



HAL
open science

Effets protecteurs de la néoglucogénèse intestinale dans le développement de l'obésité et de ses complications

Justine Vily-Petit

► **To cite this version:**

Justine Vily-Petit. Effets protecteurs de la néoglucogénèse intestinale dans le développement de l'obésité et de ses complications. Alimentation et Nutrition. Université de Lyon, 2020. Français. NNT : 2020LYSE1076 . tel-03361020

HAL Id: tel-03361020

<https://theses.hal.science/tel-03361020v1>

Submitted on 1 Oct 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.



N°d'ordre NNT : 2020LYSE1076

THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON

opérée au sein de
l'Université Claude Bernard Lyon 1

Ecole Doctorale N° ED340
(Biologie Moléculaire Intégrative et cellulaire)

Spécialité de doctorat : Biologie, médecine et santé
Discipline : Physiologie

Soutenue publiquement le 26/05/2020 par :

Justine Vily-Petit

Effets protecteurs de la néoglucogenèse intestinale dans le développement de l'obésité et de ses complications

Devant le jury composé de :

Voituron Yann,	PhD/PU	CNRS/UMR5023	Président
Cruciani-Guglielmacci Céline,	PhD/PU	CNRS/UMR 8251	Rapporteure
Postic Catherine,	PhD/DR	INSERM/UMR8104	Rapporteure
Fafournoux Pierre,	PhD/DR	INRA/ UMR1019	Examineur
Soty Maud	PhD	INSERM/UMR1213	Examinatrice
Mithieux Gilles	PhD/DRCE	INSERM/UMR1213	Directeur de thèse
Billaud Marc	PhD/DR	CNRS/UMR5286	Invité



N°d'ordre NNT : 2020LYSE1076

THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON

opérée au sein de
l'Université Claude Bernard Lyon 1

Ecole Doctorale N° ED340
(Biologie Moléculaire Intégrative et cellulaire)

Spécialité de doctorat : Biologie, médecine et santé
Discipline : Physiologie

Soutenue publiquement le 26/05/2020 par :

Justine Vily-Petit

Effets protecteurs de la néoglucogenèse intestinale dans le développement de l'obésité et de ses complications

Devant le jury composé de :

Voituron Yann,	PhD/PU	CNRS/UMR5023	Président
Cruciani-Guglielmacci Céline,	PhD/PU	CNRS/UMR 8251	Rapporteure
Postic Catherine,	PhD/DR	INSERM/UMR8104	Rapporteure
Fafournoux Pierre,	PhD/DR	INRA/ UMR1019	Examineur
Soty Maud	PhD	INSERM/UMR1213	Examinatrice
Mithieux Gilles	PhD/DRCE	INSERM/UMR1213	Directeur de thèse
Billaud Marc	PhD/DR	CNRS/UMR5286	Invité

Université Claude Bernard – LYON 1

Président de l'Université	M. Frédéric FLEURY
Président du Conseil Académique	M. Hamda BEN HADID
Vice-Président du Conseil d'Administration	M. Didier REVEL
Vice-Président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire	M. Philippe CHEVALLIER
Vice-Président de la Commission de Recherche	M. Jean-François MORNEX
Directeur Général des Services	M. Damien VERHAEGHE

COMPOSANTES SANTE

Faculté de Médecine Lyon-Est – Claude Bernard	Doyen : M. Gilles RODE
Faculté de Médecine et Maïeutique Lyon Sud Charles. Mérieux	Doyenne : Mme Carole BURILLON
UFR d'Odontologie	Doyenne : Mme Dominique SEUX
Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques	Directrice : Mme Christine VINCIGUERRA
Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation	Directeur : M. Xavier PERROT
Département de Formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine	Directrice : Mme Anne-Marie SCHOTT

COMPOSANTES & DEPARTEMENTS DE SCIENCES & TECHNOLOGIE

UFR Biosciences	Directrice : Mme Kathrin GIESELER
Département Génie Electrique et des Procédés (GEP)	Directrice : Mme Rosaria FERRIGNO
Département Informatique	Directeur : M. Behzad SHARIAT
Département Mécanique	Directeur M. Marc BUFFAT
UFR - Faculté des Sciences	Administrateur provisoire : M. Bruno ANDRIOLETTI
UFR (STAPS)	Directeur : M. Yannick VANPOULLE
Observatoire de Lyon	Directrice : Mme Isabelle DANIEL
Ecole Polytechnique Universitaire Lyon 1	Directeur : Emmanuel PERRIN
Ecole Supérieure de Chimie, Physique, Electronique (CPE Lyon)	Directeur : Gérard PIGNAULT
Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1	Directeur : M. Christophe VITON
Institut de Science Financière et d'Assurances	Directeur : M. Nicolas LEBOISNE
ESPE	Administrateur Provisoire : M. Pierre CHAREYRON

Je souhaite remercier la **Fondation pour la Recherche Médicale**
pour avoir financé ce projet de thèse.



A mon fils,

Remerciements

La réalisation de cette thèse a été possible grâce au concours de plusieurs personnes à qui je voudrais témoigner toute ma gratitude et ma reconnaissance avec ces quelques mots.

En premier lieu, je tiens à remercier l'ensemble des membres du jury qui ont évalué mes travaux de thèse. Je les remercie également pour leur disponibilité et la compréhension dont ils ont fait preuve suite à ma volonté de reporter ma soutenance de thèse suite aux événements sanitaires exceptionnels. J'adresse une attention particulière au Dr Catherine Postic et au Pr Céline Cruciani-Guglielmacci pour le temps et à l'attention que vous avez accordés à la relecture de ce manuscrit en tant que rapporteuses. Je souhaite également remercier le Dr Pierre Fafournoux et le Dr Marc Billaud pour avoir suivi mes travaux de thèse à l'occasion de mes différents comités de suivi de thèse. Merci pour votre disponibilité, vos conseils, vos remarques et pour les discussions que nous avons pu partager. J'adresse mes sincères remerciements au Pr Yann Voituron pour avoir accepté d'être le président de mon jury de thèse.

