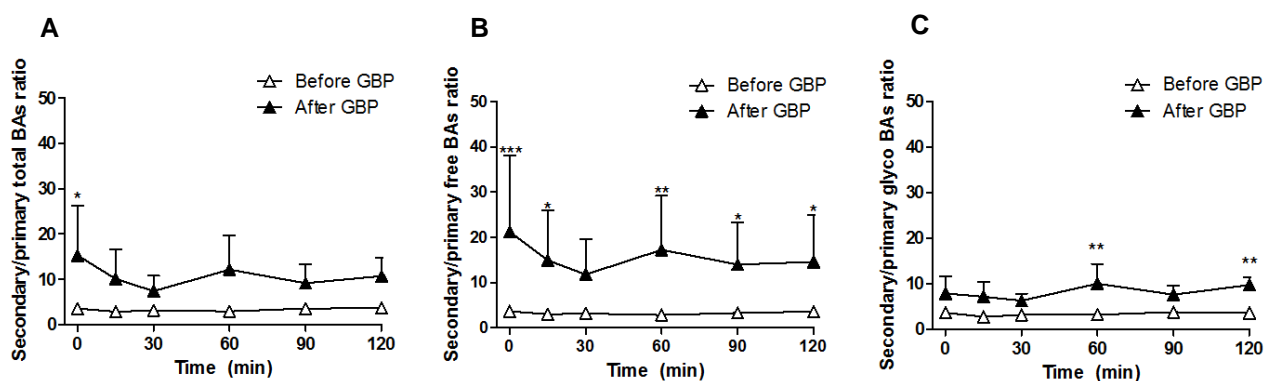


Figure 72. Rapport des concentrations d'AB secondaires/primaires totaux (A), libres (B) et conjugués (C) dans le sang veineux portal avant (triangles blancs) et après (triangles noirs) RYGB. n=4/groupe. Moyenne +/- SEM, Sidak post-hoc test, *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001

L'ensemble de ces données indique la **diminution de la recaptation hépatique de la veine porte** comme responsable principal de l'**augmentation systémique des ABs** après

RYGB. Pour la suite, il reste à étudier quels sont les mécanismes responsables du changement de la fonction hépatique après RYGB:

Quels sont les facteurs qui induisent des modifications au niveau du foie? Puisque la chirurgie bariatrique est une réorganisation importante de l'**intestin**, celui-ci pourrait envoyer des **signaux** au foie avec une **réadaptation** du métabolisme **hépatique** des ABs: est-ce que les altérations du GLP-1, FGF19 et/ou des autres hormones intestinales altérés après le RYGB pourraient être responsables des changements du métabolisme hépatique? Y aurait-il d'autres molécules capables d'induire ces modifications?

Pour répondre à cette question, une **analyse globale du métabolome** et du **protéome** dans le **sang portal** avant et après RYGB pourrait identifier les **facteurs** impliqués dans cette **communication**.

La réponse à cette question fournira une pièce du tableau de la question sous la prospective plus large du comment les modifications anatomiques induites par le RYGB entraînent les effets bénéfiques sur le métabolisme et les modifications de la concentration des ABs en systémique et portale (**Figure 73**). Comprendre la relation causale et temporelle qui lie ces aspects, pourrait permettre le développement de thérapies pour traiter la maladie métabolique sans passer par les actes lourds et invasifs de la chirurgie.

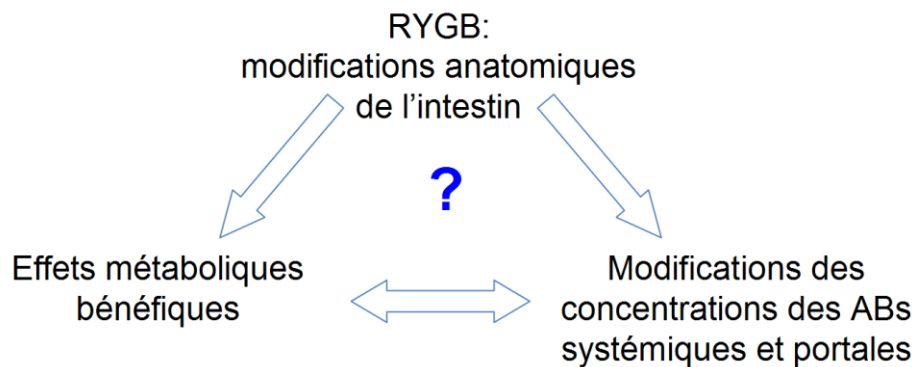


Figure 73. Représentation de l'objectif final des études sur le RYGB et les ABs

Manuscrit 4: Roux-en-Y gastric bypass increases systemic but not portal bile acid concentrations by decreasing hepatic bile acid uptake in minipigs

Roux-en-Y gastric bypass increases systemic but not portal bile acid concentrations by decreasing hepatic bile acid uptake in minipigs

Oscar Chávez-Talavera^{# 1, 2, 3, 4}, Grégory Baud^{# 3, 5, 6}, Valeria Spinelli^{# 1, 2, 3, 4}, Mehdi Daoudi^{3, 5, 6}, Mostafa Kouach⁷, Jean-François Goossens⁷, Emmanuelle Vallez^{1, 2, 3, 4}, Robert Caiazzo^{3, 5, 6}, Mohammed Ghunaim^{3, 5, 6}, Thomas Hubert^{3, 5, 6}, Sophie Lestavel^{1, 2, 3, 4}, Anne Tailleux^{£ 1, 2, 3, 4}, Bart Staels*^{£ 1, 2, 3, 4}, François Pattou^{£ 3, 5, 6}

¹ Univ. Lille, U1011 - EGID, F-59000 Lille, France

² Inserm, U1011, F-59000 Lille, France

³ CHU Lille, F-59000 Lille, France

⁴ Institut Pasteur de Lille, F-59000 Lille, France

⁵ Univ. Lille, U1190 - EGID, F-59000 Lille, France

⁶ Inserm, U1190, F-59000 Lille, France

⁷ Centre Universitaire de Mesures et d'Analyses, Univ Lille, F-59000 Lille France

#, £ These authors equally contributed to the work

* Corresponding author: Prof Bart STAELS

Institut Pasteur de Lille, 1 rue du professeur Calmette, BP245, 59019 LILLE - France

Tel : +33320877388 - Fax : +33320877360

e-mail : Bart.Staels@pasteur-lille.fr

Word count (main text): 1381

Number of figures: 2

Number of tables: 1

Abstract

Roux-en-Y gastric bypass (RYGB) surgery is widely used in the management of severe obesity. RYGB improves metabolism independent of weight loss by still unknown mechanisms. Bile acids (BA) are good candidates to explain this benefit, since they regulate metabolic homeostasis and their systemic concentrations increase upon RYGB. Here we analyzed the mechanisms underlying the increase in systemic BA concentrations after RYGB and the role of the liver therein. To this aim, we used the Göttingen-like minipig, a human-size mammalian model, which allows continuous sampling and simultaneous analysis of pre-hepatic portal vein and systemic blood. BA concentrations and pool composition were measured in portal blood, containing intestinal reabsorbed BA and compared to systemic blood during a standardized meal test before and after RYGB. Systemic total BA concentrations increased after RYGB, due to an increase in conjugated BAs. Interestingly, the ratio of portal:systemic conjugated BA decreased after RYGB, indicating a role for the liver in systemic BA concentrations changes. In line, hepatic expression of BA transporter genes decreased after RYGB. Our results show that the increase in systemic BA after surgery is due to decreased selective hepatic recapture. Thus, alterations in hepatic function contribute to the increase in systemic BA after RYGB.

TEXT

Introduction

Roux-en-Y gastric bypass (RYGB) is one of the most widely used bariatric surgery techniques to treat severe morbid obesity. In addition to weight loss, RYGB also ameliorates glucose homeostasis and fatty liver disease, at least in part, in a weight change-independent manner (1,2). The mechanisms underlying the metabolic

improvements after RYGB are complex and not yet fully understood. Among the hypotheses are qualitative as well as quantitative changes in bile acid (BA) metabolism and signaling (3,4). Systemic BA concentrations consistently increase after RYGB in clinical studies and animal models (5,6). Moreover, bile duct diversion alone reproduces the metabolic effects of RYGBP on glucose metabolism in rats (7) and mice (8) and has beneficial effects on insulin sensitivity in T2D patients (9).

BAs are synthesized and conjugated in the liver, secreted into the duodenum after meal ingestion to facilitate intestinal lipid absorption, reabsorbed in the ileum by both passive and active mechanisms and, finally, transported back to the liver by the portal vein. Most BAs are recaptured by the hepatocytes via transporters, such as the sodium/bile acid cotransporter (NTCP), the organic anion transporter (OAT), the organic anion-transporting polypeptide (OATP). However, a fraction of BAs escapes hepatic uptake and appears in the systemic circulation (10). BAs are signaling molecules which modulate the activity of the nuclear farnesoid X receptor (FXR) and the plasma membrane receptor TGR5, both involved in metabolic homeostasis. Thus, quantitative and qualitative changes in BA concentrations may change the activity of these receptors and potentially regulate metabolic pathways (11). As such, studies in mice have recently pointed to the BA/FXR signaling pathway participating in the beneficial metabolic effects of bariatric surgery (12).

To study the mechanisms underlying the increase in peripheral BA concentrations after RYGB, BA concentrations and pool composition were analyzed in pre-hepatic and systemic circulation during a meal test, when BAs undergo entero-hepatic recirculation. Experiments were performed in Göttingen-like minipigs, which present similar hormonal responses as humans to RYGB (13). This experimental model allows

continuous sampling and simultaneous analysis of pre-hepatic portal vein and systemic blood.

Materials and methods

***In vivo* experiments**

Minipig animal model and surgical procedures

RYGBP was performed on adult Göttingen-like non-obese non-diabetic minipigs as previously described (13). Briefly, animals were fasted overnight and RYGBP performed under general anaesthesia by midline laparotomy. For the experiment, animals were pre-medicated with intramuscular injection of ketamine (Ketamine1000[®], Virbac, France, 10 mg/kg of body weight) and xylazine (Sédaxylan[®], CEVA Santé Animale, France, 2.5 mg/kg of body weight). A 4% concentration of isoflurane (Aerrane[®], Baxter, France) was used during the surgery. A small gastric pouch (30-50 ml) was constructed and the intestine was divided at seventy centimeters from the duodeno-jejunal junction, using a linear staplers device. The jejunal end of the Roux-en-Y limb was brought up and anastomosed to the gastric pouch by a linear stapler (Ethicon, Issy-les-Moulineaux, France). After surgery, minipigs were closely monitored and treated by fentanyl transdermal (Recuvyra[®] 2,6 mg/kg, Eli Lilly, Neuilly-sur-Seine, France). Water intake started on the first postoperative day, and ad libitum oral feeding was allowed 72 hours after surgery. The surgical interventions were performed in the University and Hospital Department for Experimental Research of the Lille 2 University, France, in accordance with French regulations for animal experimentation [approval code: CEEA75 152012].

Liver biopsy sampling

The right-lobe biopsies of liver were taken by laparotomy under general anaesthesia from 16h-fasted minipigs before surgery (during RYGBP) and 4.5 ± 1.5 weeks after surgery. All tissues were snap frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until RNA and protein extractions.

Meal tolerance tests

Single-lumen radiopaque silicone catheters (Hickman; Bard, Trappes, France) were placed in the portal vein and in the right atrium of minipigs and then exteriorized on the neck of the animals to allow repeated blood sampling. After an overnight fasting, each animal was submitted to a 10-min meal test using a nasogastric tube before surgery and within the first month after surgery. The meal consisted on 200 ml Ensure Plus® (Abott France, Rungis, France) and a 20 g solid energy bar Ovomaltine® (Ovomaltine France, Cergy-Pontoise, France). It contained overall 387 kcal, 13 g of fat, 15 g of protein and 22 g of simple carbohydrates (including sucrose and approximately 10 g of glucose and 32 g starch). The systemic and portal venous blood samples were obtained at 0, 15, 30, 60, 90 and 120 min from each catheter.

Portal and systemic blood sampling

Before and after surgery, venous blood samples were collected in $K_2\text{EDTA}$ plastic blood collection tubes (BD Vacutainer™, New Jersey, US) from the right atrium and portal catheters after 16 hours of fasting. After centrifugation (5,000 rpm for 10 min), plasma was immediately separated and stored at -80°C until analyzed.

Bile acid analysis

Bile acid concentrations were determined in plasma by phase liquid chromatography associated to tandem mass spectrometry (LC-MS/MS, in Multiple Reaction Monitoring (MRM) mode) after extraction by protein precipitation as previously described (14). The use of internal deuterated standards allowed the quantification.

RNA extraction and quantification by qPCR

Total RNA was extracted from liver biopsies using Extract-All Reagent (Eurobio, Courteboeuf, France) according to the manufacturer's protocol. After DNase treatment (Fermentas, St Rémy Les Chevreuse, France), total RNA (0.5–1 mg) was reverse transcribed using HighCapacity Multiscribe Reverse Transcriptase (Applied Biosystems, St Aubin, France) according to the manufacturer's protocol. qPCR with cDNA from reverse transcription was performed using the Master MIX SYBR Green Brilliant Fast III (Agilent) on a MX4000 apparatus (Stratagene) using specific oligonucleotides (see Table 1). The results are presented using the DD_{Ct} method and normalized to a reference gene (cyclophilin). Controls were set at 1 and all conditions were expressed comparatively to control.

Statistical analysis

Statistical significance was analyzed as indicated by two-way repeated measures ANOVA and Sidak post hoc test using GraphPad-Prism statistics software. Differences were considered significant when $p < 0.05$.

Results and discussion

Post-prandial BAs were measured in conscious animals in pre-hepatic portal venous blood (VB), which contains the BAs reabsorbed from the intestine, and in systemic VB, via catheters placed in the portal vein and right atrium, respectively. Similar as in humans (4,9,15), fasting and post-prandial total BA concentrations increased in systemic VB after RYGB (Figure 1A). This increase was due to a significant elevation in conjugated BAs (Figure 1B), whereas the change in free BAs showed larger inter-individual variations (Figure 1C), as recently reported (5). Post-prandial total BA concentrations in portal VB decreased slightly after surgery (Figure 1D) due to a significant reduction in conjugated BA (Figure 1E), whereas free BAs in portal VB did not change after RYGB (Figure 1F). The changes in portal VB suggest that the intestine is also involved in the RYGB-induced BA concentration changes, possibly via alterations in gut flora (5) or intestine BA transporter expression (6).

Calculation of the portal/systemic BA ratio before and after RYGB evidenced a role for the liver in the changes in systemic BA concentrations. RYGB surgery significantly decreased the fasting and post-prandial portal/systemic ratio of total BA (Figure 1G). This decrease was almost exclusively due to conjugated BAs (Figure 1H) and less to free BAs (Figure 1I). In line, the Area Under the Curve (AUC) of conjugated BA concentrations during the meal test decreased after RYGB in portal VB (Figure 2A to C), which may point to an effect of RYGB on transporter-mediated conjugated BA re-

uptake in the intestine. Interestingly, the AUCs of systemic BA concentrations increased (Figure 2A to C), again mainly due to a significant increase in the AUC of conjugated BAs, notwithstanding their decrease in portal VB (Figure 2B). These observations strongly suggest that quantitative and qualitative alterations in hepatic BA recapture occur after RYGB. To test this hypothesis, the expression of BA recapture transporter genes, such as *NTCP*, *OAT*, and *OATP* was measured in liver biopsies taken before and after RYGB. The expression of all three genes was reduced after RYGB, with a strongest effect on *NTCP* expression which mainly transports conjugated BAs (Figure 2D).

Our study compares for the first time BA changes in portal vs systemic blood during a meal test, before and after RYGB, in a human-size mammalian model. Altogether our results suggest that alterations in hepatic function contribute to the increase in systemic BA after RYGB, and that decreased hepatic BA recapture may be a mechanism involved in these modifications.

Figures legends

Figure 1. Total (A, D), conjugated (B, E), and free (C, F) bile acid concentrations during a meal test in systemic (A, B, C) and portal (D, E, F) venous blood, in minipigs (n=4) before and after Roux-en-Y gastric bypass. Portal/systemic total (G), conjugated (H) and free (I) BA ratio before and after RYGB. Values are expressed as means \pm SEM. Repeated measures two-way ANOVA ^{\$}p<0.05, ^{\$\$}p<0.01 and Sidak post-hoc test, *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

Figure 2. AUC calculated from concentration curves of total (A), free (B) and conjugated bile acids (C) during a meal test in systemic venous blood and portal venous blood in minipigs (n=4) before and after Roux-en-Y gastric bypass. Expression of genes (D) involved in BA recapture (*NTCP*, *OAT*, *OATP*) in pig liver biopsies before (n=7) and after (n=8) RYGB. Results are normalized to cyclophilin expression. Values are expressed as means \pm SEM. Student-t test, *p < 0.05, **p < 0.01.

ACKNOWLEDGMENTS

Authors contributions: Oscar Chávez-Talavera: Analysis and interpretation of data, drafting of the manuscript; Grégory Baud: Surgery, Acquisition of data; Valeria Spinelli: Analysis and interpretation of data, drafting of the manuscript; Mehdi Daoudi : Acquisition of data, Analysis and interpretation of data; Mostafa Kouach: Biological analysis; Jean-François Goossens :Supervision of biological analysis; Emmanuelle Vallez : Technical support; Robert Caiazzo: Surgery; Mohamed Guhnaim : Surgery; Thomas Hubert : Animal facility organisation; Sophie Lestavel: Analysis and interpretation of data, drafting of the manuscript; Anne Tailleux : Analysis and interpretation of data; drafting of the manuscript; Bart Staels: Study supervision; François Pattou: Study supervision.

Acknowledgments: We thank Audray Quenon, Amandine Descat, Bruno Derudas, Arnold Dive, Michel Pottier and Mathieu Fourdrinier for excellent technical assistance.

Guarantor: Bart Staels takes responsibility for the content of the article.

Funding/financial support: V.S. was supported by a grant from the Fondation pour la Recherche Médicale (FRM) Grant FDT20140930804. This work was supported by Grants from Région Nord-Pas de Calais, FEDER, INSERM, A.N.R. (FXREn), Société Francophone du Diabète (SFD), Université Lille Nord de France and European Genomic Institute for Diabetes (EGID, ANR-10-LABX-46), Fondation de l'Avenir - Etude N°ET2-665 and European Commission. B.S. is a member of the Institut Universitaire de France.

Prior publication of the study in abstract form: No

References

1. Buchwald H, Estok R, Fahrbach K, Banel D, Jensen MD, Pories WJ, et al. Weight and type 2 diabetes after bariatric surgery: systematic review and meta-analysis. *Am J Med.* 2009 Mar;122(3):248–56.e5.
2. Caiazzo R, Lassailly G, Leteurtre E, Baud G, Verkindt H, Raverdy V, et al. Roux-en-Y gastric bypass versus adjustable gastric banding to reduce nonalcoholic fatty liver disease: a 5-year controlled longitudinal study. *Ann Surg.* 2014 Nov;260(5):893–8; discussion 898–9.
3. Sweeney TE, Morton JM. Metabolic surgery: action via hormonal milieu changes, changes in bile acids or gut microbiota? A summary of the literature. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2014 Aug;28(4):727–40.
4. Penney NC, Kinross JM, Newton RC, Purkayastha S. The role of bile acids in reducing the metabolic complications of obesity after bariatric surgery: A systematic review. *Int J Obes* 2005. 2015 Jun 17;
5. Tremaroli V, Karlsson F, Werling M, Ståhlman M, Kovatcheva-Datchary P, Olbers T, et al. Roux-en-Y Gastric Bypass and Vertical Banded Gastroplasty Induce Long-Term Changes on the Human Gut Microbiome Contributing to Fat Mass Regulation. *Cell Metab.* 2015 Aug 4;22(2):228–38.
6. Bhutta HY, Rajpal N, White W, Freudenberg JM, Liu Y, Way J, et al. Effect of Roux-en-Y Gastric Bypass Surgery on Bile Acid Metabolism in Normal and Obese Diabetic Rats. *PloS One.* 2015;10(3):e0122273.
7. Goncalves D, Barataud A, De Vadder F, Vinera J, Zitoun C, Duchampt A, et al. Bile Routing Modification Reproduces Key Features of Gastric Bypass in Rat. *Ann Surg.* 2015 Jan 8;

8. Flynn CR, Albaugh VL, Cai S, Cheung-Flynn J, Williams PE, Brucker RM, et al. Bile diversion to the distal small intestine has comparable metabolic benefits to bariatric surgery. *Nat Commun.* 2015;6:7715.
9. Ferrannini E, Camastra S, Astiarraga B, Nannipieri M, Castro-Perez J, Xie D, et al. Increased Bile Acid Synthesis and Deconjugation after Biliopancreatic Diversion. *Diabetes.* 2015 May 26;
10. Mazuy C, Helleboid A, Staels B, Lefebvre P. Nuclear bile acid signaling through the farnesoid X receptor. *Cell Mol Life Sci.* 2014 Dec 16;72(9):1631–50.
11. Lefebvre P, Cariou B, Lien F, Kuipers F, Staels B. Role of bile acids and bile acid receptors in metabolic regulation. *Physiol Rev.* 2009 Jan;89(1):147–91.
12. Ryan KK, Tremaroli V, Clemmensen C, Kovatcheva-Datchary P, Myronovych A, Karns R, et al. FXR is a molecular target for the effects of vertical sleeve gastrectomy. *Nature.* 2014 May 8;509(7499):183–8.
13. Verhaeghe R, Zerrweck C, Hubert T, Tréchet B, Gmyr V, D’Herbomez M, et al. Gastric bypass increases postprandial insulin and GLP-1 in nonobese minipigs. *Eur Surg Res Eur Chir Forsch Rech Chir Eur.* 2014;52(1-2):41–9.
14. García-Cañaveras JC, Donato MT, Castell JV, Lahoz A. Targeted profiling of circulating and hepatic bile acids in human, mouse, and rat using a UPLC-MRM-MS-validated method. *J Lipid Res.* 2012 Oct;53(10):2231–41.
15. Dutia R, Embrey M, O’Brien S, Haeusler RA, Agénor KK, Homel P, et al. Temporal changes in bile acid levels and 12 α -hydroxylation after Roux-en-Y gastric bypass surgery in type 2 diabetes. *Int J Obes* 2005. 2015 May;39(5):806–13.