Je remercie le Dr Damien Roussel et le Dr Ruben Nogueiras pour avoir accepté de collaborer afin de mener à bien une partie importante de mon projet de thèse. Je les remercie également pour leur disponibilité et pour l'aide qu'ils m'ont apportées.

Je souhaite remercier chaleureusement Gilles, mon directeur de thèse pour la confiance qu'il m'accorde depuis un peu plus de 4 ans. Merci de m'avoir accueillie dans ton laboratoire à l'occasion de mon stage de M1, puis de m'avoir fait confiance pour mon stage de M2 et enfin de m'avoir donné la chance de pouvoir réaliser une thèse dans ce laboratoire sous ta « codirection ». Merci pour tes précieux conseils et le temps que tu m'as accordés, notamment lors de la préparation de mes différentes communications orales (et ce n'était pas gagné d'avance ! 😊), mais aussi pour tous les autres travaux pour lesquels j'ai sollicité ton aide tout au long de ma thèse. Un grand MERCI, pour la patience, la compréhension et la flexibilité dont tu fais preuve chaque jour 😊.

Je souhaite ensuite remercier la personne sans qui rien n'aurait été pareil, merci Maud pour ton encadrement, ton aide, ta confiance et ton soutien à toutes épreuves 😊. Cela fait maintenant 4 ans que tu m'encadres, me formes et que tu prends soin de « ton poulet ». Merci pour le temps que tu m'as accordé pour : orienter mon projet, me conseiller, me corriger, me reconforter 😊. Je te remercie également pour ton honnêteté et ta franchise sur mon travail. Même s'il est vrai qu'il ne faut pas être susceptible, je trouve au contraire qu'il est très agréable et surtout constructif d'avoir des retours rapides et de pouvoir retravailler pour s'améliorer. Merci pour ta patience face à mon Alzheimer

précoce, qui a notamment mené à la création d'une magnifique œuvre d'art composée d'un portoir et de tubes Eppendorf fondus... (et surtout l'évaporation de mes échantillons 🧑🔬🔪😞). Merci pour les réponses à mes nombreuses questions et pardon pour le défilé dans ton bureau (promis je vais te fabriquer un distributeur de tickets). Plus qu'une encadrante, tu es également une véritable amie 😊(ce n'est pas pour rien que je t'ai choisie comme marraine de mon fils 😊). Je te remercie pour tous les bons moments passés ensemble au labo, en congrès, et bien d'autres ! Merci pour tous les bons repas partagés 🍷, mais aussi pour toutes les dégustations hasardeuses sur les stands de congrès (« ça ne vaut pas le coup de s'encombrer l'estomac avec ça ! » 🤢). Je te remercie pour la compréhension dont tu fais preuve chaque jour, notamment, dans le but de faciliter mon travail. Je voudrais également t'adresser un énorme MERCI pour ta participation très active dans la lecture, la correction et l'optimisation de ce manuscrit 📝. Je te remercie pour toutes les heures du jour, de la nuit, des week-ends et jours fériés que tu as accordées à la relecture et à la correction de chaque ligne de ce document, que nous aurions pu co-signer 📝. Ainsi, j'adresse toutes mes excuses et mes remerciements à Olivier, et à tes deux loulous Charlie et Ugo pour m'avoir prêté leur épouse et maman, respectivement (petit clin d'œil à ta tournure de phrase préférée, et à mon mot favori pour commencer les phrases 😊👉). Puisque j'aborde le sujet de la syntaxe orthographique, vu le nombre de virgules par phrase, il est clair que tu n'as pas corrigé les remerciements 😊. Il m'est impossible de faire une liste exhaustive des choses pour lesquelles je voudrais te remercier, alors je t'adresse mes sincères remerciements pour tout 😊 ; Et n'oublie pas « le gras c'est la vie » ! 😄👉👉

Je dois également un grand MERCI à Margaux, pour m'avoir montré de nombreuses manip mais également pour l'aide précieuse que tu m'as apportée. Merci de m'avoir appris à optimiser chaque temps mort 🕒⌚ (et ainsi pouvoir faire 2-3 manip par jour lorsque cela été encore possible). Merci d'avoir essayé de faire de moi quelqu'un d'organisé, il semblerait que tu sois partie trop tôt du labo pour que je le sois vraiment 😊. Je te remercie surtout pour ton amitié « mon petit pigeon » 🐦.

Je ne peux pas écrire des remerciements sans remercier Fabienne et Amandine pour leurs précieux conseils, mais surtout pour la gentillesse, la patience et la bienveillance dont elles font preuve chaque jour 😊. Merci pour le temps que vous avez accordé à la correction des articles et de ce manuscrit. Je vous adresse également mes sincères remerciements pour la confiance que vous m'accordez. Merci pour toutes les conversations et les bons moments passés ensemble. Merci pour toute l'aide que vous m'apportez depuis 4 ans ! On l'ouvre quand notre pâtisserie Fabienne ? 🍰🍪🍰

Je tiens également à remercier tous les autres membres de l'Unité 1213 fraîchement nommée NUDICE pour leurs conseils, discussions et l'aide apportée tout au long de ces années. Sur le papier, nous sommes tous des collègues, mais dans les faits nous sommes plutôt comme une grande famille 😊. Merci pour tout !

J'adresse un grand merci à Marine pour son importante contribution au suivi des protocoles et à la réalisation de nombreuses manip. Merci également pour ta gentillesse et ta bonne humeur. Je voudrais aussi remercier Clara, pour son enthousiasme, son aide et sa sympathie. Ça a été un véritable plaisir de te suivre pendant tes stages et ensuite de continuer à travailler avec toi. Merci Alexane pour ta sympathie et ton implication dans le laboratoire. C'est un plaisir de répondre à tes nombreuses questions, souvent très pertinentes 😊! Je remercie aussi Carine pour sa patience et pour toute l'aide que tu m'as apportée pour la gestion des animaux au M3 (mais aussi pour bien d'autres choses ! 😊). Merci pour tous ces moments où nous avons « râlé » ensemble pour tout, et surtout pour rien 😊. Merci Adeline pour ta sympathie et pour ton implication dans la gestion « hygiène et sécurité » du laboratoire. Merci pour les réponses que tu as apportées à mes nombreuses questions. Merci à Cécile, Vincent (mais aussi Clara et Marine) pour le soin apporté aux souris 🐭🐭. Je remercie Vincent pour toutes les discussions partagées les midis, et je te souhaite plein de bonnes choses pour la suite 🙌. Cécile, même si cela fait peu de temps que tu es arrivée (et mon enfermement dans la bibliothèque n'a pas aidé), je voudrais te remercier pour ta gentillesse et ton enthousiasme dans ton travail. Je remercie également Marie-Ange et Anne pour leur implication essentielle au sein du laboratoire, mais aussi pour toutes les discussions partagées.

Enfin, je souhaite bon courage et plein de bonnes choses à tous les étudiants. Une pensée toute particulière pour Laure qui part pour Montréal prochainement. Merci pour les nombreuses discussions scientifiques et les bons moments passés ensemble. Mais n'oublions surtout pas les nombreuses fois où nous avons « râlé » ensemble 😂🙌. Je souhaite également beaucoup de courage à Judith pour la dernière ligne droite de sa thèse 🤖. Bonne chance Lorine pour le déroulement de ta thèse !

Une énorme pensée à tous les membres de la « Master 2 family » et leurs conjoints ❤️. Merci pour tous les moments passés ensemble ! Je vous souhaite plein de bonnes choses au Canada pour Arthur, Nono et Laure, et en Belgique pour Camille ! Que vos post-doc vous apportent plein de

découvertes et de publications ! De gros bisous à tous : Nono et Pierre, Arthur et Nanou, Laure et Gaël, Camille et Éric ! Nous viendrons vous voir ✂️🍷🍷 !

Bien évidemment ma plus grande gratitude revient à ma famille, qui a toujours pris soin de moi et qui m'a constamment soutenue. Merci d'avoir toujours cru en moi, même dans mes moments de doute (et il y en a eu... ! 😊).

Tout d'abord je souhaite adresser un immense merci à mes parents pour leur soutien. Merci de m'avoir inculqué les valeurs du travail et de m'avoir rapidement appris à être autonome. Un grand merci pour vos conseils et votre aide dans les moments où j'en avais besoin. Je le sais, j'ai un (très) mauvais caractère, mais je vous remercie pour tout, et surtout pour votre soutien et j'espère continuer à vous rendre fière. J'adresse également une pensée à ma sœur et sa fille : Laura et Lucy ; ainsi qu'à ma mamie, renommée mémé Lili par Raphaël 😊. Enfin j'accorde une pensée toute particulière à mon papy, tu es parti trop tôt, mais je sais que tu aurais été fière de moi 😊.

Je remercie mes beaux-parents Valérie et Bruno pour avoir supporté mon stress et parfois mon mauvais caractère 😊.

Enfin je souhaite remercier ma petite famille, Romain et Raphaël, pour tout le soutien et l'amour qu'ils me témoignent au quotidien ❤️. Merci pour toute l'aide que vous m'avez apportée pendant ma thèse. Merci à Romain de m'avoir écouté répéter mes présentations de congrès ; mais je crois que la « néoglucogenèse intestinale » est toujours une fonction floue pour toi 🤔. Merci à vous deux de m'avoir accompagnée, et parfois, aidé à prendre soin des souris le week-end. Un énorme merci à mon *bibou*, car du haut de tes « deux ans et rémi » tu sais comment me redonner le sourire et me faire oublier mon stress et mes angoisses. Merci pour ta patience et ta compréhension lors des nombreux week-ends passés à rédiger ce manuscrit ; je me demande toujours comment j'ai réussi à ne pas y écrire « *la pat' patrouille part en mission* »... L'écriture de ce manuscrit a été un moment difficile pour vous deux, et je vous remercie pour votre aide et de votre implication. Merci à toi, Raphaël, pour avoir prononcé cette phrase après seulement 2 semaines de rédaction « *C'est bon maman, j'ai tout fini d'écrire ta thèse ! Maintenant tu peux jouer avec moi !* » ; ou encore « *Maman, je t'aime* » toutes les deux minutes pour attirer mon attention. Merci à toi, Romain pour avoir relu chaque ligne de ce manuscrit et pour l'avoir comparé à « *un livre historique écrit en allemand* » tellement que c'était du « *charabia* » pour toi. Pour finir je voudrais vous remercier pour toutes les petites et grandes attentions que vous avez pour moi chaque jour ; j'ai beaucoup de chance de vous avoir ❤️.

TABLE DES MATIÈRES

RESUMES	1 -
LISTE DES ABREVIATIONS	7 -
DONNÉES BIBLIOGRAPHIQUES	13 -
A. Contrôle de la prise alimentaire	- 15 -
I. Contrôle central de la prise alimentaire	15 -
1. Une position idéale de communication	15 -
2. L'hypothalamus.....	15 -
a. Le noyau arqué	15 -
b. Le noyau paraventriculaire.....	20 -
c. Le noyau ventromédian.....	23 -
d. Noyau dorsomédian.....	23 -
e. L'hypothalamus latéral	25 -
3. Le tronc cérébral.....	27 -
a. Le noyau du tractus solitaire	27 -
b. Le noyau parabrachial	31 -
II. Contrôle périphérique de la prise alimentaire	35 -
1. Régulations hormonales à court terme de la prise alimentaire.....	35 -
a. La cholécystokinine.....	35 -
b. Le glucagon-like-peptide 1.....	37 -
c. Le peptide tyrosine tyrosine	39 -
d. La Ghreline	39 -
2. Régulations hormonales à long terme de la prise alimentaire	41 -
a. L'insuline	41 -
b. La leptine.....	47 -
B. Maintien de l'homéostasie énergétique.....	- 49 -
I. Maintien de l'homéostasie énergétique en période postprandiale	49 -
1. Devenir des glucides alimentaires.....	49 -
a. La synthèse de glycogène	51 -
b. La lipogenèse de novo.....	51 -
2. Devenir des lipides alimentaires.....	57 -
a. La voie exogène :	59 -