Figure 1

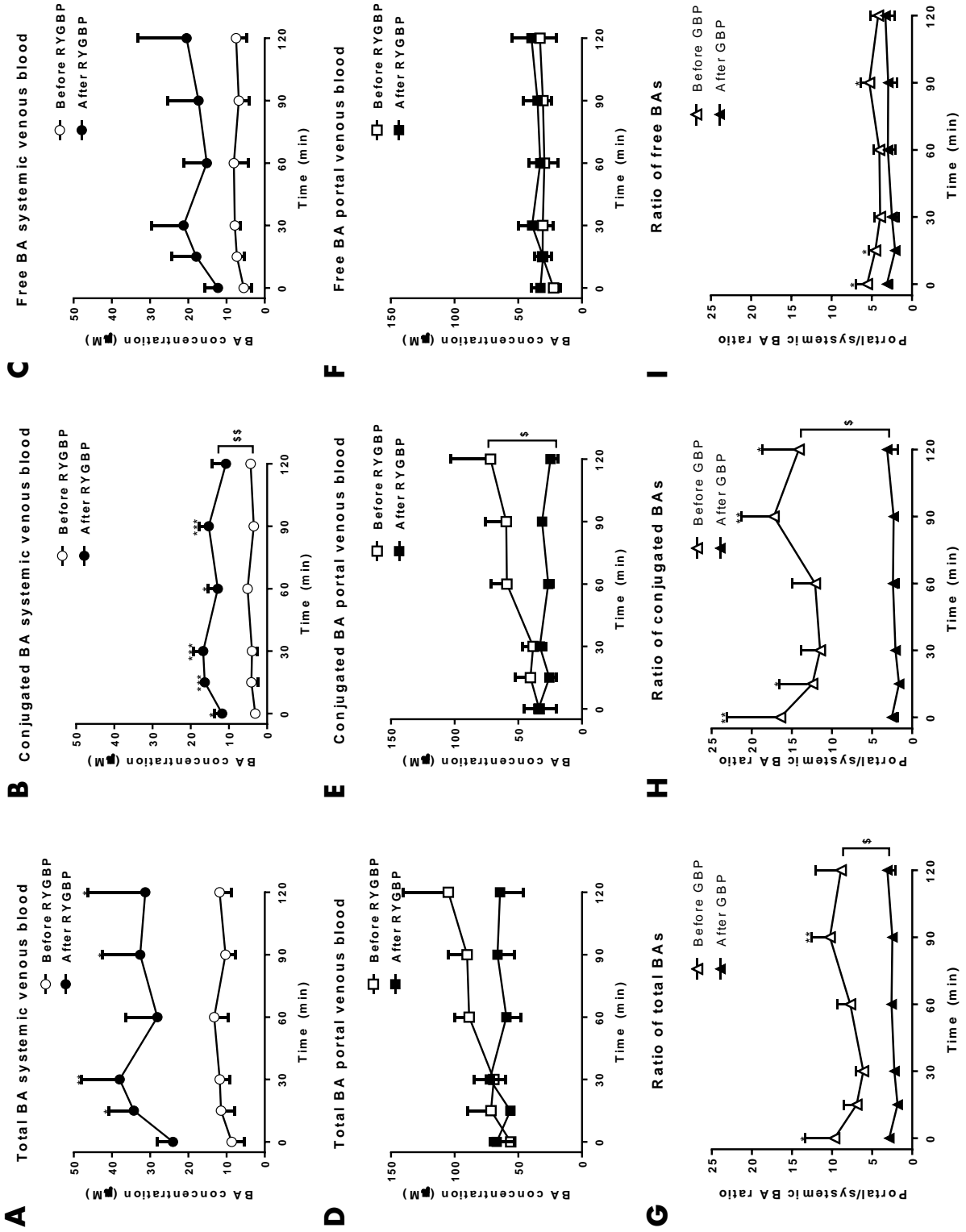
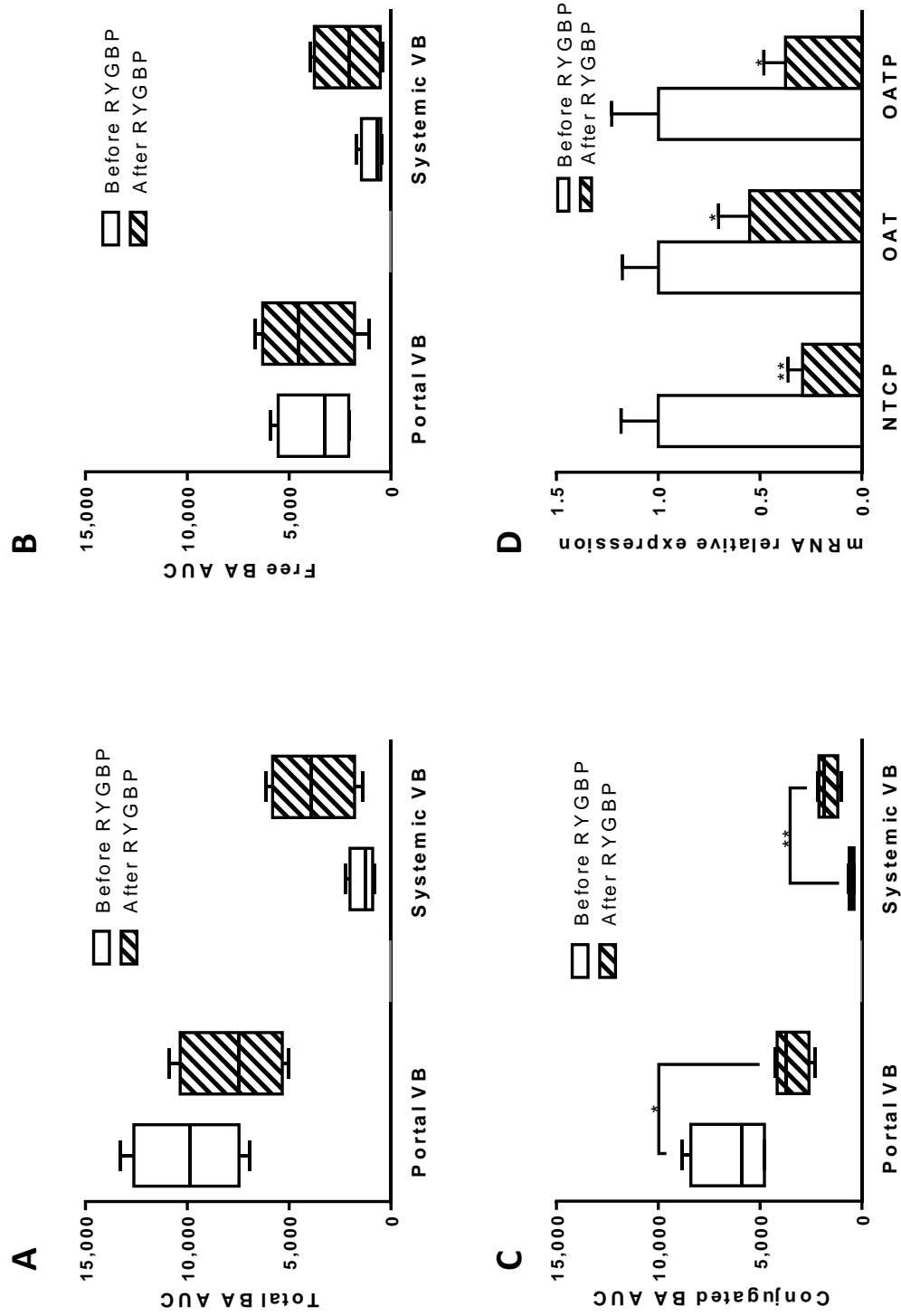


Figure 2



Supplemental material: Materials and methods

In vivo experiments

Minipig animal model and surgical procedures

RYGBP was performed on adult Göttingen-like non-obese non-diabetic minipigs as previously described ¹. Briefly, animals were fasted overnight and RYGBP performed under general anaesthesia by midline laparotomy. For the experiment, animals were pre-medicated with intramuscular injection of ketamine (Ketamine1000[®], Virbac, France, 10 mg/kg of body weight) and xylazine (Sédaxylan[®], CEVA Santé Animale, France, 2.5 mg/kg of body weight). A 4% concentration of isoflurane (Aerrane[®], Baxter, France) was used during the surgery. A small gastric pouch (30-50 ml) was constructed and the intestine was divided at seventy centimeters from the duodeno-jejunal junction, using a linear staplers device. The jejunal end of the Roux-en-Y limb was brought up and anastomosed to the gastric pouch by a linear stapler (Ethicon, Issy-les-Moulineaux, France). After surgery, minipigs were closely monitored and treated by fentanyl transdermal (Recuvyra[®] 2,6 mg/kg, Eli Lilly, Neuilly-sur-Seine, France). Water intake started on the first postoperative day, and ad libitum oral feeding was allowed 72 hours after surgery. The surgical interventions were performed in the University and Hospital Department for Experimental Research of the Lille 2 University, France, in accordance with French regulations for animal experimentation [approval code: CEEA75 152012].

Liver biopsy sampling

The right-lobe biopsies of liver were taken by laparotomy under general anaesthesia from 16h-fasted minipigs before surgery (during RYGBP) and 4.5 ± 1.5 weeks after surgery. All tissues were snap frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until RNA and protein extractions.

Meal tolerance tests

Single-lumen radiopaque silicone catheters (Hickman; Bard, Trappes, France) were placed in the portal vein and in the right atrium of minipigs and then exteriorized on the neck of the animals to allow repeated blood sampling. After an overnight fasting, each animal was submitted to a 10-min meal test using a nasogastric tube before surgery and within the first

month after surgery. The meal consisted on 200 ml Ensure Plus® (Abott France, Rungis, France) and a 20 g solid energy bar Ovomaltine® (Ovomaltine France, Cergy-Pontoise, France). It contained overall 387 kcal, 13 g of fat, 15 g of protein and 22 g of simple carbohydrates (including sucrose and approximately 10 g of glucose and 32 g starch). The systemic and portal venous blood samples were obtained at 0, 15, 30, 60, 90 and 120 min from each catheter.

Portal and systemic blood sampling

Before and after surgery, venous blood samples were collected in K_2 EDTA plastic blood collection tubes (BD Vacutainer™, New Jersey, US) from the right atrium and portal catheters after 16 hours of fasting. After centrifugation (5,000 rpm for 10 min), plasma was immediately separated and stored at -80°C until analyzed.

Bile acid analysis

Plasma bile acid extraction

The stock solutions of the individual BAs were prepared separately in methanol (MeOH) at a concentration range from 1.8 to 6.6 mmol/L and stored at -20°C . Calibration standards were prepared by combining appropriate volumes of each BA stock solution and MeOH. The calibration range was from 1.5 to 2000 nmol/L of each BA in the final solution. Internal standard (IS) solution encompasses 5 deuterated BAs (D4-CA, D4-GCA, D4-TCA, D4-CDCA, D4-GCDCA) at 0.5 μM in MeOH.

Plasma samples were deproteinized as previously described². Briefly, 50 μL of plasma was mixed with 25 μL IS and 225 μL cold MeOH, vortexed for 30 sec, stored for 20 min at -20°C . After centrifugation at 10,000 g for 10 min at $+4^{\circ}\text{C}$, the supernatant was evaporated. The pellet was then redissolved in MeOH/water (v/v) and injected in the LC-MS/MS system for BAs separation and quantification. A BA extraction $>95\%$ was measured with the addition of BA standards in plasma samples before and after the deproteinization procedure.

Bile acid concentration assessment

LC–MS/MS analysis was performed on a UFLC-XR device (Shimadzu) coupled to a QTRAP® 5500 MS/MS hybrid system, equipped with a Turbo VTM ion source AB Sciex (Foster City, CA, USA). Instrument control, data acquisition and processing were performed using the associated Analyst 1.5.2 software. The separation was carried out on a Symmetry C18 Luna column (250 mm×2.1 mm, particle size 5 µm) (Phenomenex, CA, USA). The oven temperature was set at 30°C. The injection volume was 5 µL. Elution was performed at a flow rate of 500 µL/min with water containing 20 mM ammonium acetate, pH8 as eluent A and acetonitrile as eluent B, employing a 5 min plateau with 28% B and a linear gradient from 28% B to 90% B in 15 min, followed by a 2 min plateau with 90% B. Then, column re-equilibration was performed for 4 min. The injection duty cycle was 26 min, taking into account the column equilibration time. The inter- and intra- day precisions of the BA concentration assay are <15%, except for HCA and LCA (<30%).

RNA extraction and quantification by qPCR

Total RNA was extracted from liver biopsies using Extract-All Reagent (Eurobio, Courteboeuf, France) according to the manufacturer's protocol. After DNase treatment (Fermentas, St Re'my Les Chevreuse, France), total RNA (0.5–1 mg) was reverse transcribed using HighCapacity Multiscribe Reverse Transcriptase (Applied Biosystems, St Aubin, France) according to the manufacturer's protocol. qPCR with cDNA from reverse transcription was performed using the Master MIX SYBR Green Brilliant Fast III (Agilent) on a MX4000 apparatus (Stratagene) using specific oligonucleotides (see Table 1). The results are presented using the DD_{Ct} method and normalized to a reference gene (cyclophilin). Controls were set at 1 and all conditions were expressed comparatively to control.

Statistical analysis

Statistical significance was analyzed as indicated by two-way repeated measures ANOVA and Sidak post hoc test using GraphPad-Prism statistics software. Differences were considered significant when $p < 0.05$.

Table 1: qPCR primer sequences

Species	Gene	Forward	Reverse
	<i>NTCP</i>	GATGGGACCCTGAAGGACAAGG	CCACGTTGAGGACAGAGAGCAC
<i>Sus scrofa</i>	<i>OATP</i>	TCCGATCCTTGGCTTTTCACTGG	AAGCACCAACCCAACGAGAGTC
	<i>OAT</i>	GCTACTTGATACGGGACTGGCG	TACCTATGGGCGTCCTCCACAC

Supplemental figure legend

Supplemental Figure 1. Portal/systemic total (A), conjugated (B) and free (C) BA ratio before and after RYGBP. Values are expressed as means \pm SEM. Repeated measures two-way ANOVA $^{\$}p<0.05$ and Sidak post-hoc test, $*p<0.05$, $**p<0.01$.

References

1. Verhaeghe Ret al. Eur Surg Res 2014; 52: 41–49.
2. García-Cañaveras et al. J Lipid Res 2012; 53: 2231-2241.

CONCLUSION

Au cours de ma thèse j'ai travaillé avec des modèles précliniques (rongeurs, minipig) pour étudier les mécanismes d'action des ABs dans la cellule bêta via leur récepteur FXR, et les mécanismes sous-jacents à leur changements après RYGB. Un élément émergeant des deux études est la nécessité impérative de procéder avec rigueur et transposer avec précaution les résultats obtenus à l'Homme, pour des raisons qui vont des limitations techniques des souches transgéniques aux différences inter-espèces.

Toutefois, concernant notre étude d'inactivation de FXR, si le rôle de FXR dans la cellule bêta était si crucial, on aurait dû s'attendre un phénotype majeur par rapport à la souris WT, avec des ampleurs variables, mais quand même clair. Le déficit de sécrétion d'insuline observé chez la souris FXRKO pourrait être le résultat de l'absence de FXR dans l'îlot quand ceci est exposé aux facteurs qui caractérisent le phénotype de la souris FXRKO (TG élevés, LDL-C élevées, augmentation des ABs, dérégulation de GLP-1...) mais qui ne sont plus présents chez la souris FXRKO- β cell. Il est ainsi possible que la contribution à la régulation du métabolisme du glucose par FXR dans la cellule bêta pancréatique soit marginale, et il serait intéressant connaître sa fonction spécifiquement dans le tissu adipeux et dans l'intestin. Le développement de modèles tissu-spécifiques dans l'adipocyte et dans la cellule entero-endocrine L permettront d'élucider la contribution de FXR au métabolisme du glucose dans ces deux tissus.

Les modèles animaux restent des éléments incontournables dans la recherche, qui peuvent fournir des fondements conceptuels dans la compréhension des dynamiques et mécanismes moléculaires chez l'Homme. En effet, si d'une part certaines observations ne sont pas transposables d'un modèle préclinique à l'Homme (comme c'est le cas de l'activation de FXR par les espèces de l'acide murocholique, spécifiques du rongeur), d'autres mécanismes sont communs à l'Homme et aux modèles précliniques (comme l'activation du TAB par les ABs, montré dans une étude clinique et chez la souris) en renforçant leur importance dans les études mécanistiques.

Ainsi, l'adaptation hépatique que nous avons identifiée chez le minipig après RYGB, est un mécanisme qui, si vérifié chez l'Homme, contribuera à l'avancement de la compréhension des mécanismes en jeu chez l'Homme après le RYGB et confirmera l'utilité de ce modèle préclinique pour les études des changements métaboliques après intervention, en ajoute à l'avantage que le minipig offre par rapport aux rongeurs en termes de similarité de pool des ABs, ce qui permet de mieux établir un parallèle fonctionnel avec l'Homme.

ANNEXES

Annexe 1: isolement d'ARN d'îlot pancréatique par Micro Dissection Laser

En raison de sa fonction dans la digestion des aliments, le pancréas est un tissu riche en enzymes de dégradation, et donc en RNase. Ces enzymes s'activent quand les fonctions physiologiques d'un organisme viennent à manquer. Par conséquent, pendant la manipulation et la récupération du pancréas de l'animal, les ARN de l'îlot peuvent être rapidement dégradés si des précautions ne sont pas prises. Ainsi, après avoir essayé la mise au point des protocoles classiques d'extraction des ARN, mais avec des résultats qualitatifs peu satisfaisants, nous avons mis en œuvre un protocole d'isolement d'îlots par Micro Dissection Laser qui nous permet d'obtenir des quantités d'ARN relativement faibles (2-10 ng sur la base du tissu récupéré) mais très pures et de bonne qualité (sans dégradation).

La Micro Dissection Laser (MDL) est une méthode qui concilie un domaine plus technique comme celui de l'histologie avec un domaine plus complexe et délicat, tels que la biologie moléculaire. Il s'agit d'une méthode pour isoler des sous-populations de cellules d'un tissu en le visualisant par microscopie. Cette technologie permet d'isoler et récolter les cellules d'intérêt en coupant les cellules indésirables, pour donner des populations cellulaires enrichies et histologiquement pures. La MDL permet d'extraire les cellules d'intérêt à partir d'une coupe histologique montée sur une lame.

La procédure pour l'obtention des ARN d'îlots se fait sur trois étapes principales:

- 1. Récupération du pancréas et préparation des coupes à micro-disséquer**
- 2. Micro Dissection Laser**
- 3. Extraction des ARN**

1. Récupération du pancréas et préparation des coupes à micro-disséquer

Au moment de la récupération, le pancréas doit être congelé immédiatement sur azote liquide (mais sans contact direct) par inclusion dans un milieu adapté à ce traitement (NEG 50™, Richard Allan Scientific). Les échantillons peuvent être conservés à -80°C ou tout de suite utilisés.

Pour préserver l'intégrité du matériel biologique, il est très important que les échantillons ne décongèlent jamais lors de la manipulation de MDL. De plus, la manipulation de MDL prévoit des étapes à température ambiante; pour cette raison, la température de la salle de travail doit être d'environ 15-16°C, ou dans tous les cas jamais supérieure au 18°C.

Le pancréas est coupé en sections histologiques à monter sur lame à l'aide d'un cryostat (MICROM HM 560, Thermo Scientific). Les paramètres de coupe et de température doivent être adaptés au tissu à couper, et sont déterminés en fonction de ses propriétés (par exemple la composante en graisse). Pour le pancréas, nous avons mis au point ces paramètres:

Température de la lame: -16°C

Température du support d'échantillon: -14°C

Épaisseur de la coupe: 10 µm

Après avoir identifié une région du pancréas riche en îlots pancréatiques, les coupes sont transférées sur une lame de polyéthylène naftalate (Arcturus®, PEN Membrane Frame Slides, Excilone), qui est le support le plus souvent utilisé en micro-disséction. Ce matériel est adapté à ces manipulations car offre une meilleure uniformité de la capture et la récolte des cellules, et facilite l'élimination complète du matériel biologique de la membrane au moment de l'isolement du tissu.

La lame (avec les coupes) est extraite du cryostat et laissée décongeler à l'air pour quelques secondes avant d'être mise dans deux bains d'éthanol 100% (Carlo Erba) successifs (1 min chacun), puis deux bains successifs dans le xylène (Carlo Erba). Ces lavages ont respectivement le but d'inactiver l'activité enzymatique par déshydratation et dégraisser les coupes (car le gras limite l'efficacité des lasers).

Une fois sortie du xylène et enlevés les restes du milieu de support, les coupes séchées sont prêtes à être micro-disséquées. La durée entre la sortie de la lame du xylène à la fin de la manipulation de récupération des îlots, ne doit pas dépasser 20 minutes, pour préserver l'intégrité du matériel biologique.

2. La Micro Dissection Laser des îlots pancréatiques

L'instrument de MDL est constitué d'un microscope associé à un dispositif de lasers commandés par logiciel (**Figure 74A**). La sélection des cellules à extraire se fait à l'aide d'un support informatique par lequel l'opérateur indique au laser où et comment couper.

Cette technologie utilise des capsules (Arcturus® CapSure® Macro LCM Caps, Applied Biosystem, Excilone), supports plastiques recouverts d'une matrice de silicone inerte (qui n'interfère pas avec l'analyse suivante), qui permettent de capturer les cellules collectées. La capsule est positionnée à l'aide de l'instrument sur la région de la coupe souhaitée. L'opérateur sélectionne la région à couper à l'aide de l'écran et du logiciel (Arcturus XT Software). Un rayon laser à énergie ultraviolet coupe le bord de cette région par photo-

fragmentation, et un deuxième rayon à énergie infrarouge induit la formation d'un composite polymère-cellule entre la lame PEN et la section de tissu, en collant le tissu à la capsule. Ainsi, le tissu d'intérêt est collecté avec la récupération de la capsule (**Figure 74B**).



Figure 74. A. Appareil pour la Micro Dissection Laser B. Représentation de la méthode d'isolement

3. L'isolement et l'amplification des ARN

La capsule est positionnée en face d'un tube contenant 50 µl de tampon de lyse (Extraction Buffer, Arcturus® PicoPure® RNA Isolation Kit, Applied Biosystem, Excilone), qui est inversé de façon à ce que le tampon soit en contact avec les tissus isolés sur le capuchon, et incubé à 42°C pour 30 minutes, permettant la libération des ARN. Les volumes sont récupérés et déposés sur colonne pour extraction selon les instructions du kit. Les ARN sont concentrés dans un volume de 10 µl d'eau RNase free.