b.	La voie endogène-----	59 -
c.	La voie de retour du cholestérol-----	61 -
3.	Devenir des protéines alimentaires-----	63 -
II.	Maintien de l'homéostasie énergétique au cours du jeûne-----	65 -
1.	La production endogène de glucose-----	67 -
a.	Généralités -----	67 -
b.	La glycolyse-----	69 -
c.	La néoglucogenèse-----	69 -
d.	Régulation de la production endogène de glucose -----	71 -
2.	La lipolyse-----	77 -
a.	La lipolyse du tissu adipeux -----	77 -
b.	La β -oxydation des acides gras -----	79 -
3.	La protéolyse-----	83 -
III.	La dépense énergétique -----	87 -
1.	Les différents postes de dépense d'énergie-----	87 -
a.	Le métabolisme de base -----	87 -
b.	La thermogenèse alimentaire -----	87 -
c.	L'activité physique-----	89 -
d.	La thermorégulation -----	91 -
2.	La thermogenèse sans frisson du tissu adipeux -----	93 -
a.	Les différents types d'adipocytes -----	93 -
b.	Les mécanismes impliqués dans la production de chaleur -----	95 -
c.	Le tissu adipeux brun -----	97 -
d.	Le brunissement du tissu adipeux blanc-----	99 -
3.	La régulation de la dépense énergétique-----	101 -
a.	Régulation par le système nerveux sympathique-----	101 -
b.	Régulation par les facteurs circulants-----	103 -
C.	L'obésité, un enjeu majeur de santé publique	105 -
I.	L'Obésité et ses complications associées-----	105 -
1.	Généralités -----	105 -
2.	Insulino-résistance et diabète de type 2-----	107 -
a.	Mécanismes moléculaires de l'insulino-résistance -----	107 -
b.	Conséquences de l'insulino-résistance musculaire et hépatique -----	109 -

c.	Conséquences de l'insulino-résistance adipocytaire-----	111 -
3.	La stéatose hépatique non-alcoolique-----	111 -
a.	Développement de la stéatose hépatique-----	113 -
b.	Complications de la stéatose hépatique-----	117 -
4.	Effets délétères sur le métabolisme du tissu adipeux-----	119 -
a.	Expansion du tissu adipeux et infiltration macrophagique-----	121 -
b.	L'inflammation du tissu adipeux blanc-----	123 -
c.	La fibrose du tissu adipeux-----	127 -
d.	Le blanchissement du tissu adipeux brun-----	127 -
5.	Les effets délétères de l'insulino-résistance sur les cellules β -pancréatiques-----	129 -
II.	Les effets bénéfiques associés à la néoglucogenèse intestinale-----	133 -
1.	Mécanismes impliqués dans les effets bénéfiques de la néoglucogenèse intestinale-----	133 -
a.	Détection et initiation du signal glucose portal-----	133 -
b.	Mécanismes centraux impliqués dans les effets bénéfiques du signal glucose portal-----	135 -
2.	Effets bénéfiques associés à l'induction de la néoglucogenèse intestinale-----	137 -
a.	Les régimes riches en protéines-----	137 -
b.	Les régimes riches en fibres-----	139 -
3.	Les effets délétères associés à l'invalidation de la néoglucogenèse intestinale-----	141 -
a.	Le modèle murin-----	141 -
b.	L'absence de néoglucogenèse intestinale favorise l'installation d'un état prédiabétique-----	141 -
	HYPOTHESES DE TRAVAIL ET DEMARCHE EXPERIMENTALE-----	145 -
	RESULTATS-----	153 -
	A. Rôle de la NGI dans le développement de l'obésité, du diabète et de la stéatose hépatique -	155 -
	B. Rôle de la néoglucogenèse intestinale sur le métabolisme du tissu adipeux -	201 -
	DISCUSSION-----	249 -
	TRAVAUX PERSONNELS-----	265 -
	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES-----	271 -
	ANNEXE-----	319 -

RESUMES

Effets protecteurs de la néoglucogenèse intestinale dans le développement de l'obésité et de ses complications

Face à l'augmentation de la prévalence de l'obésité et de ses pathologies associées, la recherche de nouvelles cibles thérapeutiques représente un enjeu majeur de santé publique. Dans ce contexte, le laboratoire a mis en évidence une nouvelle fonction, la néoglucogenèse intestinale (NGI), qui contrôle positivement l'homéostasie énergétique et glucidique via l'induction du «signal glucose portal». Le laboratoire a notamment mis en évidence que l'induction de la NGI joue un rôle clé dans les effets bénéfiques des régimes riches en fibres ou en protéines, ou encore de la chirurgie de l'obésité de type bypass. Parmi les bénéfices métaboliques dépendants de la NGI on retrouve : la satiété, la diminution du poids et de la masse grasse, l'amélioration du contrôle glycémique et de la sensibilité à l'insuline, notamment au niveau du foie.

Dans la continuité des travaux du laboratoire, le but de cette thèse est de mettre en évidence le rôle de la NGI, en tant que telle, sans manipulations nutritionnelles pour l'induire, dans la protection contre l'obésité et ses complications, dont le diabète et la stéatose hépatique. Plus précisément, un intérêt tout particulier a été porté à l'étude du métabolisme du foie et du tissu adipeux, qui sont profondément altérés au cours de l'obésité. Cette étude repose sur la comparaison entre deux modèles murins d'inactivation (souris I.G6pc^{-/-}) et de surexpression (souris I.G6pc^{overexp}) de la glucose-6-phosphatase, l'enzyme clé de la néoglucogenèse, spécifiquement dans l'intestin.

En accord avec notre hypothèse, l'induction de la NGI protège les souris du développement de l'obésité, de la stéatose hépatique et retarde l'apparition des dérégulations du métabolisme glucidique induits par un contexte nutritionnel délétère tel que le régime HF-HS (high-fat/high-sucrose). Ces effets sont associés à une stimulation de la dépense énergétique, probablement consécutive à l'augmentation de l'activité locomotrice et de la thermogenèse du tissu adipeux, sans modification de la prise alimentaire. En miroir de ces données, l'absence de la NGI (en régime standard) augmente l'adiposité et favorise l'installation de désordres métaboliques dans le foie et le tissu adipeux. Plus précisément, l'absence de NGI entraîne une augmentation du contenu en lipides du foie et une diminution de l'expression des marqueurs de thermogenèse du tissu adipeux.

Cette étude confirme que la NGI est une fonction métabolique clé dans le maintien de la balance énergétique, et peut ainsi être envisagée comme une cible thérapeutique dans la prévention de l'obésité et de ses complications.

Mots clés : Néoglucogenèse intestinale, obésité, communication intestin-cerveau, balance énergétique, foie, tissu adipeux, stéatose hépatique.

Intestinal gluconeogenesis prevents obesity development and associated complications

In view of the increasing prevalence of obesity and its associated pathologies, the research on new therapeutic targets represents a major public health challenge. In this context, the laboratory has highlighted a new function, intestinal gluconeogenesis (IGN), which positively controls energy and carbohydrate homeostasis *via* the induction of the «portal glucose signal». In particular, the laboratory has shown that the induction of IGN plays a key role in the beneficial effects induced by fiber- or protein-enriched diets, or bypass surgery. IGN-dependent metabolic benefits include: satiety, body weight and fat mass reduction, improvement glycaemic control and insulin sensitivity, particularly in the liver.

In line with the laboratory's work, the aim of this thesis consists in highlighting the role of IGN, *per se*, without nutritional manipulations, in the protection against obesity and its associated complications, including diabetes and hepatic steatosis. Specifically, a particular interest has been given to the study of the liver and adipose tissue metabolism, which are profoundly altered during obesity. This study is based on the comparison between two mouse models of invalidation (I.G6pc^{-/-} mice) and overexpression (I.G6pc^{overexp} mice) of the glucose-6-phosphatase, the key enzyme for gluconeogenesis, specifically in the intestine.

In agreement with our hypothesis, IGN induction protects mice from the development of obesity and hepatic steatosis and delays the onset of glucose metabolism deregulation induced by a deleterious nutritional context such as a HF-HS diet (high-fat/high-sucrose). These effects are associated with a stimulation of energy expenditure, probably as a result of an increase in locomotor activity and thermogenesis in the adipose tissue, without changes in food intake. On the contrary, the absence of IGN (in a standard diet) increases adiposity and promotes metabolic disorders in the liver and adipose tissue. More specifically, the absence of IGN leads to an increase in liver lipid content and a decrease in the expression of thermogenesis markers in the adipose tissue.

This study confirms that IGN has a key role in the maintenance of energy balance and could therefore be considered a therapeutic target in the prevention of obesity and its complications.

Key words : Intestinal gluconeogenesis, obesity, gut-brain communication, energy balance, liver, adipose tissue, hepatic steatosis.

LISTE DES ABREVIATIONS

ABCA1 : ATP-binding cassette
ABCG5/G8 : ATP Binding Cassette
 Subfamily G Member 5/8
ACC : Acétyl-CoA Carboxylase
Acox1 : Peroxisomal acyl-coenzyme A
 oxidase 1
AgRP : Agouti related peptide
AMPc : Adénosine monophosphate cyclique
AMPK : AMP-activated protein kinase
ARF-1 : ADP ribosylation factor 1
ATF2 : Activating transcription factor 2
ATGL : Adipose triglycerids lipase
BDNF : Brain-derived neurotrophic factor
BMP : Bone morphogenetic protein
Bnip3 : BCL2/adenovirus E1B 19 kDa
 protein-interacting protein 3
C/EBP : CAAT/enhancer binding protein
CART : Cocaïne and amphetamine related
 transcript
CCK : Cholécystokinine
CD36 : Cluster of differentiation 36
CETP : Cholesteryl ester transfer protein
CGI-58 : Comparative Gene Identification-58
CGRP : Calcitonin gene-related peptide
ChoRE : Carbohydrate response element
ChREBP : Carbohydrate response element
 binding protein
COX II / IV : Cytochrome c oxidase II/IV
CPT1 : Carnitine palmitoyl transférase 1
CREB : Cyclic adenosine monophosphate
 responsive element binding protein
CRH : Corticotropin-releasing hormone
CVD : Complexe vagal dorsal
DAG : Diacylglycérol
DGAT : Diacylglycerol acyltransferase
DMN : Noyau dorsomédian
DMV : Noyau moteur dorsal du nerf vague
DT2 : Diabète de type 2
Elovl : Elongation of very long chain fatty acid
FABP : fatty acid binding protein
FADH2 : Flavine adénine dinucléotide
FAS : Fatty acid synthase
FATP : Fatty acid transfert protein
FFAR3 : Free fatty acid receptor 3
FGF21 : Fibroblast growth factor 21
FND5 :Fibronectin typeIII domain containing5
Fox : Forkhead box protein
G6P : glucose-6-phosphate
G6Pase : Glucose-6-phosphatase
G6PC : sous unité catalytique de la glucose-6-
 phosphatase
G6PT : sous-unité transportrice de la glucose-
 6-phosphatase
GABA : Acide γ -aminobutyrique
GHS-R1a : Growth hormon secretagogue
 receptor 1a
GLP-1 : Glucagon-like peptide-1
GLUT2/4 : Transporteur de glucose 2 / 4
GPAT : Glycérol-3-phosphate acyltransferase
Grb-2:Growth factor receptor-bound protein 2
GSK3 : Glycogen synthase kinase 3
HDL : High density lipoprotein
HIF-1 : Hypoxia-Inducible Factor-1
HNF : Hepatic nuclear factor
HPA: Hypothalamic pituitary adrenal axis
HPT : Hypothalamus-pituitary-thyroid
HSL : Hormone sensitive lipase
ICV : Intra-cerebro-ventriculaire
IDL : Intermediate density lipoprotein
IGF-1: Insulin-like growth factor-1
IL : Interleukine
IMC : indice de masse corporelle
Insig-2a : Insulin induced gene 2
IRE : Insulin responsive element
IRS- 1 / 2 : Insulin receptor substrate
JNK : Jun N-terminal kinase
LC3 : Microtubule-associated proteins 1A/1B
 light chain 3B
LCAT : Lecithin cholesterol acyl transferase
LDL : Low density lipoprotein
LH : Hypothalamus latéral
L-PK : Liver pyruvate kinase
LPL: Lipoprotéine lipase
LRP : LDL receptor-related protein
LXR α : Liver x receptor
MAPK : Mitogen-activated protein kinases
MCH : Melanin concentrating hormone
MCP1 : Monocyte chemoattractant protein-1
MG : Monoacyglycérol
MGL : Monoglyceride lipase
Mlx : Max like protein x
MMP2 : Matrix metalloproteinases 2
MSH : Melanocyte stimulating hormone
mTORC1 : Mammalian target of rapamycin
 complex 1