Les ARN sont dosés au Bioanalyser (Agilent 2100 Bioanalyser), qui permet de calculer les concentrations et le RIN (RNA Integrity Number), un index d'intégrité des ARN calculé par des algorithmes à partir de la trace d'électrophorèse de l'ARN analysé, qui tiennent compte du rapport entre les signaux du ARNr 28S et 18S. Le RIN se présente sous forme d'un nombre compris entre 0 et 10: plus le RIN est élevé, meilleure est la qualité de l'ARN (**Figure 75A et B**). L'analyse est faite à l'aide de puces micro-fluidiques (RNA Pico Chips) sur lesquelles les échantillons sont chargés selon les instructions du kit (Agilent RNA 6000 Pico Reagents).

Une fois la concentration connue, le volume correspondant à la quantité d'ARN souhaitée peut être récupéré pour :

- **Dépôt direct sur puces Agilent** pour l'analyse transcriptomique globale (ARRAY Agilent Single Color Souris). Cette technique de puces ne prévoit pas une amplification des ARN, et la quantité de matériel du départ doit être d'environ 30 ng par échantillon. Pour obtenir une

telle quantité d'ARN d'îlots micro-disséqués, il faut compter environ une journée de travail par souris. Nous avons employé cette procédure pour les puces sur les îlots pancréatiques de la souris FXRKO totale et WT (n=8 au total). La surface d'îlots pancréatiques récupérés (mesurée en unités arbitraires) et le RIN pour chaque échantillon analysé sont rapportés en **Tableau 2**.

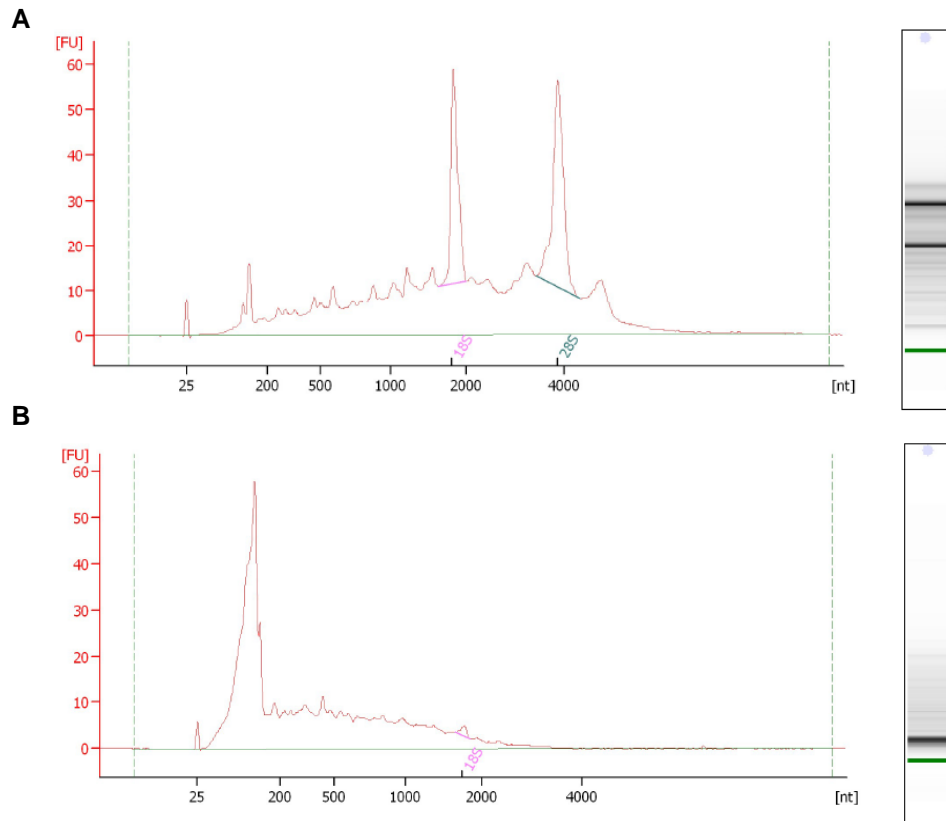


Figure 75. Exemples de profil d'électrophorèse pour analyse de RIN pour un échantillon avec un bon niveau d'intégrité (RIN=7) (A) et un échantillon dégradé (RIN= 2) (B).

- **Amplification des ARN** pour analyse de l'expression génique par **RT-qPCR**. L'amplification se fait selon le protocole du kit (Express Art® mRNA Amplification Kit C&E TR Micro version, Amp Tec), et se compose d'un ensemble de réactions enzymatiques (la plupart de type PCR) et des purifications sur colonne qui sur l'ensemble se déroulent sur une journée et demi. Une amplification à partir d'environ 20ng permet d'obtenir une quantité d'ADNc amplifié compris entre 15 et 20 µg.

- **Amplification des ARN pour** dépôt sur **puces Affymetrix**, selon les instructions du fabricant (Ovation Pico WTA System V2, NuGEN). Ce kit permet d'amplifier des quantités d'ARN initiales comprises entre 500 pg et 50 ng et de produire jusqu'à 10µg d'ADNc sur une demi-journée. Nous avons employé cette procédure pour les puces sur les îlots pancréatiques de la souris FXRKO-βcell et Contrôle Cre opérée ou pas de BDL (n=16 au total). La surface d'îlots pancréatiques récupérés (mesurée en unités arbitraires) et le RIN pour chaque

échantillon analysé et la quantité d'ADNc obtenu après amplification sont rapportés en **Tableau 3**. Pour les puces Affimetrix (Puces Mo Gene 2.0 ST), la quantité d'ADNc à déposer est de 5 µg.

	souris	Surface de pancreas recuperée	ARN purifiés		ARN dans 5µl (ng)
		AU	RIN	quantité (ng)	
FXR wt	501	2,008,798	6,4	6,8	34
	505	2,040,504	6,4	7,1	35,5
	509	2,373,611	6,7	6,7	33,5
	510	2,549,395	6,6	6	30
FXR ko	602	1,999,975	6,6	6	30
	609	2,047,154	6,3	6,8	34
	611	2,177,042	6,7	6,9	34,5
	612	1,665,124	6,5	5,6	28

Tableau 2. Surface de pancréas récupérée (mesurée en Unités Arbitraires, UA) pendant la MDL des îlots de souris FXRKO total et WT, index d'intégrité de l'ARN (RIN), quantité d'ARN purifié et quantité d'ARN pour les puces Agilent.

	souris	Surface de pancreas recuperée	ARN purifiés		ADNc après amplification
		AU	RIN	quantité (ng)	quantité (µg)
Controle Cre SHAM	816	1.120.468	6,3	4,4	9,8
	811	599.897	6,6	1,9	7,7
	827	637.793	6,2	3,0	8,4
	803	1.116.293	6,4	4,1	9,9
Controle Cre BDL	666	1.118.253	5,9	5,0	9,2
	672	1.075.171	6,4	5,2	7,8
	686	838.568	6,4	3,3	10
FXRKO-βcell SHAM	828	913.660	6,3	3,3	8,8
	681	647.440	6,8	2,4	9,2
	813	584.811	6,5	2,2	8,7
	630	878.309	7	2,5	10
FXRKO-βcell BDL	806	610.245	6,9	1,8	8,2
	810	643.282	6,7	2,8	9,8
	829	1.546.711	7	6,6	9
	697	802.448	6,2	4,2	9,9

Tableau 3. Surface de pancréas récupérée (mesurée en Unités Arbitraires, UA) pendant la MDL des îlots de souris FXRKO-βcell et contrôle Cre BDL ou Sham, index d'intégrité de l'ARN (RIN), quantité d'ARN purifié et quantité d'ADNc obtenu après amplification.

Annexe 2: Dosage du profile des ABs dans le plasma et dans le pancréas par LC-MS/MS

L'analyse qualitative du pool d'ABs plasmatiques et pancréatiques a été réalisée par chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS/MS), en collaboration avec le CUMA (Centre Universitaire de Mesures et d'Analyses, Lille).

L'analyse prévoit 3 étapes:

- 1) Récupération des échantillons (plasma ou pancréas);
- 2) Extraction des ABs;
- 3) Dosage par LC-MS/MS.

1) Récupération des échantillons de plasma ou pancréas

Le plasma a été récupéré après centrifugation (4500 rpm, 10 min, à 4°C) du sang veineux prélevé selon la procédure et les conditions définies par le protocole expérimental.

Le pancréas de souris a été prélevé après perfusion intracardiaque pour enlever la composante sanguine (solution saline physiologique, NaCl 0.9%) et immédiatement congelé dans l'azote liquide.

2) Extraction des ABs

Préparation du standard interne:

Les solutions mères des espèces d'ABs individuelles ont été préparées séparément dans du MeOH, à une gamme de concentrations allant de 1,8 à 6,6 mmol/L et stockés à -20 °C. Les étalons ont été préparés en combinant des volumes appropriés de chaque solution mère d'AB et MeOH. La gamme d'étalonnage va de 1,5 à 2 000 nmol/L de chaque AB dans la solution finale. La solution de contrôles internes (Internal Standard: IS) comprend 5 espèces d'ABs deutérées (D4-CA, D4-GCA, D4-TCA, D4-CDCA, D4-GCDCA) à 0,5 µM dans le MeOH.

Déprotéinisation des échantillons:

Plasma: Adaptation du protocole de: García-Cañaveras JC, Donato MT, Castell JV, Lahoz A. Targeted profiling of circulating and hepatic bile acids in human, mouse, and rat using a UPLC-MRM-MS-validated method. J Lipid Res. oct 2012; 53(10):2231-41.

- Refroidir le méthanol (MeOH) à -20°C;
- Placer l'IS sur glace
- Décongeler le plasma sur glace

- Homogénéiser le plasma
- Sur glace: prélever 50 µl de plasma dans un Eppendorf et ajouter 25µl de IS WS puis 225 µl de MeOH froid
- Vortexer 3 fois 10 secondes
- Placer à -20°C pendant 20 minutes
- Centrifuger 10 min à 13000 rpm à +4°C
- Récupérer la phase supérieure dans un tube en verre et évaporer au speed vac
- Reprendre par 50µl de mélange MeOH/H₂O 50%
- Vortexer 60 secondes, puis centrifuger 1 min à 13000 rpm g à +4°C
- Reprendre le surnageant par 50 µl
- Congeler à -20°C

Pancréas: Adaptation du protocole de: Zhang Y, Klaassen CD. Effects of feeding bile acids and a bile acid sequestrant on hepatic bile acid composition in mice. J Lipid Res. nov 2010;51(11):3230-42.

Homogénéiser le tissu dans une solution d'acétonitrile (ACN) + MeOH

- Récupérer 200 µl d'homogénat, ajouter 100 µl de IS et laisser sur glace pendant 10 min
- Ajouter 5µl de MeOH + 1ml de acetonitrile alcaline (5% ammoniacque en acetronitrile) froid (+4°C)
- Vortexer vigoureusement et laisser en agitation pendant 1h à température ambiante
- Centrifuger à 13000 rpm pendant 10min
- Récupérer le surnageant
- Resuspendre le pellet dans 1ml de MeOH
- Vortexer vigoureusement pendant 5 min
- Centrifuger à 13000 rpm pendant 10 min
- Récupérer le surnageant et l'unifier au premier
- Evaporer sous azote
- Reprendre par 50 µl de mélange MeOH/H₂O 50%
- Centrifuger à 13000 rpm pendant 1 min
- Récupérer le surnageant
- Congeler à -20°C

3) Dosage par LC-MS/MS

La méthode a permis la quantification des 24 ABs différentes: acide cholique (CA), l'acide glycocholique (GCA), l'acide taurocholique (TCA), l'acide chénodésoxycholique (CDCA), l'acide glycochénodésoxycholique (GCDCA), l'acide taurochénodésoxycholique (TCDCA), l'acide désoxycholique (DCA), l'acide glycodésoxycholique (GDCA), l'acide taurochénodésoxycholique (TCDCA), l'acide lithocholique (LCA), l'acide glycolithocholique (GLCA), l'acide tauroolithocholique (TLCA), l'acide ursodésoxycholique (UDCA), l'acide glyoursodésoxycholique (GUDCA), l'acide tauroursodésoxycholique (TUDCA), l'acide α -muricholique (α MCA), l'acide tauro- α -muricholique (T α MCA), l'acide β -muricholique (β MCA) l'acide Tauro- β -muricholique (T β MCA), l'acide ω -muricholique (ω MCA), l'acide tauro- ω -muricholique (T ω MCA), l'acide hyocholique (HCA), l'acide glycohyocholique (GHCA), l'acide taurohyocholique (THCA)), et les 5 formes deutérées du IS (acide cholique 2,2,4,4-D4 (CA-D4), acide glycochénodésoxycholique 2,2,4,4-D4 (GCDCA-D4), acide chénodésoxycholique 2,2,4,4-D4 (CDCA-D4), l'acide taurocholique-2,2,4,4-D4 (TCA-D4)).

L'analyse LC-MS/MS a été réalisée sur un dispositif UFLC-XR (Shimadzu) couplé à un QTRAP® 5500 du système hybride MS/MS, équipé d'une source d'ions Turbo VTM AB Sciex (Foster City, CA, USA). Le contrôle des instruments, l'acquisition et le traitement des données ont été effectués en utilisant le logiciel Analyst 1.5.2. La séparation a été effectuée sur une colonne Symmetry C18 Luna (250 mm x 2,1 mm, taille des particules 5 μ m) (Phenomenex, CA, USA). La température du four a été fixée à 30°C. Le volume d'injection était de 5 μ L. L'élution a été effectuée avec un flux de 500 μ l/min, avec de l'acétate d'ammonium 20 mM à pH 8 comme éluant A, et de l'acétonitrile comme éluant B. Il a été suivi un plateau de 5 min au 28% de B, un gradient linéaire de 28% à 90% de B pendant 15 min, suivie d'un plateau de 2 min avec 90% de B. Ensuite, la colonne a été ré-équilibrée pendant 4 minutes.

Le cycle d'injection était de 26 min, en tenant compte du temps d'équilibrage de la colonne. D'abord, le spectromètre de masse a été réglé et calibré en utilisant du polypropylène glycol, de la réserpine et de l'Agilent Tuning Mix (tous AB Sciex, Foster City, CA, USA) selon les instructions du fabricant. La résolution du Q1 a été ajustée à $0,7 \pm 0,1$ a.m.u. FWHM, référée comme unité de résolution. Le Q3 a également été réglé à résolution unitaire en modalité de suivi de réactions multiples (MRM). L'analyse par MS a été effectuée en mode d'ionisation négative en utilisant une tension d'ionisation de 4,500V. Le nébuliseur et les flux de gaz ont été réglés à 25 psi avec de l'azote. La source d'ions Turbo VTM a été réglée à 550°C avec

le flux de gaz auxiliaire (de l'air) réglé à 50 psi. Pour tous les ABs, les transitions MRM suivants ont été surveillées avec un temps de séjour de 50 ms:

CA 407,2 407,2 → ("EC" = énergie de collision 40eV); GCA 464,1 → 74 (CE = 85eV); TCA 514,1 → 80 (EC = 130eV); CDCA 391,2 → 391,2 (EC = 40eV); GCDCA 448,1 → 74 (EC = 80eV); TCDCA 498,1 → 80 (EC = 125eV); DCA 391,2 → 391,2 (EC = 40eV); GDCA 448,1 → 74 (EC = 80eV); ACDC 498,1 → 80 (EC = 130eV); UDCA 391,1 → 391,1 (EC = 40eV); LCA 375,2 → 375,2 (EC = 40eV); TLCA 482,0 → 80 (EC = 130eV); TUDCA 498,1 → 80 (EC = 126eV); α MCA 407,2 → 407,2 (EC = 40eV); T α MCA 514,1 → 80 (EC = 130eV); β MCA 407,2 → 407,2 (EC = 40eV); T β MCA 514,1 → 80 (EC = 130eV); ω MCA 407,2 → 407,2 (EC = 40eV); T ω MCA 514,1 → 80 (EC = 130eV); HCA 407,3 → 407,3 (EC = 40eV); GHCA 464,1 → 74 (EC = 80eV); THCA 514,1 → 80 (EC = 130eV); GUDCA 448,1 → 74 (EC = 80eV); GLCA 432,1 → 74 (EC = 80eV); CA-D4 411,2 → 411,2 (EC = 40eV); GCDCA-D4 452,1 → 74 (EC = 80eV); GCA-D4 468,1 → 74 (EC = 85eV); CDCA-D4 395,1 → 395,1 (EC = 40eV); TCA-D4 → 518,2 79,8 (EC = 130eV).

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abdelkarim M, Caron S, Duhem C, Prawitt J, Dumont J, Lucas A, et al. The farnesoid X receptor regulates adipocyte differentiation and function by promoting peroxisome proliferator-activated receptor-gamma and interfering with the Wnt/beta-catenin pathways. *J Biol Chem*. 19 nov 2010;285(47):36759-67.
- Adams MJ, Blundell TL, Dodson EJ, Dodson GG, Vijayan M, Baker EN, et al. Structure of Rhombohedral 2 Zinc Insulin Crystals. *Nature*. 1 nov 1969;224(5218):491-5.
- Adams TD, Davidson LE, Litwin SE, Kolotkin RL, LaMonte MJ, Pendleton RC, et al. Health benefits of gastric bypass surgery after 6 years. *JAMA*. 19 sept 2012;308(11):1122-31.
- de Aguiar Vallim TQ, Tarling EJ, Ahn H, Hagey LR, Romanoski CE, Lee RG, et al. MAFG is a transcriptional repressor of bile acid synthesis and metabolism. *Cell Metab*. 3 févr 2015;21(2):298-310.
- Ahlgren U, Jonsson J, Jonsson L, Simu K, Edlund H. beta-cell-specific inactivation of the mouse *Ipf1/Pdx1* gene results in loss of the beta-cell phenotype and maturity onset diabetes. *Genes Dev*. 15 juin 1998;12(12):1763-8.
- Ahmad NN, Pfalzer A, Kaplan LM. Roux-en-Y gastric bypass normalizes the blunted postprandial bile acid excursion associated with obesity. *Int J Obes* 2005. déc 2013;37(12):1553-9.
- Ahrén B, Holst JJ, Efendic S. Antidiabetogenic action of cholecystokinin-8 in type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab*. mars 2000;85(3):1043-8.
- Ahrén B, Taborsky GJ, Porte D. Neuropeptidergic versus cholinergic and adrenergic regulation of islet hormone secretion. *Diabetologia*. déc 1986;29(12):827-36.
- Akiyoshi T, Uchida K, Takase H, Nomura Y, Takeuchi N. Cholesterol gallstones in alloxan-diabetic mice. *J Lipid Res*. sept 1986;27(9):915-24.
- Alemi F, Poole DP, Chiu J, Schoonjans K, Cattaruzza F, Grider JR, et al. The receptor TGR5 mediates the prokinetic actions of intestinal bile acids and is required for normal defecation in mice. *Gastroenterology*. janv 2013;144(1):145-54.
- Allaman-Pillet N, Roduit R, Oberson A, Abdelli S, Ruiz J, Beckmann JS, et al. Circadian regulation of islet genes involved in insulin production and secretion. *Mol Cell Endocrinol*. 29 oct 2004;226(1-2):59-66.
- Ananthanarayanan M, Balasubramanian N, Makishima M, Mangelsdorf DJ, Suchy FJ. Human bile salt export pump promoter is transactivated by the farnesoid X receptor/bile acid receptor. *J Biol Chem*. 3 août 2001;276(31):28857-65.
- Angelin B, Björkhem I, Einarsson K, Ewerth S. Hepatic uptake of bile acids in man. Fasting and postprandial concentrations of individual bile acids in portal venous and systemic blood serum. *J Clin Invest*. oct 1982;70(4):724-31.

- Anisfeld AM, Kast-Woelbern HR, Meyer ME, Jones SA, Zhang Y, Williams KJ, et al. Syndecan-1 expression is regulated in an isoform-specific manner by the farnesoid-X receptor. *J Biol Chem*. 30 mai 2003;278(22):20420-8.
- Arterburn DE, Olsen MK, Smith VA, Livingston EH, Van Scoyoc L, Yancy WS, et al. Association between bariatric surgery and long-term survival. *JAMA*. 6 janv 2015;313(1):62-70.
- Asher G, Schibler U. Crosstalk between components of circadian and metabolic cycles in mammals. *Cell Metab*. 2 févr 2011;13(2):125-37.
- Ashrafian H, Ahmed K, Rowland SP, Patel VM, Gooderham NJ, Holmes E, et al. Metabolic surgery and cancer: protective effects of bariatric procedures. *Cancer*. 1 mai 2011;117(9):1788-99.
- Ashrafian H, Bueter M, Ahmed K, Suliman A, Bloom SR, Darzi A, et al. Metabolic surgery: an evolution through bariatric animal models. *Obes Rev Off J Int Assoc Study Obes*. déc 2010;11(12):907-20.
- Ashrafian H, le Roux CW, Rowland SP, Ali M, Cummin AR, Darzi A, et al. Metabolic surgery and obstructive sleep apnoea: the protective effects of bariatric procedures. *Thorax*. mai 2012;67(5):442-9.
- Bain DL, Heneghan AF, Connaghan-Jones KD, Miura MT. Nuclear receptor structure: implications for function. *Annu Rev Physiol*. 2007;69:201-20.
- Balasubramaniyan N, Luo Y, Sun A-Q, Suchy FJ. SUMOylation of the farnesoid X receptor (FXR) regulates the expression of FXR target genes. *J Biol Chem*. 10 mai 2013;288(19):13850-62.
- Bala V, Rajagopal S, Kumar DP, Nalli AD, Mahavadi S, Sanyal AJ, et al. 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*. 2014;5:420.
- Ballatori N, Li N, Fang F, Boyer JL, Christian WV, Hammond CL. OST alpha-OST beta: a key membrane transporter of bile acids and conjugated steroids. *Front Biosci Landmark Ed*. 2009;14:2829-44.
- Barclay JL, Shostak A, Leliavski A, Tsang AH, Jöhren O, Müller-Fielitz H, et al. High-fat diet-induced hyperinsulinemia and tissue-specific insulin resistance in Cry-deficient mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 15 mai 2013;304(10):E1053-63.
- Bass J, Takahashi JS. Circadian integration of metabolism and energetics. *Science*. 3 déc 2010;330(6009):1349-54.
- Berrabah W, Aumercier P, Gheeraert C, Dehondt H, Bouchaert E, Alexandre J, et al. Glucose sensing O-GlcNAcylation pathway regulates the nuclear bile acid receptor farnesoid X receptor (FXR). *Hepatology Baltim Md*. mai 2014;59(5):2022-33.

- Berson SA, Yallow RS. Immunochemical distinction between insulins with identical amino-acid sequences. *Nature*. 30 sept 1961;191:1392-3.
- Bhutta HY, Rajpal N, White W, Freudenberg JM, Liu Y, Way J, et al. Effect of Roux-en-Y Gastric Bypass Surgery on Bile Acid Metabolism in Normal and Obese Diabetic Rats. *PloS One*. 2015;10(3):e0122273.
- Biddinger SB, Haas JT, Yu BB, Bezy O, Jing E, Zhang W, et al. Hepatic insulin resistance directly promotes formation of cholesterol gallstones. *Nat Med*. juill 2008;14(7):778-82.
- Björn Schittenhelm, Wagner R, Kähny V, Peter A, Krippeit-Drews P, Düfer M, et al. Role of FXR in beta-cells of lean and obese mice. *Endocrinology*. 2015;en.2014-1751.
- Bjursell M, Wedin M, Admyre T, Hermansson M, Böttcher G, Göransson M, et al. Ageing Fxr deficient mice develop increased energy expenditure, improved glucose control and liver damage resembling NASH. *PloS One*. 2013;8(5):e64721.
- Boden G, Ruiz J, Urbain JL, Chen X. Evidence for a circadian rhythm of insulin secretion. *Am J Physiol*. août 1996;271(2 Pt 1):E246-52.
- Bookout AL, Jeong Y, Downes M, Yu RT, Evans RM, Mangelsdorf DJ. Anatomical profiling of nuclear receptor expression reveals a hierarchical transcriptional network. *Cell*. 25 août 2006;126(4):789-99.
- Bratanova-Tochkova TK, Cheng H, Daniel S, Gunawardana S, Liu Y-J, Mulvaney-Musa J, et al. Triggering and augmentation mechanisms, granule pools, and biphasic insulin secretion. *Diabetes*. févr 2002;51 Suppl 1:S83-90.
- Brelje TC, Bhagroo NV, Stout LE, Sorenson RL. Beneficial effects of lipids and prolactin on insulin secretion and beta-cell proliferation: a role for lipids in the adaptation of islets to pregnancy. *J Endocrinol*. mai 2008;197(2):265-76.
- Brighton CA, Rievaj J, Kuhre RE, Glass LL, Schoonjans K, Holst JJ, et al. Bile Acids Trigger GLP-1 Release Predominantly by Accessing Basolaterally Located G Protein-Coupled Bile Acid Receptors. *Endocrinology*. nov 2015;156(11):3961-70.
- Brobst DE, Ding X, Creech KL, Goodwin B, Kelley B, Staudinger JL. Guggulsterone activates multiple nuclear receptors and induces CYP3A gene expression through the pregnane X receptor. *J Pharmacol Exp Ther*. août 2004;310(2):528-35.
- Broeders EPM, Nascimento EBM, Havekes B, Brans B, Roumans KHM, Tailleux A, et al. The Bile Acid Chenodeoxycholic Acid Increases Human Brown Adipose Tissue Activity. *Cell Metab*. 28 juill 2015;
- Brouwers B, de Faudeur G, Osipovich AB, Goyvaerts L, Lemaire K, Boesmans L, et al. Impaired Islet Function in Commonly Used Transgenic Mouse Lines due to Human Growth Hormone Minigene Expression. *Cell Metab*. déc 2014;20(6):979-90.
- Brufau G, Stellaard F, Prado K, Bloks VW, Jonkers E, Boverhof R, et al. Improved glycemic control with colesevelam treatment in patients with type 2 diabetes is not directly

- associated with changes in bile acid metabolism. *Hepatology* Baltimore, Md. oct 2010;52(4):1455-64.
- Buchwald H, Estok R, Fahrbach K, Banel D, Jensen MD, Pories WJ, et al. Weight and type 2 diabetes after bariatric surgery: systematic review and meta-analysis. *Am J Med.* mars 2009;122(3):248-56.e5.
- Burris TP, Montrose C, Houck KA, Osborne HE, Bocchinfuso WP, Yaden BC, et al. The hypolipidemic natural product guggulsterone is a promiscuous steroid receptor ligand. *Mol Pharmacol.* mars 2005;67(3):948-54.
- Bytzer P, Talley NJ, Leemon M, Young LJ, Jones MP, Horowitz M. Prevalence of gastrointestinal symptoms associated with diabetes mellitus: a population-based survey of 15,000 adults. *Arch Intern Med.* 10 sept 2001;161(16):1989-96.
- Cabrera O, Berman DM, Kenyon NS, Ricordi C, Berggren P-O, Caicedo A. The unique cytoarchitecture of human pancreatic islets has implications for islet cell function. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 14 févr 2006;103(7):2334-9.
- Caiazzo R, Lassailly G, Leteurtre E, Baud G, Verkindt H, Raverdy V, et al. Roux-en-Y gastric bypass versus adjustable gastric banding to reduce nonalcoholic fatty liver disease: a 5-year controlled longitudinal study. *Ann Surg.* nov 2014;260(5):893-8; discussion 898-9.
- Cailotto C, La Fleur SE, Van Heijningen C, Wortel J, Kalsbeek A, Feenstra M, et al. The suprachiasmatic nucleus controls the daily variation of plasma glucose via the autonomic output to the liver: are the clock genes involved? *Eur J Neurosci.* nov 2005;22(10):2531-40.
- Campana G, Pasini P, Roda A, Spampinato S. Regulation of ileal bile acid-binding protein expression in Caco-2 cells by ursodeoxycholic acid: role of the farnesoid X receptor. *Biochem Pharmacol.* 15 juin 2005;69(12):1755-63.
- Cariou B, Chetiveaux M, Zaïr Y, Pouteau E, Disse E, Guyomarc'h-Delasalle B, et al. Fasting plasma chenodeoxycholic acid and cholic acid concentrations are inversely correlated with insulin sensitivity in adults. *Nutr Metab.* 2011;8(1):48.
- Cariou B, van Harmelen K, Duran-Sandoval D, van Dijk TH, Grefhorst A, Abdelkarim M, et al. The farnesoid X receptor modulates adiposity and peripheral insulin sensitivity in mice. *J Biol Chem.* 21 avr 2006;281(16):11039-49.
- Cariou B, van Harmelen K, Duran-Sandoval D, van Dijk T, Grefhorst A, Bouchaert E, et al. Transient impairment of the adaptive response to fasting in FXR-deficient mice. *FEBS Lett.* 1 août 2005;579(19):4076-80.
- Caron S, Huaman Samanez C, Dehondt H, Ploton M, Briand O, Lien F, et al. Farnesoid X receptor inhibits the transcriptional activity of carbohydrate response element binding protein in human hepatocytes. *Mol Cell Biol.* juin 2013;33(11):2202-11.

- Chappell DS, Patel NA, Jiang K, Li P, Watson JE, Byers DM, et al. Functional involvement of protein kinase C-betaII and its substrate, myristoylated alanine-rich C-kinase substrate (MARCKS), in insulin-stimulated glucose transport in L6 rat skeletal muscle cells. *Diabetologia*. mai 2009;52(5):901-11.
- Chappell LC, Gurung V, Seed PT, Chambers J, Williamson C, Thornton JG, et al. Ursodeoxycholic acid versus placebo, and early term delivery versus expectant management, in women with intrahepatic cholestasis of pregnancy: semifactorial randomised clinical trial. *BMJ*. 2012;344:e3799.
- Chatterjee VK, Lee JK, Rentoumis A, Jameson JL. Negative regulation of the thyroid-stimulating hormone alpha gene by thyroid hormone: receptor interaction adjacent to the TATA box. *Proc Natl Acad Sci U S A*. déc 1989;86(23):9114-8.
- Chavez-Tapia NC, Tellez-Avila FI, Barrientos-Gutierrez T, Mendez-Sanchez N, Lizardi-Cervera J, Uribe M. Bariatric surgery for non-alcoholic steatohepatitis in obese patients. *Cochrane Database Syst Rev*. 2010;(1):CD007340.
- Chen F, Ma L, Dawson PA, Sinal CJ, Sehayek E, Gonzalez FJ, et al. Liver receptor homologue-1 mediates species- and cell line-specific bile acid-dependent negative feedback regulation of the apical sodium-dependent bile acid transporter. *J Biol Chem*. 30 mai 2003;278(22):19909-16.
- Cheng Y, Su Y, Shan A, Jiang X, Ma Q, Wang W, et al. Generation and Characterization of Transgenic Mice Expressing Mouse Ins1 Promoter for Pancreatic β -Cell-Specific Gene Overexpression and Knockout. *Endocrinology*. juill 2015;156(7):2724-31.
- Chen L, McNulty J, Anderson D, Liu Y, Nystrom C, Bullard S, et al. Cholestyramine reverses hyperglycemia and enhances glucose-stimulated glucagon-like peptide 1 release in Zucker diabetic fatty rats. *J Pharmacol Exp Ther*. juill 2010;334(1):164-70.
- Chen L, Yao X, Young A, McNulty J, Anderson D, Liu Y, et al. Inhibition of apical sodium-dependent bile acid transporter as a novel treatment for diabetes. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 1 janv 2012;302(1):E68-76.
- Chennamsetty I, Claudel T, Kostner KM, Trauner M, Kostner GM. FGF19 signaling cascade suppresses APOA gene expression. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. mai 2012;32(5):1220-7.
- Chiang JY, Stroup D. Identification and characterization of a putative bile acid-responsive element in cholesterol 7 alpha-hydroxylase gene promoter. *J Biol Chem*. 1 juill 1994;269(26):17502-7.
- Cipriani S, Mencarelli A, Palladino G, Fiorucci S. FXR activation reverses insulin resistance and lipid abnormalities and protects against liver steatosis in Zucker (fa/fa) obese rats. *J Lipid Res*. avr 2010;51(4):771-84.
- Claudel T, Inoue Y, Barbier O, Duran-Sandoval D, Kosykh V, Fruchart J, et al. Farnesoid X receptor agonists suppress hepatic apolipoprotein CIII expression. *Gastroenterology*. août 2003;125(2):544-55.

- Claudel T, Staels B, Kuipers F. The Farnesoid X Receptor A Molecular Link Between Bile Acid and Lipid and Glucose Metabolism. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 10 janv 2005;25(10):2020-30.
- Claudel T, Sturm E, Duez H, Torra IP, Sirvent A, Kosykh V, et al. Bile acid-activated nuclear receptor FXR suppresses apolipoprotein A-I transcription via a negative FXR response element. *J Clin Invest.* avr 2002;109(7):961-71.
- Conaway RC, Conaway JW. The Mediator complex and transcription elongation. *Biochim Biophys Acta.* janv 2013;1829(1):69-75.
- Corkey BE, Deeney JT, Yaney GC, Tornheim K, Prentki M. The role of long-chain fatty acyl-CoA esters in beta-cell signal transduction. *J Nutr.* févr 2000;130(2S Suppl):299S - 304S.
- Courcoulas AP, Christian NJ, Belle SH, Berk PD, Flum DR, Garcia L, et al. Weight change and health outcomes at 3 years after bariatric surgery among individuals with severe obesity. *JAMA.* 11 déc 2013;310(22):2416-25.
- Crabtree JS, Scacheri PC, Ward JM, McNally SR, Swain GP, Montagna C, et al. Of mice and MEN1: Insulinomas in a conditional mouse knockout. *Mol Cell Biol.* sept 2003;23(17):6075-85.
- Crepaldi SC, Carneiro EM, Boschero AC. Long-term effect of prolactin treatment on glucose-induced insulin secretion in cultured neonatal rat islets. *Horm Metab Res Horm Stoffwechselforschung Horm Métabolisme.* mai 1997;29(5):220-4.
- Crestani M, Sadeghpour A, Stroup D, Galli G, Chiang JY. Transcriptional activation of the cholesterol 7 α -hydroxylase gene (CYP7A) by nuclear hormone receptors. *J Lipid Res.* nov 1998;39(11):2192-200.
- Creutzfeldt W, Ebert R. New developments in the incretin concept. *Diabetologia.* août 1985;28(8):565-73.
- Crosignani A, Del Puppo M, Longo M, De Fabiani E, Caruso D, Zuin M, et al. Changes in classic and alternative pathways of bile acid synthesis in chronic liver disease. *Clin Chim Acta Int J Clin Chem.* juill 2007;382(1-2):82-8.
- Croxtall JD, Choudhury Q, Flower RJ. Glucocorticoids act within minutes to inhibit recruitment of signalling factors to activated EGF receptors through a receptor-dependent, transcription-independent mechanism. *Br J Pharmacol.* mai 2000;130(2):289-98.
- Crumbley C, Burris TP. Direct regulation of CLOCK expression by REV-ERB. *PloS One.* 2011;6(3):e17290.
- Cui J, Huang L, Zhao A, Lew J-L, Yu J, Sahoo S, et al. Guggulsterone is a farnesoid X receptor antagonist in coactivator association assays but acts to enhance transcription of bile salt export pump. *J Biol Chem.* 21 mars 2003;278(12):10214-20.

- Cummings BP, Bettaieb A, Graham JL, Kim J, Ma F, Shibata N, et al. Bile-acid-mediated decrease in endoplasmic reticulum stress: a potential contributor to the metabolic benefits of ileal interposition surgery in UCD-T2DM rats. *Dis Model Mech*. mars 2013;6(2):443-56.
- Cummings BP, Bettaieb A, Graham JL, Stanhope KL, Kowala M, Haj FG, et al. Vertical sleeve gastrectomy improves glucose and lipid metabolism and delays diabetes onset in UCD-T2DM rats. *Endocrinology*. août 2012;153(8):3620-32.
- Cummings BP, Strader AD, Stanhope KL, Graham JL, Lee J, Raybould HE, et al. Ileal interposition surgery improves glucose and lipid metabolism and delays diabetes onset in the UCD-T2DM rat. *Gastroenterology*. juin 2010;138(7):2437-46, 2446.e1.
- Dahlhoff M, Grzech M, Habermann FA, Wolf E, Schneider MR. A transgenic mouse line expressing cre recombinase in pancreatic β -cells. *Genes N Y N* 2000. mai 2012;50(5):437-42.
- Davis RA, Miyake JH, Hui TY, Spann NJ. Regulation of cholesterol-7 α -hydroxylase: BAREly missing a SHP. *J Lipid Res*. avr 2002;43(4):533-43.
- De Giorgi S, Campos V, Egli L, Toepel U, Carrel G, Cariou B, et al. Long-term effects of Roux-en-Y gastric bypass on postprandial plasma lipid and bile acids kinetics in female non diabetic subjects: A cross-sectional pilot study. *Clin Nutr [Internet]*. sept 2014 [cité 19 mai 2015]; Disponible sur: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0261561414002465>
- Delattre E, Cipolla-Neto J, Boschero AC. Diurnal variations in insulin secretion and K⁺ permeability in isolated rat islets. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. juill 1999;26(7):505-10.
- Delerive P, De Bosscher K, Besnard S, Vanden Berghe W, Peters JM, Gonzalez FJ, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha negatively regulates the vascular inflammatory gene response by negative cross-talk with transcription factors NF-kappaB and AP-1. *J Biol Chem*. 5 nov 1999a;274(45):32048-54.
- Delerive P, Galardi CM, Bisi JE, Nicodeme E, Goodwin B. Identification of liver receptor homolog-1 as a novel regulator of apolipoprotein AI gene transcription. *Mol Endocrinol Baltim Md*. oct 2004;18(10):2378-87.
- Delerive P, Martin-Nizard F, Chinetti G, Trottein F, Fruchart JC, Najib J, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor activators inhibit thrombin-induced endothelin-1 production in human vascular endothelial cells by inhibiting the activator protein-1 signaling pathway. *Circ Res*. 3 sept 1999b;85(5):394-402.
- Deltour L, Leduque P, Blume N, Madsen O, Dubois P, Jami J, et al. Differential expression of the two nonallelic proinsulin genes in the developing mouse embryo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 15 janv 1993;90(2):527-31.

- De Vos A, Heimberg H, Quartier E, Huypens P, Bouwens L, Pipeleers D, et al. Human and rat beta cells differ in glucose transporter but not in glucokinase gene expression. *J Clin Invest.* nov 1995;96(5):2489-95.
- DeWeerd S. Microbiome: A complicated relationship status. *Nature.* 17 avr 2014;508(7496):S61-3.
- Dietschy JM. Mechanisms for the intestinal absorption of bile acids. *J Lipid Res.* mai 1968;9(3):297-309.
- van Dijk TH, Grefhorst A, Oosterveer MH, Bloks VW, Staels B, Reijngoud D-J, et al. An increased flux through the glucose 6-phosphate pool in enterocytes delays glucose absorption in Fxr^{-/-} mice. *J Biol Chem.* 17 avr 2009;284(16):10315-23.
- Dimitriadis G, Cryer P, Gerich J. Prolonged hyperglycaemia during infusion of glucose and somatostatin impairs pancreatic A- and B-cell responses to decrements in plasma glucose in normal man: evidence for induction of altered sensitivity to glucose. *Diabetologia.* févr 1985;28(2):63-9.
- Dirksen C, Bojsen-Møller KN, Jørgensen NB, Jacobsen SH, Kristiansen VB, Naver LS, et al. Exaggerated release and preserved insulinotropic action of glucagon-like peptide-1 underlie insulin hypersecretion in glucose-tolerant individuals after Roux-en-Y gastric bypass. *Diabetologia.* déc 2013;56(12):2679-87.
- Dixon JB, Schachter LM, O'Brien PE, Jones K, Grima M, Lambert G, et al. Surgical vs conventional therapy for weight loss treatment of obstructive sleep apnea: a randomized controlled trial. *JAMA.* 19 sept 2012;308(11):1142-9.
- Djebali S, Davis CA, Merkel A, Dobin A, Lassmann T, Mortazavi A, et al. Landscape of transcription in human cells. *Nature.* 6 sept 2012;489(7414):101-8.
- Dor Y, Brown J, Martinez OI, Melton DA. Adult pancreatic beta-cells are formed by self-duplication rather than stem-cell differentiation. *Nature.* 6 mai 2004;429(6987):41-6.
- Downes M, Verdecia MA, Roecker AJ, Hughes R, Hogenesch JB, Kast-Woelbern HR, et al. A chemical, genetic, and structural analysis of the nuclear bile acid receptor FXR. *Mol Cell.* avr 2003;11(4):1079-92.
- Drucker DJ, Philippe J, Mojsov S, Chick WL, Habener JF. 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.* mai 1987;84(10):3434-8.
- Duane WC, Levitt DG, Mueller SM, Behrens JC. Regulation of bile acid synthesis in man. Presence of a diurnal rhythm. *J Clin Invest.* déc 1983;72(6):1930-6.
- Duez H, van der Veen JN, Duhem C, Pourcet B, Touvier T, Fontaine C, et al. Regulation of bile acid synthesis by the nuclear receptor Rev-erb α . *Gastroenterology.* août 2008;135(2):689-98.

- Düfer M, Hörth K, Wagner R, Schittenhelm B, Prowald S, Wagner TFJ, et al. Bile acids acutely stimulate insulin secretion of mouse β -cells via farnesoid X receptor activation and K(ATP) channel inhibition. *Diabetes*. juin 2012;61(6):1479-89.
- Duman JG, Forte JG. What is the role of SNARE proteins in membrane fusion? *Am J Physiol Cell Physiol*. août 2003;285(2):C237-49.
- Duran-Sandoval D, Cariou B, Percevault F, Hennuyer N, Grefhorst A, van Dijk TH, et al. The farnesoid X receptor modulates hepatic carbohydrate metabolism during the fasting-refeeding transition. *J Biol Chem*. 19 août 2005;280(33):29971-9.
- Duran-Sandoval D, Mautino G, Martin G, Percevault F, Barbier O, Fruchart J-C, et al. Glucose regulates the expression of the farnesoid X receptor in liver. *Diabetes*. 2004;53(4):890-8.
- Dutia R, Embrey M, O'Brien S, Haeusler RA, Agénor KK, Homel P, et al. Temporal changes in bile acid levels and 12 α -hydroxylation after Roux-en-Y gastric bypass surgery in type 2 diabetes. *Int J Obes* 2005. mai 2015;39(5):806-13.
- Dwivedi SKD, Singh N, Kumari R, Mishra JS, Tripathi S, Banerjee P, et al. Bile acid receptor agonist GW4064 regulates PPAR γ coactivator-1 α expression through estrogen receptor-related receptor α . *Mol Endocrinol Baltim Md*. juin 2011;25(6):922-32.
- Dzeletovic S, Breuer O, Lund E, Diczfalusy U. Determination of cholesterol oxidation products in human plasma by isotope dilution-mass spectrometry. *Anal Biochem*. 10 févr 1995;225(1):73-80.
- Edwards CM, Todd JF, Mahmoudi M, Wang Z, Wang RM, Ghatei MA, et al. Glucagon-like peptide 1 has a physiological role in the control of postprandial glucose in humans: studies with the antagonist exendin 9-39. *Diabetes*. janv 1999;48(1):86-93.
- Einarsson K, Ericsson S, Ewerth S, Reihner E, Rudling M, Ståhlberg D, et al. Bile acid sequestrants: mechanisms of action on bile acid and cholesterol metabolism. *Eur J Clin Pharmacol*. 1991;40 Suppl 1:S53-8.
- Eliasson B, Liakopoulos V, Franzén S, Näslund I, Svensson A-M, Ottosson J, et al. Cardiovascular disease and mortality in patients with type 2 diabetes after bariatric surgery in Sweden: a nationwide, matched, observational cohort study. *Lancet Diabetes Endocrinol*. nov 2015;3(11):847-54.
- Esguerra JLS, Eliasson L. Functional implications of long non-coding RNAs in the pancreatic islets of Langerhans. *Front Genet*. 2014;5:209.
- Fang S, Suh JM, Reilly SM, Yu E, Osborn O, Lackey D, et al. Intestinal FXR agonism promotes adipose tissue browning and reduces obesity and insulin resistance. *Nat Med*. févr 2015;21(2):159-65.
- Fang S, Tsang S, Jones R, Ponugoti B, Yoon H, Wu S-Y, et al. The p300 acetylase is critical for ligand-activated farnesoid X receptor (FXR) induction of SHP. *J Biol Chem*. 12 déc 2008;283(50):35086-95.