MTP : Microsomal triacylglycerol transfer protein
Myf5 : Myogenic factor 5
NAFLD : Nonalcoholic fatty liver disease
NASH : Nonalcoholic steatohepatitis
NF- κ B : Nuclear factor-kappa B
NGI : Néoglucogenèse intestinale
NPC1L1 : Niemann-Pick C1-like 1 protein
NPY : Neuropeptide Y
NTS : Noyau du tractus solitaire
p70S6K : Ribosomal protein S6 kinase β -1
PAI-1 : Plasminogen activator inhibitor-1
PBN : Noyau parabrachial
PEG : Production endogène de glucose
PEPCK : Phosphoénolpyruvate carboxykinase
PGC1 : Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1
PHG : production hépatique de glucose
PI3K : Phosphoinositide 3-kinase
PIP2 : Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate
PIP3 : Phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate
PKA : Protéine kinase A
PKB/Akt : Protéine kinase B
PLTP : phospholipid transfert protein
POMC : Proopiomelanocortine
PPAR : Peroxisome proliferator-activated receptors
PRDM16 : PR domain containing 16
PRE : PPAR-responsive éléments
PTP1B : Protein-tyrosine phosphatase 1B
PVN : Noyau paraventriculaire
PYY : Peptide tyrosine tyrosine
RE : Réticulum endoplasmique
RIP140 : receptor interacting protein of 140kDa
ROS : Reactive oxygen species
RXR : Retinoid X receptor
SCAP : SREBP cleavage-activating protein
SCD1 : Stearoyl-CoA desaturase
SERCA : Sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase
SF-1 : Steroidogenic factor-1
SNP : Système nerveux parasympathique
SNS : Système nerveux sympathique
SR-B1 : Scavenger receptor B1
SRC : Steroid receptor coactivator
SREBP-1c : Sterol regulatory element binding protein

TAE : Tissu adipeux blanc épидидymaire
T3/T4 : Triiodothyronine / Thyroxine
TAB : Tissu adipeux brun
TGF β : Transforming growth factor
TNF α : Tumor necrosis factor alpha
TRH : Thyrotropin-releasing hormone
TSH : Thyroid stimulating hormone
UCP1 : Uncoupling protein 1
VEGF : Vascular endothelial growth factor
VIP : vasoactive intestinal peptide
VLDL : Very low density lipoprotein
VMN : Noyau ventromédian

DONNÉES BIBLIOGRAPHIQUES

A. Contrôle de la prise alimentaire

Le contrôle de la prise alimentaire résulte d'un ensemble complexe de mécanismes impliquant à la fois des signaux centraux et périphériques. Cela nécessite une étroite communication entre les régions centrales (dont l'hypothalamus et le tronc cérébral) et périphériques. Parmi les signaux périphériques impliqués dans la régulation de la prise alimentaire, on retrouve les hormones intestinales et pancréatiques ou encore les adipokines.

I. Contrôle central de la prise alimentaire

1. Une position idéale de communication

Les centres nerveux impliqués dans la régulation de la prise alimentaire sont principalement localisés dans l'hypothalamus et le tronc cérébral, qui de ce fait représentent les sites majeurs d'intégration des signaux périphériques et centraux permettant de garantir le maintien de l'homéostasie énergétique de l'organisme. Leur localisation à proximité des organes circumventriculaires et des ventricules cérébraux permet à l'hypothalamus (éminence médiane et troisième ventricule) et au tronc cérébral (*area postrema* et quatrième ventricule) de recevoir des informations hormonales ou nutritionnelles provenant de la périphérie (**Figure 1**). A ces endroits, l'absence de barrière hémato-encéphalique et l'accès facilité au liquide céphalorachidien permettent la détection de nombreuses hormones (dont l'insuline, la leptine ou encore la ghréline) et des nutriments circulants afin d'initier une réponse nerveuse adaptée pour la régulation de la prise alimentaire et du métabolisme énergétique (1,2).

L'hypothalamus et le tronc cérébral communiquent entre eux, mais aussi avec d'autres régions cérébrales et indirectement avec la périphérie. Le tronc cérébral est une région de convergence des afférences nerveuses périphériques, mais aussi des afférences centrales.

2. L'hypothalamus

L'hypothalamus est une région cérébrale clé dans la régulation de l'homéostasie énergétique capable d'initier une réponse biologique adaptée grâce à ses capacités à intégrer les signaux nerveux, hormonaux et métaboliques provenant de la périphérie et d'autres régions cérébrales (dont le noyau du tractus solitaire (NTS) par exemple).

a. Le noyau arqué

Le noyau arqué, de par sa localisation entre la base du 3^{ème} ventricule et l'éminence médiane, exerce une fonction clé dans l'intégration des signaux hormonaux et nutritionnels