- Ferdaoussi M, Bergeron V, Zarrouki B, Kolic J, Cantley J, Fielitz J, et al. G protein-coupled receptor (GPR)40-dependent potentiation of insulin secretion in mouse islets is mediated by protein kinase D1. *Diabetologia*. oct 2012;55(10):2682-92.
- Ferrannini E, Camastra S, Astiarraga B, Nannipieri M, Castro-Perez J, Xie D, et al. Increased Bile Acid Synthesis and Deconjugation after Biliopancreatic Diversion. *Diabetes*. 26 mai 2015;
- Fiorucci S, Antonelli E, Rizzo G, Renga B, Mencarelli A, Riccardi L, et al. The nuclear receptor SHP mediates inhibition of hepatic stellate cells by FXR and protects against liver fibrosis. *Gastroenterology*. nov 2004;127(5):1497-512.
- Fiorucci S, Clerici C, Antonelli E, Orlandi S, Goodwin B, Sadeghpour BM, et al. Protective effects of 6-ethyl chenodeoxycholic acid, a farnesoid X receptor ligand, in estrogen-induced cholestasis. *J Pharmacol Exp Ther*. mai 2005;313(2):604-12.
- Fishman MP, Melton DA. Pancreatic lineage analysis using a retroviral vector in embryonic mice demonstrates a common progenitor for endocrine and exocrine cells. *Int J Dev Biol*. mars 2002;46(2):201-7.
- Flatt B, Martin R, Wang T-L, Mahaney P, Murphy B, Gu X-H, et al. Discovery of XL335 (WAY-362450), a highly potent, selective, and orally active agonist of the farnesoid X receptor (FXR). *J Med Chem*. 26 févr 2009;52(4):904-7.
- la Fleur SE, Kalsbeek A, Wortel J, Fekkes ML, Buijs RM. A daily rhythm in glucose tolerance: a role for the suprachiasmatic nucleus. *Diabetes*. juin 2001;50(6):1237-43.
- Flynn CR, Albaugh VL, Cai S, Cheung-Flynn J, Williams PE, Brucker RM, et al. Bile diversion to the distal small intestine has comparable metabolic benefits to bariatric surgery. *Nat Commun*. 2015;6:7715.
- Fonseca VA, Handelsman Y, Staels B. Colesevelam lowers glucose and lipid levels in type 2 diabetes: the clinical evidence. *Diabetes Obes Metab*. mai 2010;12(5):384-92.
- Forman BM, Goode E, Chen J, Oro AE, Bradley DJ, Perlmann T, et al. Identification of a nuclear receptor that is activated by farnesol metabolites. *Cell*. 2 juin 1995;81(5):687-93.
- Frankenberg T, Miloh T, Chen FY, Ananthanarayanan M, Sun A-Q, Balasubramanian N, et al. The membrane protein ATPase class I type 8B member 1 signals through protein kinase C zeta to activate the farnesoid X receptor. *Hepatology*. déc 2008;48(6):1896-905.
- Freedman LP, Luisi BF, Korszun ZR, Basavappa R, Sigler PB, Yamamoto KR. The function and structure of the metal coordination sites within the glucocorticoid receptor DNA binding domain. *Nature*. 11 août 1988;334(6182):543-6.
- Frese T, Bazwinsky I, Mühlbauer E, Peschke E. Circadian and age-dependent expression patterns of GLUT2 and glucokinase in the pancreatic beta-cell of diabetic and

- nondiabetic rats. *Horm Metab Res Horm Stoffwechselforschung Horm Métabolisme*. août 2007;39(8):567-74.
- Frost RJA, Olson EN. Control of glucose homeostasis and insulin sensitivity by the Let-7 family of microRNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 27 déc 2011;108(52):21075-80.
- Froy O. Metabolism and circadian rhythms--implications for obesity. *Endocr Rev*. févr 2010;31(1):1-24.
- Fu L, John LM, Adams SH, Yu XX, Tomlinson E, Renz M, et al. Fibroblast growth factor 19 increases metabolic rate and reverses dietary and leptin-deficient diabetes. *Endocrinology*. juin 2004;145(6):2594-603.
- Gaddy DF, Riedel MJ, Bertera S, Kieffer TJ, Robbins PD. dsAAV8-mediated gene transfer and β -cell expression of IL-4 and β -cell growth factors are capable of reversing early-onset diabetes in NOD mice. *Gene Ther*. août 2012;19(8):791-9.
- Gälman C, Angelin B, Rudling M. Bile acid synthesis in humans has a rapid diurnal variation that is asynchronous with cholesterol synthesis. *Gastroenterology*. nov 2005;129(5):1445-53.
- Gälman C, Angelin B, Rudling M. Pronounced variation in bile acid synthesis in humans is related to gender, hypertriglyceridaemia and circulating levels of fibroblast growth factor 19. *J Intern Med*. déc 2011;270(6):580-8.
- Gangwisch JE. Epidemiological evidence for the links between sleep, circadian rhythms and metabolism. *Obes Rev Off J Int Assoc Study Obes*. nov 2009;10 Suppl 2:37-45.
- Gannon M, Ables ET, Crawford L, Lowe D, Offield MF, Magnuson MA, et al. pdx-1 function is specifically required in embryonic beta cells to generate appropriate numbers of endocrine cell types and maintain glucose homeostasis. *Dev Biol*. 15 févr 2008;314(2):406-17.
- Gao Y, Miyazaki J, Hart GW. The transcription factor PDX-1 is post-translationally modified by O-linked N-acetylglucosamine and this modification is correlated with its DNA binding activity and insulin secretion in min6 beta-cells. *Arch Biochem Biophys*. 15 juill 2003;415(2):155-63.
- García-Cañaveras JC, Donato MT, Castell JV, Lahoz A. Targeted profiling of circulating and hepatic bile acids in human, mouse, and rat using a UPLC-MRM-MS-validated method. *J Lipid Res*. oct 2012;53(10):2231-41.
- Garg A, Grundy SM. Cholestyramine therapy for dyslipidemia in non-insulin-dependent diabetes mellitus. A short-term, double-blind, crossover trial. *Ann Intern Med*. 15 sept 1994;121(6):416-22.
- Gerber SH, Südhof TC. Molecular determinants of regulated exocytosis. *Diabetes*. févr 2002;51 Suppl 1:S3-11.

- Gerhard GS, Styer AM, Wood GC, Roesch SL, Petrick AT, Gabrielsen J, et al. A role for fibroblast growth factor 19 and bile acids in diabetes remission after Roux-en-Y gastric bypass. *Diabetes Care*. juill 2013;36(7):1859-64.
- Gerich JE. Lilly lecture 1988. Glucose counterregulation and its impact on diabetes mellitus. *Diabetes*. déc 1988;37(12):1608-17.
- Germain P, Kammerer S, Pérez E, Peluso-Iltis C, Tortolani D, Zusi FC, et al. Rational design of RAR-selective ligands revealed by RARbeta crystal structure. *EMBO Rep*. sept 2004;5(9):877-82.
- Germain P, Staels B, Dacquet C, Spedding M, Laudet V. Overview of nomenclature of nuclear receptors. *Pharmacol Rev*. déc 2006;58(4):685-704.
- Gineste R, Sirvent A, Paumelle R, Helleboid S, Aquilina A, Darteil R, et al. Phosphorylation of farnesoid X receptor by protein kinase C promotes its transcriptional activity. *Mol Endocrinol Baltim Md*. nov 2008;22(11):2433-47.
- Glass CK, McDonnell DP. The jensen symposium; a tribute to a pioneer in the field of nuclear receptor biology. *Mol Cell*. 27 févr 2004;13(4):459-67.
- Glicksman C, Pournaras DJ, Wright M, Roberts R, Mahon D, Welbourn R, et al. Postprandial plasma bile acid responses in normal weight and obese subjects. *Ann Clin Biochem*. sept 2010;47(Pt 5):482-4.
- Gnerre C, Blättler S, Kaufmann MR, Looser R, Meyer UA. Regulation of CYP3A4 by the bile acid receptor FXR: evidence for functional binding sites in the CYP3A4 gene. *Pharmacogenetics*. oct 2004;14(10):635-45.
- Gofflot F, Chartoire N, Vasseur L, Heikkinen S, Dembele D, Le Merrer J, et al. Systematic gene expression mapping clusters nuclear receptors according to their function in the brain. *Cell*. 19 oct 2007;131(2):405-18.
- Goncalves D, Barataud A, De Vadder F, Vinera J, Zitoun C, Duchamp A, et al. Bile Routing Modification Reproduces Key Features of Gastric Bypass in Rat. *Ann Surg*. 8 janv 2015;
- Grober J, Zaghini I, Fujii H, Jones SA, Kliewer SA, Willson TM, et al. Identification of a bile acid-responsive element in the human ileal bile acid-binding protein gene. Involvement of the farnesoid X receptor/9-cis-retinoic acid receptor heterodimer. *J Biol Chem*. 15 oct 1999;274(42):29749-54.
- Guay C, Jacovetti C, Nesca V, Motterle A, Tugay K, Regazzi R. Emerging roles of non-coding RNAs in pancreatic β -cell function and dysfunction. *Diabetes Obes Metab*. oct 2012;14 Suppl 3:12-21.
- Guay C, Regazzi R. Circulating microRNAs as novel biomarkers for diabetes mellitus. *Nat Rev Endocrinol*. sept 2013;9(9):513-21.

- Guay C, Regazzi R. MicroRNAs and the functional β cell mass: For better or worse. *Diabetes Metab.* 21 avr 2015a;.
- Guay C, Regazzi R. Role of islet microRNAs in diabetes: which model for which question? *Diabetologia.* mars 2015b;58(3):456-63.
- Guay C, Roggli E, Nesca V, Jacovetti C, Regazzi R. Diabetes mellitus, a microRNA-related disease? *Transl Res J Lab Clin Med.* avr 2011;157(4):253-64.
- Guillaumond F, Dardente H, Giguère V, Cermakian N. Differential control of Bmal1 circadian transcription by REV-ERB and ROR nuclear receptors. *J Biol Rhythms.* oct 2005;20(5):391-403.
- Gupta S, Pandak WM, Hylemon PB. LXR alpha is the dominant regulator of CYP7A1 transcription. *Biochem Biophys Res Commun.* 26 avr 2002;293(1):338-43.
- Gutierrez A, Ratliff EP, Andres AM, Huang X, McKeehan WL, Davis RA. Bile acids decrease hepatic paraoxonase 1 expression and plasma high-density lipoprotein levels via FXR-mediated signaling of FGFR4. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* févr 2006;26(2):301-6.
- Guttman M, Amit I, Garber M, French C, Lin MF, Feldser D, et al. Chromatin signature reveals over a thousand highly conserved large non-coding RNAs in mammals. *Nature.* 12 mars 2009;458(7235):223-7.
- Habener JF, Kemp DM, Thomas MK. Minireview: transcriptional regulation in pancreatic development. *Endocrinology.* mars 2005;146(3):1025-34.
- Haeusler RA, Astiarraga B, Camastra S, Accili D, Ferrannini E. Human insulin resistance is associated with increased plasma levels of 12 α -hydroxylated bile acids. *Diabetes.* déc 2013;62(12):4184-91.
- Haeusler RA, Pratt-Hyatt M, Welch CL, Klaassen CD, Accili D. Impaired Generation of 12-Hydroxylated Bile Acids Links Hepatic Insulin Signaling with Dyslipidemia. *Cell Metab.* janv 2012;15(1):65-74.
- Hagman DK, Hays LB, Parazzoli SD, Poitout V. Palmitate inhibits insulin gene expression by altering PDX-1 nuclear localization and reducing MafA expression in isolated rat islets of Langerhans. *J Biol Chem.* 16 sept 2005;280(37):32413-8.
- Halmy L, Fehér T, Steczek K, Farkas A. High serum bile acid level in obesity: its decrease during and after total fasting. *Acta Med Hung.* 1986;43(1):55-8.
- Hamilton-Williams EE, Rainbow DB, Cheung J, Christensen M, Lyons PA, Peterson LB, et al. Fine mapping of type 1 diabetes regions Idd9.1 and Idd9.2 reveals genetic complexity. *Mamm Genome Off J Int Mamm Genome Soc.* oct 2013;24(9-10):358-75.
- Handelsman Y. Role of bile acid sequestrants in the treatment of type 2 diabetes. *Diabetes Care.* mai 2011;34 Suppl 2:S244-50.

- Hansen M, Sonne DP, Knop FK. Bile acid sequestrants: glucose-lowering mechanisms and efficacy in type 2 diabetes. *Curr Diab Rep.* 2014;14(5):482.
- Han SJ, Lonard DM, O'Malley BW. Multi-modulation of nuclear receptor coactivators through posttranslational modifications. *Trends Endocrinol Metab TEM.* janv 2009;20(1):8-15.
- Harach T, Pols TWH, Nomura M, Maida A, Watanabe M, Auwerx J, et al. TGR5 potentiates GLP-1 secretion in response to anionic exchange resins. *Sci Rep.* 2012;2:430.
- Hara M, Wang X, Kawamura T, Bindokas VP, Dizon RF, Alcoser SY, et al. Transgenic mice with green fluorescent protein-labeled pancreatic beta -cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* janv 2003;284(1):E177-83.
- Hård T, Kellenbach E, Boelens R, Maler BA, Dahlman K, Freedman LP, et al. Solution structure of the glucocorticoid receptor DNA-binding domain. *Science.* 13 juill 1990;249(4965):157-60.
- Hargreaves DC, Crabtree GR. ATP-dependent chromatin remodeling: genetics, genomics and mechanisms. *Cell Res.* mars 2011;21(3):396-420.
- Hasegawa Y, Daitoku Y, Mizuno S, Tanimoto Y, Mizuno-Iijima S, Matsuo M, et al. Generation and characterization of Ins1-cre-driver C57BL/6N for exclusive pancreatic beta cell-specific Cre-loxP recombination. *Exp Anim Jpn Assoc Lab Anim Sci.* 2014;63(2):183-91.
- Hay CW, Docherty K. Comparative analysis of insulin gene promoters: implications for diabetes research. *Diabetes.* déc 2006;55(12):3201-13.
- Heery DM, Kalkhoven E, Hoare S, Parker MG. A signature motif in transcriptional co-activators mediates binding to nuclear receptors. *Nature.* 12 juin 1997;387(6634):733-6.
- Heffner CS, Herbert Pratt C, Babiuk RP, Sharma Y, Rockwood SF, Donahue LR, et al. Supporting conditional mouse mutagenesis with a comprehensive cre characterization resource. *Nat Commun.* 2012;3:1218.
- Henquin JC. Triggering and amplifying pathways of regulation of insulin secretion by glucose. *Diabetes.* nov 2000;49(11):1751-60.
- Henquin J-C. The dual control of insulin secretion by glucose involves triggering and amplifying pathways in β -cells. *Diabetes Res Clin Pract.* août 2011;93 Suppl 1:S27-31.
- Henquin J-C, Nenquin M, Stiernet P, Ahren B. In vivo and in vitro glucose-induced biphasic insulin secretion in the mouse: pattern and role of cytoplasmic Ca²⁺ and amplification signals in beta-cells. *Diabetes.* févr 2006;55(2):441-51.
- Herbert MR, Siegel DL, Staszewski L, Cayanan C, Banerjee U, Dhamija S, et al. Synthesis and SAR of 2-aryl-3-aminomethylquinolines as agonists of the bile acid receptor TGR5. *Bioorg Med Chem Lett.* 1 oct 2010;20(19):5718-21.

- Hermans MP, Schmeer W, Henquin JC. The permissive effect of glucose, tolbutamide and high K⁺ on arginine stimulation of insulin release in isolated mouse islets. *Diabetologia*. août 1987;30(8):659-65.
- Herrera PL. Adult insulin- and glucagon-producing cells differentiate from two independent cell lineages. *Dev Camb Engl*. juin 2000;127(11):2317-22.
- Hirokane H, Nakahara M, Tachibana S, Shimizu M, Sato R. 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*. 29 oct 2004;279(44):45685-92.
- Hirschfield GM, Mason A, Luketic V, Lindor K, Gordon SC, Mayo M, et al. Efficacy of obeticholic acid in patients with primary biliary cirrhosis and inadequate response to ursodeoxycholic acid. *Gastroenterology*. avr 2015;148(4):751-61.e8.
- Hittelman AB, Burakov D, Iñiguez-Lluhí JA, Freedman LP, Garabedian MJ. Differential regulation of glucocorticoid receptor transcriptional activation via AF-1-associated proteins. *EMBO J*. 1 oct 1999;18(19):5380-8.
- Hofmann AF. The continuing importance of bile acids in liver and intestinal disease. *Arch Intern Med*. 13 déc 1999;159(22):2647-58.
- Högenauer K, Arista L, Schmiedeberg N, Werner G, Jaksche H, Bouhelal R, et al. 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*. 26 déc 2014;57(24):10343-54.
- Hou R, Goldberg AC. Lowering low-density lipoprotein cholesterol: statins, ezetimibe, bile acid sequestrants, and combinations: comparative efficacy and safety. *Endocrinol Metab Clin North Am*. mars 2009;38(1):79-97.
- Howard WR, Pospisil JA, Njolito E, Noonan DJ. Catabolites of cholesterol synthesis pathways and forskolin as activators of the farnesoid X-activated nuclear receptor. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1 mars 2000;163(2):195-202.
- Howell SL, Tyhurst M. The cytoskeleton and insulin secretion. *Diabetes Metab Rev*. 1986;2(1-2):107-23.
- Huang F, Wang T, Lan Y, Yang L, Pan W, Zhu Y, et al. Deletion of mouse FXR gene disturbs multiple neurotransmitter systems and alters neurobehavior. *Front Behav Neurosci*. 2015;9:70.
- Huber RM, Murphy K, Miao B, Link JR, Cunningham MR, Rupar MJ, et al. Generation of multiple farnesoid-X-receptor isoforms through the use of alternative promoters. *Gene*. 2002;290(1):35-43.
- Hussain MA, Habener JF. Glucagon-like peptide 1 increases glucose-dependent activity of the homeoprotein IDX-1 transactivating domain in pancreatic beta-cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 11 août 2000;274(3):616-9.

- Hu X, Bonde Y, Eggertsen G, Rudling M. Muricholic bile acids are potent regulators of bile acid synthesis via a positive feedback mechanism. *J Intern Med.* janv 2014;275(1):27-38.
- Hu X, Lazar MA. The CoRNR motif controls the recruitment of corepressors by nuclear hormone receptors. *Nature.* 4 nov 1999;402(6757):93-6.
- Hu X, Li Y, Lazar MA. Determinants of CoRNR-dependent repression complex assembly on nuclear hormone receptors. *Mol Cell Biol.* mars 2001;21(5):1747-58.
- Ikeda H, Ueda M, Ikeda M, Kobayashi H, Honda Y. Oxysterol 7alpha-hydroxylase (CYP39A1) in the ciliary nonpigmented epithelium of bovine eye. *Lab Investig J Tech Methods Pathol.* mars 2003;83(3):349-55.
- Ikeda T, Fujiyama K, Hoshino T, Tanaka Y, Takeuchi T, Mashiba H, et al. Acute effect of thyroid hormone on insulin secretion in rats. *Biochem Pharmacol.* 15 oct 1990;40(8):1769-71.
- Ishihara H, Asano T, Tsukuda K, Katagiri H, Inukai K, Anai M, et al. Pancreatic beta cell line MIN6 exhibits characteristics of glucose metabolism and glucose-stimulated insulin secretion similar to those of normal islets. *Diabetologia.* nov 1993;36(11):1139-45.
- Itkin-Ansari P, Marcora E, Geron I, Tyrberg B, Demeterco C, Hao E, et al. NeuroD1 in the endocrine pancreas: localization and dual function as an activator and repressor. *Dev Dyn Off Publ Am Assoc Anat.* juill 2005;233(3):946-53.
- Ito M, Roeder RG. The TRAP/SMCC/Mediator complex and thyroid hormone receptor function. *Trends Endocrinol Metab TEM.* avr 2001;12(3):127-34.
- Jacqueminet S, Briaud I, Rouault C, Reach G, Poitout V. Inhibition of insulin gene expression by long-term exposure of pancreatic beta cells to palmitate is dependent on the presence of a stimulatory glucose concentration. *Metabolism.* avr 2000;49(4):532-6.
- Jansen PLM, van Werven J, Aarts E, Berends F, Janssen I, Stoker J, et al. Alterations of hormonally active fibroblast growth factors after Roux-en-Y gastric bypass surgery. *Dig Dis Basel Switz.* 2011;29(1):48-51.
- Jewell JL, Luo W, Oh E, Wang Z, Thurmond DC. Filamentous actin regulates insulin exocytosis through direct interaction with Syntaxin 4. *J Biol Chem.* 18 avr 2008;283(16):10716-26.
- Jiang C, Xie C, Li F, Zhang L, Nichols RG, Krausz KW, et al. Intestinal farnesoid X receptor signaling promotes nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Invest.* janv 2015;125(1):386-402.
- Jitrapakdee S, Wutthisathapornchai A, Wallace JC, MacDonald MJ. Regulation of insulin secretion: role of mitochondrial signalling. *Diabetologia.* juin 2010;53(6):1019-32.
- Jo J, Choi MY, Koh D-S. Size Distribution of Mouse Langerhans Islets. *Biophys J.* 15 oct 2007;93(8):2655-66.

- Jørgensen NB, Dirksen C, Bojsen-Møller KN, Kristiansen VB, Wulff BS, Rainteau D, et al. Improvements in glucose metabolism early after gastric bypass surgery are not explained by increases in total bile acids and fibroblast growth factor 19 concentrations. *J Clin Endocrinol Metab.* mars 2015;100(3):E396-406.
- Julve J, Pardina E, Pérez-Cuéllar M, Ferrer R, Rossell J, Baena-Fustegueras JA, et al. Bariatric surgery in morbidly obese patients improves the atherogenic qualitative properties of the plasma lipoproteins. *Atherosclerosis.* mai 2014;234(1):200-5.
- Kadowaki T, Yamauchi T. Adiponectin and adiponectin receptors. *Endocr Rev.* mai 2005;26(3):439-51.
- Kalsbeek A, la Fleur S, Fliers E. Circadian control of glucose metabolism. *Mol Metab.* juill 2014;3(4):372-83.
- Kalsbeek A, La Fleur S, Van Heijningen C, Buijs RM. Suprachiasmatic GABAergic inputs to the paraventricular nucleus control plasma glucose concentrations in the rat via sympathetic innervation of the liver. *J Neurosci Off J Soc Neurosci.* 1 sept 2004;24(35):7604-13.
- Kalsbeek A, Strubbe JH. Circadian Control of Insulin Secretion Is Independent of the Temporal Distribution of Feeding. *Physiol Behav.* février 1998;63(4):553-60.
- Kalsbeek A, Yi C-X, La Fleur SE, Fliers E. The hypothalamic clock and its control of glucose homeostasis. *Trends Endocrinol Metab TEM.* juill 2010;21(7):402-10.
- Kameswaran V, Kaestner KH. The Missing lnc(RNA) between the pancreatic β -cell and diabetes. *Front Genet.* 2014;5:200.
- Kast HR, Nguyen CM, Sinal CJ, Jones SA, Laffitte BA, Reue K, et al. Farnesoid X-activated receptor induces apolipoprotein C-II transcription: a molecular mechanism linking plasma triglyceride levels to bile acids. *Mol Endocrinol Baltim Md.* oct 2001;15(10):1720-8.
- Kaur A, Patankar JV, de Haan W, Ruddle P, Wijesekara N, Groen AK, et al. Loss of Cyp8b1 improves glucose homeostasis by increasing GLP-1. *Diabetes.* avr 2015;64(4):1168-79.
- Kawabe T, Morgan CR. Multiple effects of growth hormone on insulin release from isolated pancreatic islets. *Metabolism.* juill 1983;32(7):728-31.
- Kawamata Y, Fujii R, Hosoya M, Harada M, Yoshida H, Miwa M, et al. A G protein-coupled receptor responsive to bile acids. *J Biol Chem.* 14 mars 2003;278(11):9435-40.
- Keitel V, Cupisti K, Ullmer C, Knoefel WT, Kubitz R, Häussinger D. The membrane-bound bile acid receptor TGR5 is localized in the epithelium of human gallbladders. *Hepatology Baltim Md.* sept 2009;50(3):861-70.

- Kelpe CL, Moore PC, Parazzoli SD, Wicksteed B, Rhodes CJ, Poitout V. Palmitate inhibition of insulin gene expression is mediated at the transcriptional level via ceramide synthesis. *J Biol Chem.* 8 août 2003;278(32):30015-21.
- Kim J-W, Seghers V, Cho J-H, Kang Y, Kim S, Ryu Y, et al. Transactivation of the mouse sulfonylurea receptor I gene by BETA2/NeuroD. *Mol Endocrinol Baltim Md.* mai 2002;16(5):1097-107.
- Kinoshita M, Kawamura M, Fujita M, Hirota D, Suda T, Taki M, et al. Enhanced susceptibility of LDL to oxidative modification in a CTX patient:- role of chenodeoxycholic acid in xanthoma formation. *J Atheroscler Thromb.* 2004;11(3):167-72.
- Kir S, Beddow SA, Samuel VT, Miller P, Previs SF, Suino-Powell K, et al. FGF19 as a postprandial, insulin-independent activator of hepatic protein and glycogen synthesis. *Science.* 25 mars 2011;331(6024):1621-4.
- Kishi A, Nakamura T, Nishio Y, Maegawa H, Kashiwagi A. Sumoylation of Pdx1 is associated with its nuclear localization and insulin gene activation. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* avr 2003;284(4):E830-40.
- Kitamura YI, Kitamura T, Kruse J-P, Raum JC, Stein R, Gu W, et al. FoxO1 protects against pancreatic beta cell failure through NeuroD and MafA induction. *Cell Metab.* sept 2005;2(3):153-63.
- Kobayashi Y, Hensch TK. Germline recombination by conditional gene targeting with Parvalbumin-Cre lines. *Front Neural Circuits.* 2013;7:168.
- Kohli R, Bradley D, Setchell KD, Eagon JC, Abumrad N, Klein S. Weight loss induced by Roux-en-Y gastric bypass but not laparoscopic adjustable gastric banding increases circulating bile acids. *J Clin Endocrinol Metab.* avr 2013a;98(4):E708-12.
- Kohli R, Kirby M, Setchell KDR, Jha P, Klustaitis K, Woollett LA, et al. Intestinal adaptation after ileal interposition surgery increases bile acid recycling and protects against obesity-related comorbidities. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* sept 2010;299(3):G652-60.
- Kohli R, Setchell KD, Kirby M, Myronovych A, Ryan KK, Ibrahim SH, et al. A surgical model in male obese rats uncovers protective effects of bile acids post-bariatric surgery. *Endocrinology.* juill 2013b;154(7):2341-51.
- Kong B, Wang L, Chiang JYL, Zhang Y, Klaassen CD, Guo GL. Mechanism of tissue-specific farnesoid X receptor in suppressing the expression of genes in bile-acid synthesis in mice. *Hepatology Baltim Md.* sept 2012a;56(3):1034-43.
- Kong D, Tong Q, Ye C, Koda S, Fuller PM, Krashes MJ, et al. GABAergic RIP-Cre Neurons in the Arcuate Nucleus Selectively Regulate Energy Expenditure. *Cell.* 26 oct 2012b;151(3):645-57.

- Kramer W, Glombik H. Bile acid reabsorption inhibitors (BARI): novel hypolipidemic drugs. *Curr Med Chem.* 2006;13(9):997-1016.
- Ku GM, Kim H, Vaughn IW, Hangauer MJ, Myung Oh C, German MS, et al. Research resource: RNA-Seq reveals unique features of the pancreatic β -cell transcriptome. *Mol Endocrinol Baltim Md.* oct 2012;26(10):1783-92.
- Kullak-ublick GA, Stieger B, Meier PJ. Enterohepatic bile salt transporters in normal physiology and liver disease. *Gastroenterology.* janv 2004;126(1):322-42.
- Kumar Jha P, Challet E, Kalsbeek A. Circadian rhythms in glucose and lipid metabolism in nocturnal and diurnal mammals. *Mol Cell Endocrinol.* 2015 Feb 7;
- Kumar DP, Rajagopal S, Mahavadi S, Mirshahi F, Grider JR, Murthy KS, et al. Activation of transmembrane bile acid receptor TGR5 stimulates insulin secretion in pancreatic β cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 26 oct 2012;427(3):600-5.
- Kwan EP, Gaisano HY. Glucagon-like peptide 1 regulates sequential and compound exocytosis in pancreatic islet beta-cells. *Diabetes.* sept 2005;54(9):2734-43.
- Kwan EP, Gao X, Leung YM, Gaisano HY. Activation of exchange protein directly activated by cyclic adenosine monophosphate and protein kinase A regulate common and distinct steps in promoting plasma membrane exocytic and granule-to-granule fusions in rat islet beta cells. *Pancreas.* oct 2007;35(3):e45-54.
- Kyriazis GA, Soundarapandian MM, Tyrberg B. Sweet taste receptor signaling in beta cells mediates fructose-induced potentiation of glucose-stimulated insulin secretion. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 21 févr 2012;109(8):E524-32.
- Laffitte BA, Kast HR, Nguyen CM, Zavacki AM, Moore DD, Edwards PA. Identification of the DNA binding specificity and potential target genes for the farnesoid X-activated receptor. *J Biol Chem.* 7 avr 2000;275(14):10638-47.
- La Fleur SE. Daily rhythms in glucose metabolism: suprachiasmatic nucleus output to peripheral tissue. *J Neuroendocrinol.* mars 2003;15(3):315-22.
- Lake AD, Novak P, Shipkova P, Aranibar N, Robertson D, Reily MD, et al. Decreased hepatotoxic bile acid composition and altered synthesis in progressive human nonalcoholic fatty liver disease. *Toxicol Appl Pharmacol.* avril 2013;268(2):132-40.
- Lambert G, Amar MJA, Guo G, Brewer HB, Gonzalez FJ, Sinal CJ. The farnesoid X-receptor is an essential regulator of cholesterol homeostasis. *J Biol Chem.* 24 janv 2003;278(4):2563-70.
- Lamia KA, Evans RM. Metabolism: Tick, tock, a beta-cell clock. *Nature.* 29 juill 2010;466(7306):571-2.
- Landrier J-F, Eloranta JJ, Vavricka SR, Kullak-Ublick GA. The nuclear receptor for bile acids, FXR, transactivates human organic solute transporter-alpha and -beta genes. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* mars 2006;290(3):G476-85.

- Langhi C, Le May C, Kourimate S, Caron S, Staels B, Krempf M, et al. Activation of the farnesoid X receptor represses PCSK9 expression in human hepatocytes. *FEBS Lett.* 19 mars 2008;582(6):949-55.
- LaRusso NF, Hoffman NE, Korman MG, Hofmann AF, Cowen AE. Determinants of fasting and postprandial serum bile acid levels in healthy man. *Am J Dig Dis.* mai 1978;23(5):385-91.
- Lassailly G, Caiazzo R, Buob D, Pigeyre M, Verkindt H, Labreuche J, et al. Bariatric Surgery Reduces Features of Nonalcoholic Steatohepatitis in Morbidly Obese Patients. *Gastroenterology.* août 2015;149(2):379-88; quiz e15-6.
- Lavery DJ, Schibler U. Circadian transcription of the cholesterol 7 alpha hydroxylase gene may involve the liver-enriched bZIP protein DBP. *Genes Dev.* oct 1993;7(10):1871-84.
- Lazo de la Vega-Monroy ML, Fernandez-Mejia C, Beta-Cell Function and Failure in Type 1 Diabetes, "Type 1 Diabetes - Pathogenesis, Genetics and Immunotherapy", book edited by David Wagner, ISBN 978-953-307-362-0, Published: November 25, 2011 under CC BY 3.0 license. © The Author(s).
- Lecavalier L, Bolli G, Cryer P, Gerich J. Contributions of gluconeogenesis and glycogenolysis during glucose counterregulation in normal humans. *Am J Physiol.* juin 1989;256(6 Pt 1):E844-51.
- Lee J, Moulik M, Fang Z, Saha P, Zou F, Xu Y, et al. Bmal1 and β -cell clock are required for adaptation to circadian disruption, and their loss of function leads to oxidative stress-induced β -cell failure in mice. *Mol Cell Biol.* juin 2013a;33(11):2327-38.
- Lee J, Padhye A, Sharma A, Song G, Miao J, Mo Y-Y, et al. A pathway involving farnesoid X receptor and small heterodimer partner positively regulates hepatic sirtuin 1 levels via microRNA-34a inhibition. *J Biol Chem.* 23 avr 2010;285(17):12604-11.
- Lee J-Y, Ristow M, Lin X, White MF, Magnuson MA, Hennighausen L. RIP-Cre revisited, evidence for impairments of pancreatic beta-cell function. *J Biol Chem.* 3 févr 2006;281(5):2649-53.
- Lee KY, Russell SJ, Ussar S, Boucher J, Vernochet C, Mori MA, et al. Lessons on conditional gene targeting in mouse adipose tissue. *Diabetes.* mars 2013b;62(3):864-74.
- Lefebvre P, Cariou B, Lien F, Kuipers F, Staels B. Role of bile acids and bile acid receptors in metabolic regulation. *Physiol Rev.* janv 2009;89(1):147-91.
- Lehmann JM, Kliewer SA, Moore LB, Smith-Oliver TA, Oliver BB, Su JL, et al. Activation of the nuclear receptor LXR by oxysterols defines a new hormone response pathway. *J Biol Chem.* 7 févr 1997;272(6):3137-40.

- Le Martelot G, Claudel T, Gatfield D, Schaad O, Kornmann B, Lo Sasso G, et al. REV-ERB α participates in circadian SREBP signaling and bile acid homeostasis. *PLoS Biol.* sept 2009;7(9):e1000181.
- de Lera AR, Bourguet W, Altucci L, Gronemeyer H. Design of selective nuclear receptor modulators: RAR and RXR as a case study. *Nat Rev Drug Discov.* oct 2007;6(10):811-20.
- Lew J-L, Zhao A, Yu J, Huang L, Pedro N de, Peláez F, et al. The Farnesoid X Receptor Controls Gene Expression in a Ligand- and Promoter-selective Fashion. *J Biol Chem.* 3 mai 2004;279(10):8856-61.
- Lien F, Berthier A, Bouchaert E, Gheeraert C, Alexandre J, Porez G, et al. Metformin interferes with bile acid homeostasis through AMPK-FXR crosstalk. *J Clin Invest.* 3 mars 2014;124(3):1037-51.
- Li F, Jiang C, Krausz KW, Li Y, Albert I, Hao H, et al. Microbiome remodelling leads to inhibition of intestinal farnesoid X receptor signalling and decreased obesity. *Nat Commun.* 2013;4:2384.
- Li-Hawkins J, Lund EG, Turley SD, Russell DW. Disruption of the oxysterol 7 α -hydroxylase gene in mice. *J Biol Chem.* 2 juin 2000;275(22):16536-42.
- Lindor KD, Kowdley KV, Luketic VAC, Harrison ME, McCashland T, Befeler AS, et al. High-dose ursodeoxycholic acid for the treatment of primary sclerosing cholangitis. *Hepatology* Baltim Md. sept 2009;50(3):808-14.
- Lindqvist A, Spégel P, Ekelund M, Mulder H, Groop L, Hedenbro J, et al. Effects of ingestion routes on hormonal and metabolic profiles in gastric-bypassed humans. *J Clin Endocrinol Metab.* mai 2013;98(5):E856-61.
- Lindsay TH, Halvorson KG, Peters CM, Ghilardi JR, Kuskowski MA, Wong GY, et al. A quantitative analysis of the sensory and sympathetic innervation of the mouse pancreas. *Neuroscience.* 2006;137(4):1417-26.
- Liou AP, Paziuk M, Luevano J-M, Machineni S, Turnbaugh PJ, Kaplan LM. Conserved shifts in the gut microbiota due to gastric bypass reduce host weight and adiposity. *Sci Transl Med.* 27 mars 2013;5(178):178ra41.
- Li S, Hsu DDF, Li B, Luo X, Alderson N, Qiao L, et al. Cytoplasmic tyrosine phosphatase Shp2 coordinates hepatic regulation of bile acid and FGF15/19 signaling to repress bile acid synthesis. *Cell Metab.* 5 août 2014;20(2):320-32.
- Li T, Francl JM, Boehme S, Ochoa A, Zhang Y, Klaassen CD, et al. Glucose and insulin induction of bile acid synthesis: mechanisms and implication in diabetes and obesity. *J Biol Chem.* 13 janv 2012;287(3):1861-73.
- Li T, Holmstrom SR, Kir S, Umetani M, Schmidt DR, Kliewer SA, et al. The G protein-coupled bile acid receptor, TGR5, stimulates gallbladder filling. *Mol Endocrinol* Baltim Md. juin 2011;25(6):1066-71.

- Liu W-Y, Xie D-M, Zhu G-Q, Huang G-Q, Lin Y-Q, Wang L-R, et al. Targeting fibroblast growth factor 19 in liver disease: a potential biomarker and therapeutic target. *Expert Opin Ther Targets*. mai 2015;19(5):675-85.
- Liu Y, Suckale J, Masjkur J, Magro MG, Steffen A, Anastassiadis K, et al. Tamoxifen-independent recombination in the RIP-CreER mouse. *PLoS One*. 2010;5(10):e13533.
- Lonard DM, Kumar R, O'Malley BW. Minireview: the SRC family of coactivators: an entrée to understanding a subset of polygenic diseases? *Mol Endocrinol Baltim Md*. févr 2010;24(2):279-85.
- Lundåsen T, Gälman C, Angelin B, Rudling M. Circulating intestinal fibroblast growth factor 19 has a pronounced diurnal variation and modulates hepatic bile acid synthesis in man. *J Intern Med*. déc 2006;260(6):530-6.
- Lund EG, Guileyardo JM, Russell DW. cDNA cloning of cholesterol 24-hydroxylase, a mediator of cholesterol homeostasis in the brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 22 juin 1999;96(13):7238-43.
- Lustig RH. Autonomic dysfunction of the beta-cell and the pathogenesis of obesity. *Rev Endocr Metab Disord*. mars 2003;4(1):23-32.
- Macfarlane WM, McKinnon CM, Felton-Edkins ZA, Cragg H, James RF, Docherty K. Glucose stimulates translocation of the homeodomain transcription factor PDX1 from the cytoplasm to the nucleus in pancreatic beta-cells. *J Biol Chem*. 8 janv 1999;274(2):1011-6.
- Maechler P, Li N, Casimir M, Vetterli L, Frigerio F, Brun T. Role of mitochondria in beta-cell function and dysfunction. *Adv Exp Med Biol*. 2010;654:193-216.
- Magnan C, Ktorza A. Production and secretion of insulin by the pancreatic b-cell, *EMC-Endocrinologie*, 2005; 2:241-264
- Magnuson MA, Osipovich AB. Pancreas-specific Cre driver lines and considerations for their prudent use. *Cell Metab*. 2 juill 2013;18(1):9-20.
- Magnusson I, Rothman DL, Gerard DP, Katz LD, Shulman GI. Contribution of hepatic glycogenolysis to glucose production in humans in response to a physiological increase in plasma glucagon concentration. *Diabetes*. févr 1995;44(2):185-9.
- Makishima M, Okamoto AY, Repa JJ, Tu H, Learned RM, Luk A, et al. Identification of a nuclear receptor for bile acids. *Science*. 21 mai 1999;284(5418):1362-5.
- Mak PA, Kast-Woelbern HR, Anisfeld AM, Edwards PA. Identification of PLTP as an LXR target gene and apoE as an FXR target gene reveals overlapping targets for the two nuclear receptors. *J Lipid Res*. déc 2002;43(12):2037-41.
- Ma K, Saha PK, Chan L, Moore DD. Farnesoid X receptor is essential for normal glucose homeostasis. *J Clin Invest*. 3 avr 2006;116(4):1102-9.

- Mališová L, Kováčová Z, Koc M, Kračmerová J, Štich V, Rossmeislová L. Ursodeoxycholic Acid but Not Tauroursodeoxycholic Acid Inhibits Proliferation and Differentiation of Human Subcutaneous Adipocytes. *PLoS ONE*. décembre 2013;8(12):e82086.
- Maloney PR, Parks DJ, Haffner CD, Fivush AM, Chandra G, Plunket KD, et al. Identification of a chemical tool for the orphan nuclear receptor FXR. *J Med Chem*. 10 août 2000;43(16):2971-4.
- Marcheva B, Ramsey KM, Bass J. Circadian genes and insulin exocytosis. *Cell Logist*. 2011;1(1):32-6.
- Marcheva B, Ramsey KM, Buhr ED, Kobayashi Y, Su H, Ko CH, et al. Disruption of the clock components CLOCK and BMAL1 leads to hypoinsulinaemia and diabetes. *Nature*. 29 juill 2010;466(7306):627-31.
- Marcheva B, Ramsey KM, Peek CB, Affinati A, Maury E, Bass J. Circadian clocks and metabolism. *Handb Exp Pharmacol*. 2013;(217):127-55.
- Marrapodi M, Chiang JY. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha) and agonist inhibit cholesterol 7alpha-hydroxylase gene (CYP7A1) transcription. *J Lipid Res*. avr 2000;41(4):514-20.
- Maruyama T, Miyamoto Y, Nakamura T, Tamai Y, Okada H, Sugiyama E, et al. Identification of membrane-type receptor for bile acids (M-BAR). *Biochem Biophys Res Commun*. 15 nov 2002;298(5):714-9.
- Mathurin P, Hollebecque A, Arnalsteen L, Buob D, Leteurtre E, Caiazzo R, et al. Prospective study of the long-term effects of bariatric surgery on liver injury in patients without advanced disease. *Gastroenterology*. août 2009;137(2):532-40.
- Matsukuma KE, Bennett MK, Huang J, Wang L, Gil G, Osborne TF. Coordinated control of bile acids and lipogenesis through FXR-dependent regulation of fatty acid synthase. *J Lipid Res*. déc 2006;47(12):2754-61.
- McKenna NJ, O'Malley BW. Minireview: nuclear receptor coactivators--an update. *Endocrinology*. juill 2002;143(7):2461-5.
- Meier PJ, Stieger B. Bile salt transporters. *Annu Rev Physiol*. 2002;64:635-61.
- Melloul D, Ben-Neriah Y, Cerasi E. Glucose modulates the binding of an islet-specific factor to a conserved sequence within the rat I and the human insulin promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1 mai 1993;90(9):3865-9.
- Melloul D, Marshak S, Cerasi E. Regulation of insulin gene transcription. *Diabetologia*. mars 2002;45(3):309-26.
- Mencarelli A, Renga B, D'Amore C, Santorelli C, Graziosi L, Bruno A, et al. Dissociation of intestinal and hepatic activities of FXR and LXR α supports metabolic effects of terminal ileum interposition in rodents. *Diabetes*. oct 2013;62(10):3384-93.