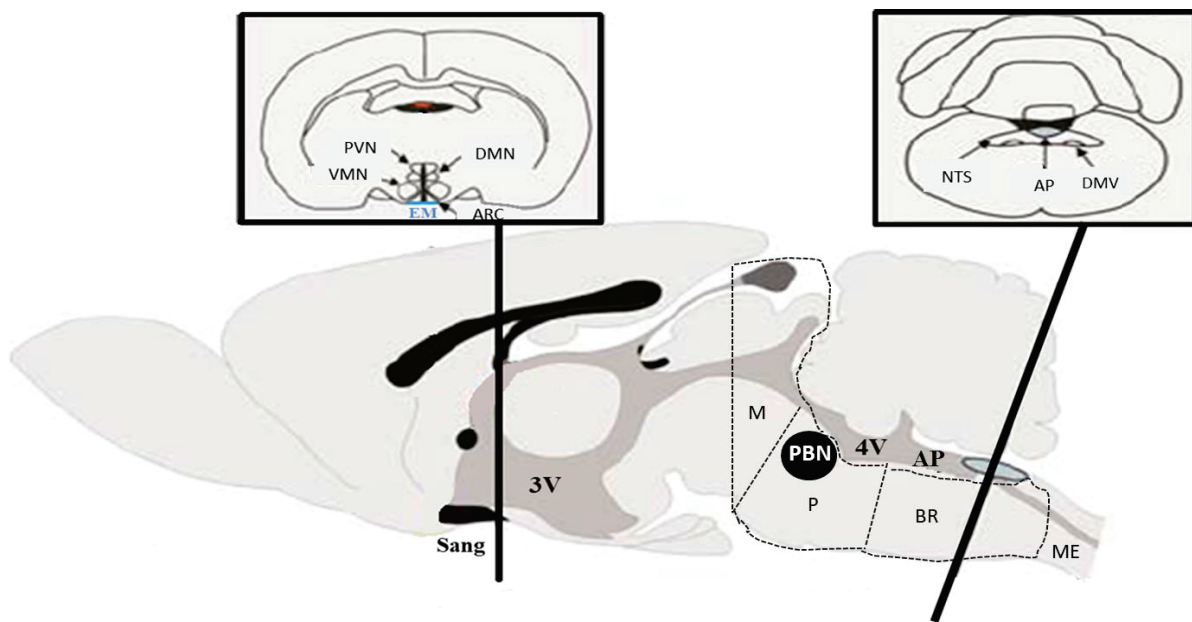


Figure 1 : Représentation schématique des régions circumventriculaires de l'hypothalamus et du tronc cérébral chez le rat.

Schéma d'une coupe sagittale de cerveau de rat et de coupes coronales au niveau de l'hypothalamus et du tronc cérébral.

Abréviations: AP (area postrema), ARC (noyau arqué), BR (bulbe rachidien), DMN (noyau dorsomédian), DMV (noyau dorsal moteur du nerf vague), EM (éminence médiane), M (mésencéphale), ME (moelle épinière), NTS (noyau du tractus solitaire), P (pont), PBN (noyau parabrachial), PVN (noyau paraventriculaire), 3V et 4V (3ème et 4^{ème} ventricule), VMN (noyau ventromédian).

Adapté de Fry et al., 2007.

provenant de la périphérie. En effet, les neurones du noyau arqué expriment un certain nombre de récepteurs aux hormones et des systèmes de détection aux nutriments à leur surface, leur permettant d'initier des réponses orexigènes et anorexigènes afin de garantir le maintien de l'homéostasie énergétique (3–5). De plus, l'activité des neurones du noyau arqué peut-être également contrôlée par des afférences nerveuses provenant d'autres régions cérébrales, parmi lesquelles on peut noter les autres noyaux hypothalamiques ou encore le NTS.

Le noyau arqué est composé de plusieurs populations de neurones impliqués dans le contrôle de la prise alimentaire et du métabolisme, dont les neurones NPY/AgRP et POMC/CART qui sont classiquement nommés neurones de « premier ordre » (**Figure 2 et 3**) (6–8). Les neurones exprimant le précurseur POMC (proopiomelanocortine) et le CART (Cocaïne and amphetamine related transcript) sont impliqués dans les circuits anorexigènes alors que les neurones sécrétant le NPY (Neuropeptide Y) et l'AgRP (Agouti related peptide) sont associés aux réponses orexigènes (6,9,10). Les projections de ces neurones vers les neurones dits de « second ordre » localisés dans les noyaux dorsomédian (DMN), ventromédian (VMN), paraventriculaire (PVN), et latéraux (LH) ou encore dans le noyau arqué lui-même, permettent une régulation fine de la prise alimentaire et du métabolisme énergétique (**Figures 2 et 3**) (11,12). Par ailleurs, l'activité des neurones de ces noyaux hypothalamiques est également régulée par des facteurs circulant tels que le glucose, les hormones ou encore les acides gras (13–15).

Le système mélanocortinergique est un acteur clé dans la régulation hypothalamique de la prise alimentaire. Ce système implique la liaison de la MSH (melanocyte stimulating hormones) qui est un produit de clivage du précurseur POMC, aux récepteurs mélanocortinergiques (MC3R et MC4R) mais aussi l'action antagoniste du neuropeptide AgRP (**Figure 3**). Les récepteurs MC3/4R sont couplés aux protéines G et sont largement exprimés dans l'hypothalamus et d'autres aires cérébrales (dont le NTS) (4,5). La fixation sur ces récepteurs implique l'activation de différentes voies de signalisation intracellulaire, mettant en jeu l'AMPc (adénosine monophosphate cyclique), l'inositol triphosphate ou les MAPK (Mitogen-activated protein kinases) (16,17). L'AgRP exerce une partie de ses effets orexigènes en induisant l'endocytose des récepteurs MC3/4R au niveau des neurones de « second ordre » (**Figure 3**) (18,19). Dans le noyau arqué, les neurones antagonistes POMC et AgRP expriment les récepteurs MC3R, ce qui leur confèrent la capacité de contrôler leur activité respective (20–22).