- Métivier R, Penot G, Hübner MR, Reid G, Brand H, Kos M, et al. Estrogen receptor- α directs ordered, cyclical, and combinatorial recruitment of cofactors on a natural target promoter. *Cell*. 12 déc 2003;115(6):751-63.
- Miguel JC, Abdel-Wahab YHA, Green BD, Mathias PCF, Flatt PR. Cooperative enhancement of insulinotropic action of GLP-1 by acetylcholine uncovers paradoxical inhibitory effect of beta cell muscarinic receptor activation on adenylate cyclase activity. *Biochem Pharmacol*. 15 janv 2003;65(2):283-92.
- Mi L-Z, Devarakonda S, Harp JM, Han Q, Pellicciari R, Willson TM, et al. Structural basis for bile acid binding and activation of the nuclear receptor FXR. *Mol Cell*. avr 2003;11(4):1093-100.
- Miyazaki J, Araki K, Yamato E, Ikegami H, Asano T, Shibasaki Y, et al. Establishment of a pancreatic beta cell line that retains glucose-inducible insulin secretion: special reference to expression of glucose transporter isoforms. *Endocrinology*. juill 1990;127(1):126-32.
- Moates JM, Nanda S, Cissell MA, Tsai M-J, Stein R. BETA2 activates transcription from the upstream glucokinase gene promoter in islet beta-cells and gut endocrine cells. *Diabetes*. févr 2003;52(2):403-8.
- Modica S, Gadaleta RM, Moschetta A. Deciphering the nuclear bile acid receptor FXR paradigm. *Nucl Recept Signal*. 2010;8:e005.
- Mohawk JA, Green CB, Takahashi JS. Central and peripheral circadian clocks in mammals. *Annu Rev Neurosci*. 2012;35:445-62.
- Mokadem M, Zechner JF, Margolskee RF, Drucker DJ, Aguirre V. Effects of Roux-en-Y gastric bypass on energy and glucose homeostasis are preserved in two mouse models of functional glucagon-like peptide-1 deficiency. *Mol Metab*. avr 2014;3(2):191-201.
- Morán I, Akerman I, van de Bunt M, Xie R, Benazra M, Nammo T, et al. Human β cell transcriptome analysis uncovers lncRNAs that are tissue-specific, dynamically regulated, and abnormally expressed in type 2 diabetes. *Cell Metab*. 3 oct 2012;16(4):435-48.
- Morton GJ, Matsen ME, Bracy DP, Meek TH, Nguyen HT, Stefanovski D, et al. FGF19 action in the brain induces insulin-independent glucose lowering. *J Clin Invest*. nov 2013;123(11):4799-808.
- Mudaliar S, Henry RR, Sanyal AJ, Morrow L, Marschall H-U, Kipnes M, et al. Efficacy and safety of the farnesoid X receptor agonist obeticholic acid in patients with type 2 diabetes and nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology*. sept 2013;145(3):574-82.e1.
- Mueller M, Thorell A, Claudel T, Jha P, Koefeler H, Lackner C, et al. Ursodeoxycholic Acid Exerts Farnesoid X Receptor-antagonistic Effects on Bile Acid and Lipid Metabolism in Morbid Obesity. *J Hepatol*. 21 janv 2015;

- Mühlbauer E, Gross E, Labucay K, Wolgast S, Peschke E. Loss of melatonin signalling and its impact on circadian rhythms in mouse organs regulating blood glucose. *Eur J Pharmacol.* 15 mars 2009;606(1-3):61-71.
- Mühlbauer E, Wolgast S, Finckh U, Peschke D, Peschke E. Indication of circadian oscillations in the rat pancreas. *FEBS Lett.* avril 2004;564(1-2):91-6.
- Mummadi RR, Kasturi KS, Chennareddygar S, Sood GK. Effect of bariatric surgery on nonalcoholic fatty liver disease: systematic review and meta-analysis. *Clin Gastroenterol Hepatol Off Clin Pract J Am Gastroenterol Assoc.* déc 2008;6(12):1396-402.
- Murtaugh LC. Pancreas and beta-cell development: from the actual to the possible. *Development.* 2 janv 2007;134(3):427-38.
- Muzumdar MD, Tasic B, Miyamichi K, Li L, Luo L. A global double-fluorescent Cre reporter mouse. *Genes N Y N* 2000. sept 2007;45(9):593-605.
- Nakahara M, Fujii H, Maloney PR, Shimizu M, Sato R. Bile acids enhance low density lipoprotein receptor gene expression via a MAPK cascade-mediated stabilization of mRNA. *J Biol Chem.* 4 oct 2002;277(40):37229-34.
- Nakamura K, Minami K, Tamura K, Iemoto K, Miki T, Seino S. Pancreatic β -cells are generated by neogenesis from non- β -cells after birth. *Biomed Res Tokyo Jpn.* avr 2011;32(2):167-74.
- Nakashima K, Kanda Y, Hirokawa Y, Kawasaki F, Matsuki M, Kaku K. MIN6 is not a pure beta cell line but a mixed cell line with other pancreatic endocrine hormones. *Endocr J.* 2009;56(1):45-53.
- Nakatani H, Kasama K, Oshiro T, Watanabe M, Hirose H, Itoh H. Serum bile acid along with plasma incretins and serum high-molecular weight adiponectin levels are increased after bariatric surgery. *Metabolism.* oct 2009;58(10):1400-7.
- Naya FJ, Huang HP, Qiu Y, Mutoh H, DeMayo FJ, Leiter AB, et al. Diabetes, defective pancreatic morphogenesis, and abnormal enteroendocrine differentiation in BETA2/neuroD-deficient mice. *Genes Dev.* 15 sept 1997;11(18):2323-34.
- Naya FJ, Stellrecht CM, Tsai MJ. Tissue-specific regulation of the insulin gene by a novel basic helix-loop-helix transcription factor. *Genes Dev.* 15 avr 1995;9(8):1009-19.
- Nauck M, Stöckmann F, Ebert R, Creutzfeldt W. Reduced incretin effect in type 2 (non-insulin-dependent) diabetes. *Diabetologia.* 1986 Jan;29(1):46-52.
- Neuschwander-Tetri BA, Loomba R, Sanyal AJ, Lavine JE, Van Natta ML, Abdelmalek MF, et al. Farnesoid X nuclear receptor ligand obeticholic acid for non-cirrhotic, non-alcoholic steatohepatitis (FLINT): a multicentre, randomised, placebo-controlled trial. *Lancet Lond Engl.* 14 mars 2015;385(9972):956-65.

- Nevins AK, Thurmond DC. Caveolin-1 functions as a novel Cdc42 guanine nucleotide dissociation inhibitor in pancreatic beta-cells. *J Biol Chem.* 14 juill 2006;281(28):18961-72.
- Noshiro M, Kawamoto T, Furukawa M, Fujimoto K, Yoshida Y, Sasabe E, et al. Rhythmic expression of DEC1 and DEC2 in peripheral tissues: DEC2 is a potent suppressor for hepatic cytochrome P450s opposing DBP. *Genes Cells Devoted Mol Cell Mech.* avr 2004;9(4):317-29.
- Noshiro M, Usui E, Kawamoto T, Kubo H, Fujimoto K, Furukawa M, et al. Multiple mechanisms regulate circadian expression of the gene for cholesterol 7 α -hydroxylase (Cyp7a), a key enzyme in hepatic bile acid biosynthesis. *J Biol Rhythms.* août 2007;22(4):299-311.
- Onate SA, Boonyaratanakornkit V, Spencer TE, Tsai SY, Tsai MJ, Edwards DP, et al. The steroid receptor coactivator-1 contains multiple receptor interacting and activation domains that cooperatively enhance the activation function 1 (AF1) and AF2 domains of steroid receptors. *J Biol Chem.* 15 mai 1998;273(20):12101-8.
- Osto E, Doytcheva P, Corteville C, Bueter M, Dörig C, Stivala S, et al. Rapid and Body Weight-Independent Improvement of Endothelial and High-Density Lipoprotein Function After Roux-en-Y Gastric Bypass: Role of Glucagon-Like Peptide-1. *Circulation.* 10 mars 2015;131(10):871-81.
- Osto M, Abegg K, Bueter M, le Roux CW, Cani PD, Lutz TA. Roux-en-Y gastric bypass surgery in rats alters gut microbiota profile along the intestine. *Physiol Behav.* 2 juill 2013;119:92-6.
- Otte K, Kranz H, Kober I, Thompson P, Hoefler M, Haubold B, et al. Identification of farnesoid X receptor beta as a novel mammalian nuclear receptor sensing lanosterol. *Mol Cell Biol.* févr 2003;23(3):864-72.
- Oya M, Suzuki H, Watanabe Y, Sato M, Tsuboi T. Amino acid taste receptor regulates insulin secretion in pancreatic β -cell line MIN6 cells. *Genes Cells Devoted Mol Cell Mech.* mai 2011;16(5):608-16.
- Owens DR. New horizons — alternative routes for insulin therapy. *Nat Rev Drug Discov.* 2002 juillet;1(7):529-40.
- Parks DJ, Blanchard SG, Bledsoe RK, Chandra G, Consler TG, Kliewer SA, et al. Bile acids: natural ligands for an orphan nuclear receptor. *Science.* 21 mai 1999;284(5418):1365-8.
- Park S, Kang S, Lee H-W, Ko BS. Central prolactin modulates insulin sensitivity and insulin secretion in diabetic rats. *Neuroendocrinology.* 2012;95(4):332-43.
- Parseus A, Sommer N, Sommer F, Caesar R, Molinaro A, Ståhlam M et al. Microbiota-induced obesity requires farnesoid X receptor. *Gut.* 2015 In press

- Patané G, Caporarello N, Marchetti P, Parrino C, Sudano D, Marselli L, et al. Adiponectin increases glucose-induced insulin secretion through the activation of lipid oxidation. *Acta Diabetol.* déc 2013;50(6):851-7.
- Patel DD, Knight BL, Soutar AK, Gibbons GF, Wade DP. The effect of peroxisome-proliferator-activated receptor- α on the activity of the cholesterol 7 α -hydroxylase gene. *Biochem J.* 1 nov 2000;351 Pt 3:747-53.
- Pathak P, Li T, Chiang JYL. Retinoic acid-related orphan receptor α regulates diurnal rhythm and fasting induction of sterol 12 α -hydroxylase in bile acid synthesis. *J Biol Chem.* 27 déc 2013;288(52):37154-65.
- Patti M-E, Houten SM, Bianco AC, Bernier R, Larsen PR, Holst JJ, et al. Serum bile acids are higher in humans with prior gastric bypass: potential contribution to improved glucose and lipid metabolism. *Obes Silver Spring Md.* sept 2009;17(9):1671-7.
- Paumgartner G, Beuers U. Ursodeoxycholic acid in cholestatic liver disease: mechanisms of action and therapeutic use revisited. *Hepatol Baltim Md.* sept 2002;36(3):525-31.
- Pawlak M, Lefebvre P, Staels B. General molecular biology and architecture of nuclear receptors. *Curr Top Med Chem.* 2012;12(6):486-504.
- Pellicciari R, Fiorucci S, Camaioni E, Clerici C, Costantino G, Maloney PR, et al. 6 α -ethyl-chenodeoxycholic acid (6-ECDCA), a potent and selective FXR agonist endowed with anticholestatic activity. *J Med Chem.* 15 août 2002;45(17):3569-72.
- Penney NC, Kinross JM, Newton RC, Purkayastha S. The role of bile acids in reducing the metabolic complications of obesity after bariatric surgery: A systematic review. *Int J Obes* 2005. 17 juin 2015;
- Perilhou A, Tourrel-Cuzin C, Kharroubi I, Henique C, Fauveau V, Kitamura T, et al. The transcription factor COUP-TFII is negatively regulated by insulin and glucose via Foxo1- and ChREBP-controlled pathways. *Mol Cell Biol.* nov 2008;28(21):6568-79.
- Peschke E, Peschke D. Evidence for a circadian rhythm of insulin release from perfused rat pancreatic islets. *Diabetologia.* sept 1998;41(9):1085-92.
- Pineda Torra I, Claudel T, Duval C, Kosykh V, Fruchart J-C, Staels B. Bile acids induce the expression of the human peroxisome proliferator-activated receptor α gene via activation of the farnesoid X receptor. *Mol Endocrinol Baltim Md.* févr 2003;17(2):259-72.
- Pircher PC, Kitto JL, Petrowski ML, Tangirala RK, Bischoff ED, Schulman IG, et al. Farnesoid X receptor regulates bile acid-amino acid conjugation. *J Biol Chem.* 25 juill 2003;278(30):27703-11.
- Poitout V, Hagman D, Stein R, Artner I, Robertson RP, Harmon JS. Regulation of the Insulin Gene by Glucose and Fatty Acids. *J Nutr.* avr 2006;136(4):873-6.

- Pols TWH, Noriega LG, Nomura M, Auwerx J, Schoonjans K. The bile acid membrane receptor TGR5 as an emerging target in metabolism and inflammation. *J Hepatol.* juin 2011;54(6):1263-72.
- Pomplun D, Florian S, Schulz T, Pfeiffer AFH, Ristow M. Alterations of pancreatic beta-cell mass and islet number due to Ins2-controlled expression of Cre recombinase: RIP-Cre revisited; part 2. *Horm Metab Res Horm Stoffwechselforschung Horm Métabolisme.* mai 2007;39(5):336-40.
- Pooler PA, Duane WC. Effects of bile acid administration on bile acid synthesis and its circadian rhythm in man. *Hepatol Baltim Md.* oct 1988;8(5):1140-6.
- Popescu IR, Helleboid-Chapman A, Lucas A, Vandewalle B, Dumont J, Bouchaert E, et al. The nuclear receptor FXR is expressed in pancreatic beta-cells and protects human islets from lipotoxicity. *FEBS Lett.* 2 juill 2010;584(13):2845-51.
- Porez G, Prawitt J, Gross B, Staels B. Bile acid receptors as targets for the treatment of dyslipidemia and cardiovascular disease. *J Lipid Res.* sept 2012;53(9):1723-37.
- Pories WJ, Swanson MS, MacDonald KG, Long SB, Morris PG, Brown BM, et al. Who would have thought it? An operation proves to be the most effective therapy for adult-onset diabetes mellitus. *Ann Surg.* sept 1995;222(3):339-50; discussion 350-2.
- Postic C, Shiota M, Niswender KD, Jetton TL, Chen Y, Moates JM, et al. Dual roles for glucokinase in glucose homeostasis as determined by liver and pancreatic beta cell-specific gene knock-outs using Cre recombinase. *J Biol Chem.* 1 janv 1999;274(1):305-15.
- Post SM, Duez H, Gervois PP, Staels B, Kuipers F, Princen HM. Fibrates suppress bile acid synthesis via peroxisome proliferator-activated receptor-alpha-mediated downregulation of cholesterol 7alpha-hydroxylase and sterol 27-hydroxylase expression. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* nov 2001;21(11):1840-5.
- Potthoff MJ, Potts A, He T, Duarte JAG, Taussig R, Mangelsdorf DJ, et al. Colesevelam suppresses hepatic glycogenolysis by TGR5-mediated induction of GLP-1 action in DIO mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 15 févr 2013;304(4):G371-80.
- Poupon R. Ursodeoxycholic acid and bile-acid mimetics as therapeutic agents for cholestatic liver diseases: an overview of their mechanisms of action. *Clin Res Hepatol Gastroenterol.* sept 2012;36 Suppl 1:S3-12.
- Pournaras DJ, Glicksman C, Vincent RP, Kuganlipava S, Alaghband-Zadeh J, Mahon D, et al. The role of bile after Roux-en-Y gastric bypass in promoting weight loss and improving glycaemic control. *Endocrinology.* août 2012;153(8):3613-9.
- Pratt WB, Toft DO. Steroid receptor interactions with heat shock protein and immunophilin chaperones. *Endocr Rev.* juin 1997;18(3):306-60.

- Prawitt J, Abdelkarim M, Stroeve JHM, Popescu I, Duez H, Velagapudi VR, et al. Farnesoid X receptor deficiency improves glucose homeostasis in mouse models of obesity. *Diabetes*. juill 2011;60(7):1861-71.
- Prawitt J, Caron S, Staels B. Glucose-lowering effects of intestinal bile acid sequestration through enhancement of splanchnic glucose utilization. *Trends Endocrinol Metab TEM*. mai 2014;25(5):235-44.
- Preitner N, Damiola F, Lopez-Molina L, Zakany J, Duboule D, Albrecht U, et al. The orphan nuclear receptor REV-ERB α controls circadian transcription within the positive limb of the mammalian circadian oscillator. *Cell*. 26 juill 2002;110(2):251-60.
- Prentki M, Matschinsky FM, Madiraju SRM. Metabolic signaling in fuel-induced insulin secretion. *Cell Metab*. 2013 Aug 6;18(2):162-85.
- Prinz P, Hofmann T, Ahnis A, Elbelt U, Goebel-Stengel M, Klapp BF, et al. Plasma bile acids show a positive correlation with body mass index and are negatively associated with cognitive restraint of eating in obese patients. *Neuroendocr Sci*. 2015;9:199.
- Pulimeno P, Mannic T, Sage D, Giovannoni L, Salmon P, Lemeille S, et al. Autonomous and self-sustained circadian oscillators displayed in human islet cells. *Diabetologia*. mars 2013;56(3):497-507.
- Pullen TJ, Rutter GA. Roles of lncRNAs in pancreatic beta cell identity and diabetes susceptibility. *Front Genet*. 2014;5:193.
- Pullinger CR, Eng C, Salen G, Shefer S, Batta AK, Erickson SK, et al. Human cholesterol 7 α -hydroxylase (CYP7A1) deficiency has a hypercholesterolemic phenotype. *J Clin Invest*. juill 2002;110(1):109-17.
- Puzziferri N, Roshek TB, Mayo HG, Gallagher R, Belle SH, Livingston EH. Long-term follow-up after bariatric surgery: a systematic review. *JAMA*. 3 sept 2014;312(9):934-42.
- Rana K, Davey RA, Zajac JD. Human androgen deficiency: insights gained from androgen receptor knockout mouse models. *Asian J Androl*. 2014 Apr;16(2):169-77.
- Rastinejad F, Perlmann T, Evans RM, Sigler PB. Structural determinants of nuclear receptor assembly on DNA direct repeats. *Nature*. 18 mai 1995;375(6528):203-11.
- Reed MA, Pories WJ, Chapman W, Pender J, Bowden R, Barakat H, et al. Roux-en-Y gastric bypass corrects hyperinsulinemia implications for the remission of type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab*. août 2011;96(8):2525-31.
- Regazzi R, Ravazzola M, Iezzi M, Lang J, Zahraoui A, Anderegg E, et al. Expression, localization and functional role of small GTPases of the Rab3 family in insulin-secreting cells. *J Cell Sci*. sept 1996;109 (Pt 9):2265-73.

- Renga B, Mencarelli A, Vavassori P, Brancaleone V, Fiorucci S. The bile acid sensor FXR regulates insulin transcription and secretion. *Biochim Biophys Acta*. mars 2010;1802(3):363-72.
- Reppert SM, Weaver DR. Coordination of circadian timing in mammals. *Nature*. 29 août 2002;418(6901):935-41.
- Rizzo G, Disante M, Mencarelli A, Renga B, Gioiello A, Pellicciari R, et al. The farnesoid X receptor promotes adipocyte differentiation and regulates adipose cell function in vivo. *Mol Pharmacol*. oct 2006;70(4):1164-73.
- Rochette-Egly C, Germain P. Dynamic and combinatorial control of gene expression by nuclear retinoic acid receptors (RARs). *Nucl Recept Signal*. 2009;7:e005.
- Roduit R, Thorens B. Inhibition of glucose-induced insulin secretion by long-term preexposure of pancreatic islets to leptin. *FEBS Lett*. 29 sept 1997;415(2):179-82.
- Root C, Smith CD, Sundseth SS, Pink HM, Wilson JG, Lewis MC. Ileal bile acid transporter inhibition, CYP7A1 induction, and antilipemic action of 264W94. *J Lipid Res*. août 2002;43(8):1320-30.
- Rouillé Y, Westermark G, Martin SK, Steiner DF. Proglucagon is processed to glucagon by prohormone convertase PC2 in alpha TC1-6 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 12 avr 1994;91(8):3242-6.
- Rudling M, Camilleri M, Graffner H, Holst JJ, Rikner L. Specific inhibition of bile acid transport alters plasma lipids and GLP-1. *BMC Cardiovasc Disord*. 2015;15:75.
- Russell DW. The enzymes, regulation, and genetics of bile acid synthesis. *Annu Rev Biochem*. 2003;72:137-74.
- Ryan KK, Tremaroli V, Clemmensen C, Kovatcheva-Datchary P, Myronovych A, Karns R, et al. FXR is a molecular target for the effects of vertical sleeve gastrectomy. *Nature*. 8 mai 2014;509(7499):183-8.
- Rysz J, Gluba-Brzózka A, Mikhailidis DP, Banach M. Fibroblast growth factor 19-targeted therapies for the treatment of metabolic disease. *Expert Opin Investig Drugs*. mai 2015;24(5):603-10.
- Sadacca LA, Lamia KA, deLemos AS, Blum B, Weitz CJ. An intrinsic circadian clock of the pancreas is required for normal insulin release and glucose homeostasis in mice. *Diabetologia*. janv 2011;54(1):120-4.
- Sakai DD, Helms S, Carlstedt-Duke J, Gustafsson JA, Rottman FM, Yamamoto KR. Hormone-mediated repression: a negative glucocorticoid response element from the bovine prolactin gene. *Genes Dev*. sept 1988;2(9):1144-54.
- Sanger F, Thompson EO, Kitai R. The amide groups of insulin. *Biochem J*. mars 1955;59(3):509-18.

- Sauer B, Henderson N. Cre-stimulated recombination at loxP-containing DNA sequences placed into the mammalian genome. *Nucleic Acids Res.* 11 janv 1989;17(1):147-61.
- Sayin SI, Wahlström A, Felin J, Jäntti S, Marschall H-U, Bamberg K, et al. Gut microbiota regulates bile acid metabolism by reducing the levels of tauro-beta-muricholic acid, a naturally occurring FXR antagonist. *Cell Metab.* 5 févr 2013;17(2):225-35.
- Schibler U, Ripperger J, Brown SA. Peripheral circadian oscillators in mammals: time and food. *J Biol Rhythms.* juin 2003;18(3):250-60.
- Schmidt-Supprian M, Rajewsky K. Vagaries of conditional gene targeting. *Nat Immunol.* 2007;8(7):665-8.
- Scholtz S, Miras AD, Chhina N, Prechtel CG, Sleeth ML, Daud NM, et al. Obese patients after gastric bypass surgery have lower brain-hedonic responses to food than after gastric banding. *Gut.* juin 2014;63(6):891-902.
- Schwarz M, Russell DW, Dietschy JM, Turley SD. Alternate pathways of bile acid synthesis in the cholesterol 7 α -hydroxylase knockout mouse are not upregulated by either cholesterol or cholestyramine feeding. *J Lipid Res.* oct 2001;42(10):1594-603.
- Seino S, Shibasaki T, Minami K. Dynamics of insulin secretion and the clinical implications for obesity and diabetes. *J Clin Invest.* juin 2011;121(6):2118-25.
- Seol W, Choi HS, Moore DD. Isolation of proteins that interact specifically with the retinoid X receptor: two novel orphan receptors. *Mol Endocrinol Baltim Md.* janv 1995;9(1):72-85.
- Seufert J, Kieffer TJ, Habener JF. Leptin inhibits insulin gene transcription and reverses hyperinsulinemia in leptin-deficient ob/ob mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 19 janv 1999;96(2):674-9.
- Seyer P, Vallois D, Poitry-Yamate C, Schütz F, Metref S, Tarussio D, et al. Hepatic glucose sensing is required to preserve β cell glucose competence. *J Clin Invest.* 1 avr 2013;123(4):1662-76.
- Shang Q, Saumoy M, Holst JJ, Salen G, Xu G. 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.* mars 2010;298(3):G419-24.
- Shea SA, Hilton MF, Orlova C, Ayers RT, Mantzoros CS. Independent circadian and sleep/wake regulation of adipokines and glucose in humans. *J Clin Endocrinol Metab.* mai 2005;90(5):2537-44.
- Shibasaki T, Takahashi H, Miki T, Sunaga Y, Matsumura K, Yamanaka M, et al. Essential role of Epac2/Rap1 signaling in regulation of insulin granule dynamics by cAMP. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 4 déc 2007;104(49):19333-8.

- Shishodia S, Harikumar KB, Dass S, Ramawat KG, Aggarwal BB. The guggul for chronic diseases: ancient medicine, modern targets. *Anticancer Res.* déc 2008;28(6A):3647-64.
- Simonen M, Dali-Youcef N, Kaminska D, Venesmaa S, Käkälä P, Pääkkönen M, et al. Conjugated bile acids associate with altered rates of glucose and lipid oxidation after Roux-en-Y gastric bypass. *Obes Surg.* sept 2012;22(9):1473-80.
- Simrén M, Bajor A, Gillberg P-G, Rudling M, Abrahamsson H. Randomised clinical trial: The ileal bile acid transporter inhibitor A3309 vs. placebo in patients with chronic idiopathic constipation--a double-blind study. *Aliment Pharmacol Ther.* juill 2011;34(1):41-50.
- Sinal CJ, Tohkin M, Miyata M, Ward JM, Lambert G, Gonzalez FJ. Targeted disruption of the nuclear receptor FXR/BAR impairs bile acid and lipid homeostasis. *Cell.* 15 sept 2000;102(6):731-44.
- Sirvent A, Claudel T, Martin G, Brozek J, Kosykh V, Darteil R, et al. The farnesoid X receptor induces very low density lipoprotein receptor gene expression. *FEBS Lett.* 21 mai 2004a;566(1-3):173-7.
- Sirvent A, Verhoeven AJM, Jansen H, Kosykh V, Darteil RJ, Hum DW, et al. Farnesoid X receptor represses hepatic lipase gene expression. *J Lipid Res.* nov 2004b;45(11):2110-5.
- Solaas K, Ulvestad A, Söreide O, Kase BF. Subcellular organization of bile acid amidation in human liver: a key issue in regulating the biosynthesis of bile salts. *J Lipid Res.* juill 2000;41(7):1154-62.
- Song CS, Echchgadda I, Baek BS, Ahn SC, Oh T, Roy AK, et al. Dehydroepiandrosterone sulfotransferase gene induction by bile acid activated farnesoid X receptor. *J Biol Chem.* 9 nov 2001;276(45):42549-56.
- Song J, Xu Y, Hu X, Choi B, Tong Q. Brain expression of Cre recombinase driven by pancreas-specific promoters. *Genes N Y N* 2000. nov 2010;48(11):628-34.
- Song K-H, Li T, Owsley E, Strom S, Chiang JYL. Bile acids activate fibroblast growth factor 19 signaling in human hepatocytes to inhibit cholesterol 7 α -hydroxylase gene expression. *Hepatology Baltim Md.* janv 2009;49(1):297-305.
- Song X, Chen Y, Valanejad L, Kaimal R, Yan B, Stoner M, et al. Mechanistic insights into isoform-dependent and species-specific regulation of bile salt export pump by farnesoid X receptor. *J Lipid Res.* nov 2013;54(11):3030-44.
- Stamenkovic JA, Olsson AH, Nagorny CL, Malmgren S, Dekker-Nitert M, Ling C, et al. Regulation of core clock genes in human islets. *Metabolism.* juill 2012;61(7):978-85.
- Stayrook KR, Bramlett KS, Savkur RS, Ficorilli J, Cook T, Christe ME, et al. Regulation of carbohydrate metabolism by the farnesoid X receptor. *Endocrinology.* mars 2005;146(3):984-91.

- Stefater MA, Sandoval DA, Chambers AP, Wilson-Pérez HE, Hofmann SM, Jandacek R, et al. Sleeve gastrectomy in rats improves postprandial lipid clearance by reducing intestinal triglyceride secretion. *Gastroenterology*. sept 2011;141(3):939-49.e1-4.
- Steiner C, Othman A, Saely CH, Rein P, Drexel H, von Eckardstein A, et al. Bile acid metabolites in serum: intraindividual variation and associations with coronary heart disease, metabolic syndrome and diabetes mellitus. *PLoS One*. 2011;6(11):e25006.
- Steiner DF, James DE. Cellular and molecular biology of the beta cell. *Diabetologia*. déc 1992;35 Suppl 2:S41-8.
- Steinert RE, Peterli R, Keller S, Meyer-Gerspach AC, Drewe J, Peters T, et al. Bile acids and gut peptide secretion after bariatric surgery: a 1-year prospective randomized pilot trial. *Obes Silver Spring Md*. déc 2013;21(12):E660-8.
- Stroeve JHM, Brufau G, Stellaard F, Gonzalez FJ, Staels B, Kuipers F. Intestinal FXR-mediated FGF15 production contributes to diurnal control of hepatic bile acid synthesis in mice. *Lab Invest*. oct 2010;90(10):1457-67.
- Stroup D, Crestani M, Chiang JY. Identification of a bile acid response element in the cholesterol 7 alpha-hydroxylase gene CYP7A. *Am J Physiol*. août 1997;273(2 Pt 1):G508-17.
- Sussel L, Kalamaras J, Hartigan-O'Connor DJ, Meneses JJ, Pedersen RA, Rubenstein JL, et al. Mice lacking the homeodomain transcription factor Nkx2.2 have diabetes due to arrested differentiation of pancreatic beta cells. *Dev Camb Engl*. juin 1998;125(12):2213-21.
- Sweeney TE, Morton JM. The human gut microbiome: a review of the effect of obesity and surgically induced weight loss. *JAMA Surg*. juin 2013;148(6):563-9.
- Tailleux A, Rouskas K, Pattou F, Staels B. Bariatric surgery, lipoprotein metabolism and cardiovascular risk. *Curr Opin Lipidol*. 22 juin 2015;
- Talley NJ, Jones M, Nuyts G, Dubois D. Risk factors for chronic constipation based on a general practice sample. *Am J Gastroenterol*. mai 2003;98(5):1107-11.
- Tamarina NA, Roe MW, Philipson L. Characterization of mice expressing Ins1 gene promoter driven CreERT recombinase for conditional gene deletion in pancreatic β -cells. *Islets*. 2014;6(1):e27685.
- Tanenbaum DM, Wang Y, Williams SP, Sigler PB. Crystallographic comparison of the estrogen and progesterone receptor's ligand binding domains, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* mai 1998; 11: 5998-6003.
- Tang C, Ahmed K, Gille A, Lu S, Gröne H-J, Tunaru S, et al. Loss of FFA2 and FFA3 increases insulin secretion and improves glucose tolerance in type 2 diabetes. *Nat Med*. févr 2015;21(2):173-7.
- Taylor BL, Liu F-F, Sander M. Nkx6.1 is essential for maintaining the functional state of pancreatic beta cells. *Cell Rep*. 26 sept 2013;4(6):1262-75.

- Teitelman G, Kedees M. Mouse insulin cells expressing an inducible RIPCre transgene are functionally impaired. *J Biol Chem.* 6 févr 2015;290(6):3647-53.
- Teodoro JS, Rolo AP, Palmeira CM. Hepatic FXR: key regulator of whole-body energy metabolism. *Trends Endocrinol Metab TEM.* nov 2011;22(11):458-66.
- Thomas C, Pellicciari R, Pruzanski M, Auwerx J, Schoonjans K. Targeting bile-acid signalling for metabolic diseases. *Nat Rev Drug Discov.* août 2008;7(8):678-93.
- Thorens B, Mueckler M. Glucose transporters in the 21st Century. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* févr 2010;298(2):E141-5.
- Thorens B, Tarussio D, Maestro MA, Rovira M, Heikkilä E, Ferrer J. Ins1 (Cre) knock-in mice for beta cell-specific gene recombination. *Diabetologia.* 11 déc 2014;
- Thurmond DC, Gonelle-Gispert C, Furukawa M, Halban PA, Pessin JE. Glucose-stimulated insulin secretion is coupled to the interaction of actin with the t-SNARE (target membrane soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor protein) complex. *Mol Endocrinol Baltim Md.* avr 2003;17(4):732-42.
- Tilg H, Moschen AR, Kaser A. Obesity and the microbiota. *Gastroenterology.* mai 2009;136(5):1476-83.
- Tillmar L, Carlsson C, Welsh N. Control of insulin mRNA stability in rat pancreatic islets. Regulatory role of a 3'-untranslated region pyrimidine-rich sequence. *J Biol Chem.* 11 janv 2002;277(2):1099-106.
- Trabelsi M-S, Daoudi M, Prawitt J, Ducastel S, Touche V, Sayin SI, et al. Farnesoid X receptor inhibits glucagon-like peptide-1 production by enteroendocrine L cells. *Nat Commun.* 2015;6:7629.
- Trauner M, Boyer JL. Bile Salt Transporters: Molecular Characterization, Function, and Regulation. *Physiol Rev.* 1 avr 2003;83(2):633-71.
- Trauner M, Graziadei IW. Review article: mechanisms of action and therapeutic applications of ursodeoxycholic acid in chronic liver diseases. *Aliment Pharmacol Ther.* août 1999;13(8):979-96.
- Tremblay A, Tremblay GB, Labrie F, Giguère V. Ligand-independent recruitment of SRC-1 to estrogen receptor beta through phosphorylation of activation function AF-1. *Mol Cell.* avr 1999;3(4):513-9.
- Tucker JD, Dhanvantari S, Brubaker PL. Proglucagon processing in islet and intestinal cell lines. *Regul Pept.* 9 avr 1996;62(1):29-35.
- Twisk J, Hoekman MF, Lehmann EM, Meijer P, Mager WH, Princen HM. Insulin suppresses bile acid synthesis in cultured rat hepatocytes by down-regulation of cholesterol 7 alpha-hydroxylase and sterol 27-hydroxylase gene transcription. *Hepatology Baltim Md.* févr 1995;21(2):501-10.

- Uchida K, Makino S, Akiyoshi T. Altered bile acid metabolism in nonobese, spontaneously diabetic (NOD) mice. *Diabetes*. janv 1985;34(1):79-83.
- Uchida K, Satoh T, Takase H, Nomura Y, Takasu N, Kurihara H, et al. Altered bile acid metabolism related to atherosclerosis in alloxan diabetic rats. *J Atheroscler Thromb*. 1996;3(1):52-8.
- Umeda LM, Silva EA, Carneiro G, Arasaki CH, Geloneze B, Zanella MT. Early improvement in glycemic control after bariatric surgery and its relationships with insulin, GLP-1, and glucagon secretion in type 2 diabetic patients. *Obes Surg*. juill 2011;21(7):896-901.
- Urizar NL, Dowhan DH, Moore DD. The farnesoid X-activated receptor mediates bile acid activation of phospholipid transfer protein gene expression. *J Biol Chem*. 15 déc 2000;275(50):39313-7.
- Urizar NL, Liverman AB, Dodds DT, Silva FV, Ordentlich P, Yan Y, et al. A natural product that lowers cholesterol as an antagonist ligand for FXR. *Science*. 31 mai 2002;296(5573):1703-6.
- Van Cauter E, Polonsky KS, Scheen AJ. Roles of circadian rhythmicity and sleep in human glucose regulation. *Endocr Rev*. oct 1997;18(5):716-38.
- Vassileva G, Golovko A, Markowitz L, Abbondanzo SJ, Zeng M, Yang S, et al. Targeted deletion of Gpbar1 protects mice from cholesterol gallstone formation. *Biochem J*. 15 sept 2006;398(3):423-30.
- Verhaeghe R, Zerrweck C, Hubert T, Tréchet B, Gmyr V, D'Herbomez M, et al. Gastric bypass increases postprandial insulin and GLP-1 in nonobese minipigs. *Eur Surg Res Eur Chir Forsch Rech Chir Eur*. 2014;52(1-2):41-9.
- Vest AR, Heneghan HM, Agarwal S, Schauer PR, Young JB. Bariatric surgery and cardiovascular outcomes: a systematic review. *Heart Br Card Soc*. déc 2012;98(24):1763-77.
- Vieira E, Burris TP, Quesada I. Clock genes, pancreatic function, and diabetes. *Trends Mol Med*. déc 2014;20(12):685-93.
- Vieira E, Marroquí L, Batista TM, Caballero-Garrido E, Carneiro EM, Boschero AC, et al. The clock gene *Rev-erba* regulates pancreatic β -cell function: modulation by leptin and high-fat diet. *Endocrinology*. févr 2012;153(2):592-601.
- Vieira E, Marroquí L, Figueroa ALC, Merino B, Fernandez-Ruiz R, Nadal A, et al. Involvement of the clock gene *Rev-erb alpha* in the regulation of glucagon secretion in pancreatic alpha-cells. *PloS One*. 2013;8(7):e69939.
- Wagner M, Fickert P, Zollner G, Fuchsbichler A, Silbert D, Tsybrovskyy O, et al. Role of farnesoid X receptor in determining hepatic ABC transporter expression and liver injury in bile duct-ligated mice. *Gastroenterology*. sept 2003;125(3):825-38.

- Wang H, Chen J, Hollister K, Sowers LC, Forman BM. Endogenous bile acids are ligands for the nuclear receptor FXR/BAR. *Mol Cell*. mai 1999a;3(5):543-53.
- Wang H-W, Muguira M, Liu W-D, Zhang T, Chen C, Aucoin R, et al. Identification of an INSM1-binding site in the insulin promoter: negative regulation of the insulin gene transcription. *J Endocrinol*. 2008 Jul;198(1):29-39.
- Wang L, Opland D, Tsai S, Luk CT, Schroer SA, Allison MB, et al. Pten deletion in RIP-Cre neurons protects against type 2 diabetes by activating the anti-inflammatory reflex. *Nat Med*. mai 2014;20(5):484-92.
- Wang S, Lai K, Moy FJ, Bhat A, Hartman HB, Evans MJ. The nuclear hormone receptor farnesoid X receptor (FXR) is activated by androsterone. *Endocrinology*. sept 2006a;147(9):4025-33.
- Wang X, Cahill CM, Piñeyro MA, Zhou J, Doyle ME, Egan JM. Glucagon-like peptide-1 regulates the beta cell transcription factor, PDX-1, in insulinoma cells. *Endocrinology*. oct 1999b;140(10):4904-7.
- Wang Y, Jones PJH, Woollett LA, Buckley DD, Yao L, Granholm NA, et al. Effects of chenodeoxycholic acid and deoxycholic acid on cholesterol absorption and metabolism in humans. *Transl Res J Lab Clin Med*. juill 2006b;148(1):37-45.
- Wang Z, Oh E, Thurmond DC. Glucose-stimulated Cdc42 signaling is essential for the second phase of insulin secretion. *J Biol Chem*. 30 mars 2007;282(13):9536-46.
- Wang Z, Thurmond DC. Mechanisms of biphasic insulin-granule exocytosis – roles of the cytoskeleton, small GTPases and SNARE proteins. *J Cell Sci*. 4 janv 2009;122(7):893-903.
- Wang Z, Zhu T, Rehman KK, Bertera S, Zhang J, Chen C, et al. Widespread and stable pancreatic gene transfer by adeno-associated virus vectors via different routes. *Diabetes*. avr 2006c;55(4):875-84.
- Watanabe M, Horai Y, Houten SM, Morimoto K, Sugizaki T, Arita E, 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*. 29 juill 2011;286(30):26913-20.
- Watanabe M, Houten SM, Matakaki C, Christoffolete MA, Kim BW, Sato H, et al. Bile acids induce energy expenditure by promoting intracellular thyroid hormone activation. *Nature*. 26 janv 2006;439(7075):484-9.
- Watanabe M, Houten SM, Wang L, Moschetta A, Mangelsdorf DJ, Heyman RA, et al. Bile acids lower triglyceride levels via a pathway involving FXR, SHP, and SREBP-1c. *J Clin Invest*. mai 2004;113(10):1408-18.
- Welker S, Götz C, Servas C, Laschke MW, Menger MD, Montenarh M. Glucose regulates protein kinase CK2 in pancreatic β -cells and its interaction with PDX-1. *Int J Biochem Cell Biol*. déc 2013;45(12):2786-95.

- Welsh M, Nielsen DA, MacKrell AJ, Steiner DF. Control of insulin gene expression in pancreatic beta-cells and in an insulin-producing cell line, RIN-5F cells. II. Regulation of insulin mRNA stability. *J Biol Chem.* 5 nov 1985;260(25):13590-4.
- Werling M, Vincent RP, Cross GF, Marschall H-U, Fändriks L, Lönroth H, et al. Enhanced fasting and post-prandial plasma bile acid responses after Roux-en-Y gastric bypass surgery. *Scand J Gastroenterol.* nov 2013;48(11):1257-64.
- Wewalka M, Patti M-E, Barbato C, Houten SM, Goldfine AB. Fasting serum taurine-conjugated bile acids are elevated in type 2 diabetes and do not change with intensification of insulin. *J Clin Endocrinol Metab.* avr 2014;99(4):1442-51.
- Whalley NM, Pritchard LE, Smith DM, White A. Processing of proglucagon to GLP-1 in pancreatic α -cells: is this a paracrine mechanism enabling GLP-1 to act on β -cells? *J Endocrinol.* oct 2011;211(1):99-106.
- Wickremesekera K, Miller G, Naotunne TD, Knowles G, Stubbs RS. Loss of insulin resistance after Roux-en-Y gastric bypass surgery: a time course study. *Obes Surg.* avr 2005;15(4):474-81.
- Wicksteed B, Brissova M, Yan W, Opland DM, Plank JL, Reinert RB, et al. Conditional gene targeting in mouse pancreatic β -Cells: analysis of ectopic Cre transgene expression in the brain. *Diabetes.* déc 2010;59(12):3090-8.
- Wicksteed B, Herbert TP, Alarcon C, Lingohr MK, Moss LG, Rhodes CJ. Cooperativity between the preproinsulin mRNA untranslated regions is necessary for glucose-stimulated translation. *J Biol Chem.* 22 juin 2001;276(25):22553-8.
- Winslow T, image: Normal Pancreas Anatomy, National Cancer Institute, 2009, <https://visualsonline.cancer.gov/>
- Wu H, MacFarlane WM, Tadayyon M, Arch JR, James RF, Docherty K. Insulin stimulates pancreatic-duodenal homoeobox factor-1 (PDX1) DNA-binding activity and insulin promoter activity in pancreatic beta cells. *Biochem J.* 15 déc 1999;344 Pt 3:813-8.
- Wu J, Xia C, Meier J, Li S, Hu X, Lala DS. The hypolipidemic natural product guggulsterone acts as an antagonist of the bile acid receptor. *Mol Endocrinol Baltim Md.* juill 2002;16(7):1590-7.
- Wu Q, Xiao Z, Cheng Z, Tian H. Changes of blood glucose and gastrointestinal hormones 4 months after Roux-en-Y gastric bypass surgery in Chinese obese type 2 diabetes patients with lower body mass index. *J Diabetes Investig.* 18 mars 2013a;4(2):214-21.
- Wu Y, Aquino CJ, Cowan DJ, Anderson DL, Ambroso JL, Bishop MJ, et al. Discovery of a highly potent, nonabsorbable apical sodium-dependent bile acid transporter inhibitor (GSK2330672) for treatment of type 2 diabetes. *J Med Chem.* 27 juin 2013b;56(12):5094-114.

- Wu Y, Liu C, Sun H, Vijayakumar A, Giglou PR, Qiao R, et al. Growth hormone receptor regulates β cell hyperplasia and glucose-stimulated insulin secretion in obese mice. *J Clin Invest.* juin 2011;121(6):2422-6.
- Xi Q, He W, Zhang XH-F, Le H-V, Massagué J. Genome-wide impact of the BRG1 SWI/SNF chromatin remodeler on the transforming growth factor beta transcriptional program. *J Biol Chem.* 11 janv 2008;283(2):1146-55.
- Yamagata K, Daitoku H, Shimamoto Y, Matsuzaki H, Hirota K, Ishida J, et al. Bile acids regulate gluconeogenic gene expression via small heterodimer partner-mediated repression of hepatocyte nuclear factor 4 and Foxo1. *J Biol Chem.* 28 mai 2004;279(22):23158-65.
- Yang X. A wheel of time: the circadian clock, nuclear receptors, and physiology. *Genes Dev.* 15 avr 2010;24(8):741-7.
- Yang X, Downes M, Yu RT, Bookout AL, He W, Straume M, et al. Nuclear receptor expression links the circadian clock to metabolism. *Cell.* 25 août 2006;126(4):801-10.
- Yang XY, Wang LH, Chen T, Hodge DR, Resau JH, DaSilva L, et al. Activation of human T lymphocytes is inhibited by peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) agonists. PPARgamma co-association with transcription factor NFAT. *J Biol Chem.* 18 févr 2000;275(7):4541-4.
- Yi Z, Yokota H, Torii S, Aoki T, Hosaka M, Zhao S, et al. The Rab27a/granuphilin complex regulates the exocytosis of insulin-containing dense-core granules. *Mol Cell Biol.* mars 2002;22(6):1858-67.
- Zhang M, Chiang JY. Transcriptional regulation of the human sterol 12alpha-hydroxylase gene (CYP8B1): roles of hepatocyte nuclear factor 4alpha in mediating bile acid repression. *J Biol Chem.* 9 nov 2001;276(45):41690-9.
- Zhang Y-KJ, Guo GL, Klaassen CD. Diurnal variations of mouse plasma and hepatic bile acid concentrations as well as expression of biosynthetic enzymes and transporters. *PloS One.* 2011;6(2):e16683.
- Zhang Y, Klaassen CD. Effects of feeding bile acids and a bile acid sequestrant on hepatic bile acid composition in mice. *J Lipid Res.* nov 2010;51(11):3230-42.
- Zhang Y, Lee FY, Barrera G, Lee H, Vales C, Gonzalez FJ, et al. Activation of the nuclear receptor FXR improves hyperglycemia and hyperlipidemia in diabetic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 24 janv 2006;103(4):1006-11.
- Zhang Y, Yin L, Anderson J, Ma H, Gonzalez FJ, Willson TM, et al. Identification of novel pathways that control farnesoid X receptor-mediated hypocholesterolemia. *J Biol Chem.* 29 janv 2010;285(5):3035-43.
- Zanquetta MM, Corrêa-Giannella ML, Monteiro MB, Villares SM. Body weight, metabolism and clock genes. *Diabetol Metab Syndr.* 2010;2:53.

- Zhao A, Yu J, Lew J-L, Huang L, Wright SD, Cui J. Polyunsaturated fatty acids are FXR ligands and differentially regulate expression of FXR targets. *DNA Cell Biol.* août 2004;23(8):519-26.
- Zhao Y, Zhang Y, Zhou M, Wang S, Hua Z, Zhang J. Loss of mPer2 increases plasma insulin levels by enhanced glucose-stimulated insulin secretion and impaired insulin clearance in mice. *FEBS Lett.* 7 mai 2012;586(9):1306-11.
- Zollner G, Wagner M, Fickert P, Geier A, Fuchsbichler A, Silbert D, et al. Role of nuclear receptors and hepatocyte-enriched transcription factors for Ntcp repression in biliary obstruction in mouse liver. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* nov 2005;289(5):G798-805.