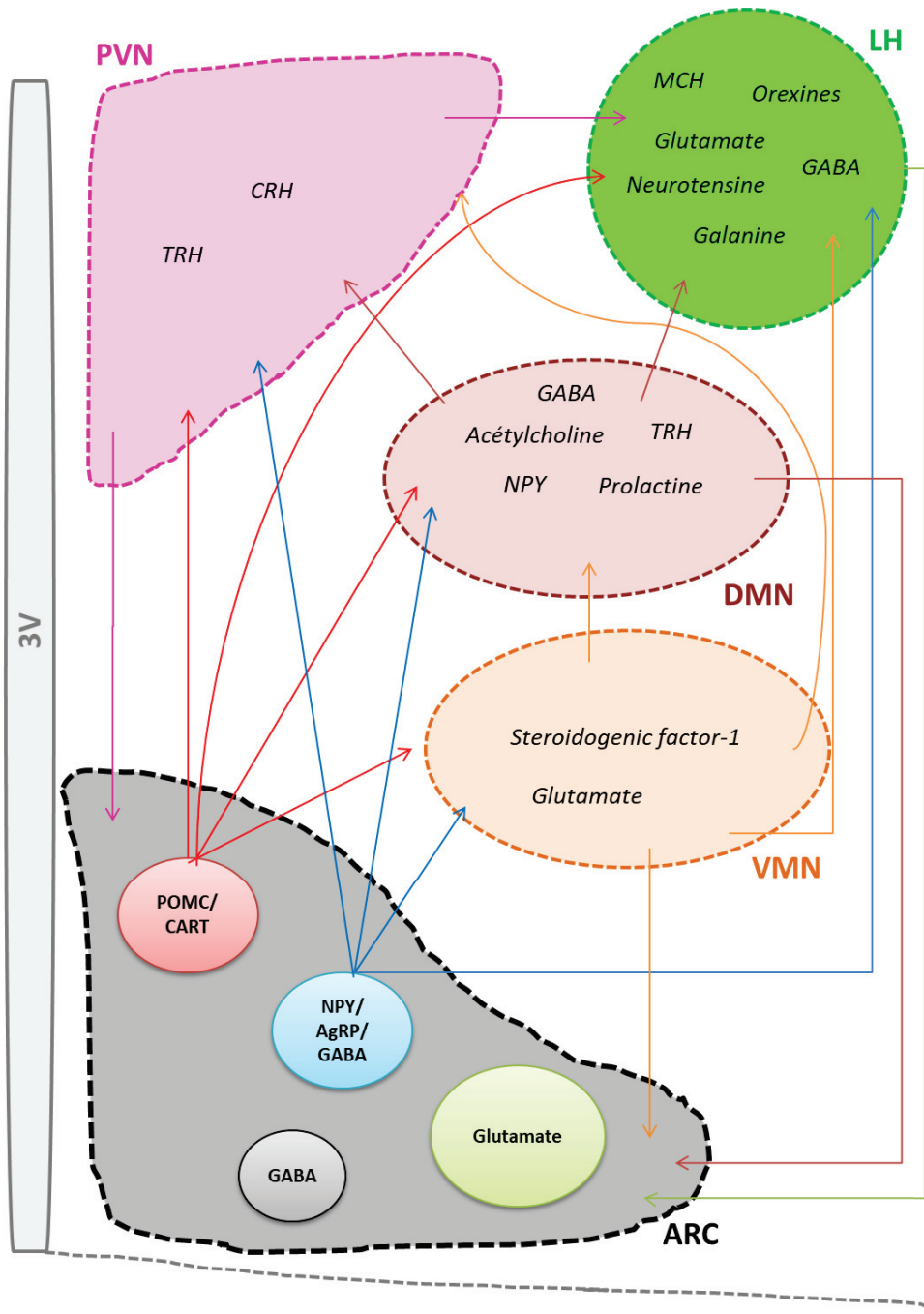


Figure 2 : Représentation schématique des principales interactions entre les noyaux hypothalamiques impliqués dans la régulation de la prise alimentaire .

Le contrôle de la prise alimentaire fait intervenir des neurones de « premier ordre » situés dans le noyau arqué (ARC) et des neurones de « second ordre » situés dans les autres noyaux hypothalamiques tels que le noyau paraventriculaire (PVN), dorsomédian (DMN), vendromédian (VMN) et l'hypothalamus latéral (LH). Les communications entre ces noyaux mettent en jeu le système mélanocortinergique (POMC/MSH, AgRP et les récepteurs MC3/4R) et d'autres neuropeptides (NPY, MCH, Orexines, CART, CRH, TRH).

Abréviations: AgRP (Agouti-related protein), CART (Cocaine and amphetamine regulated transcript), CRH (corticotropin-releasing hormone), GABA (acide γ -aminobutyrique), MCH (melanin concentrating hormone), MSH (Melanocyte stimulating hormone), NPY (Neuropeptide Y), POMC (pro-opiomélanocortine), TRH (thyrotropin-releasing hormone), 3V (3^e ventricule).

Néanmoins, la régulation de la prise alimentaire ne repose pas uniquement sur le système mélanocortinergique. En effet, les neurones POMC expriment également le CART (23–26). Les récepteurs et la voie de signalisation de ce neuropeptide sont encore mal connus, mais plusieurs études suggèrent que ces récepteurs seraient couplés aux protéines G (27–30). Il a été montré que l'injection de CART dans le noyau arqué chez des souris déficientes pour CART n'a pas d'effet sur la prise alimentaire, mais augmente la dépense énergétique, et notamment la thermogenèse du tissu adipeux brun (TAB) (31–33). Des études sont encore nécessaires afin de comprendre les effets des neurones CART et leurs mécanismes d'action dans la régulation de la prise alimentaire.

Le plus puissant neuropeptide orexigène, sécrété par les neurones du noyau arqué, est le NPY, dont les effets sont médiés par des projections de « second ordre » vers le PVN, le DMN, le VMN et le LH (**Figures 2 et 3**) (34,35). De plus, lorsqu'il est libéré localement dans le noyau arqué, le NPY est capable d'inhiber l'activité des neurones antagonistes qui expriment POMC (**Figure 3**) (36). La majorité des neurones NPY de l'hypothalamus sont localisés dans le noyau arqué et 95 % d'entre eux co-expriment le neurotransmetteur AgRP (20,37). Il existe 5 récepteurs au NPY (Y1 à Y5), néanmoins les effets orexigènes passent principalement par les récepteurs Y1 et Y5 (38).

Le noyau arqué est classiquement décrit comme étant principalement composé des deux catégories de neurones POMC/CART et NPY/AgRP ; néanmoins des études ont montré l'existence d'autres populations neuronales. En effet, le neurotransmetteur inhibiteur GABA (acide γ -aminobutyrique) est exprimé par les neurones NPY/AgRP et POMC/CART, mais également par une troisième population neuronale encore mal connue (36,39–41). Le GABA sécrété par les neurones POMC et NPY exerce des effets orexigènes en modulant l'activité des neurones POMC mais également en modulant l'activité neuronale d'autres noyaux situés dans l'hypothalamus (dont le PVN) ou en dehors (dont le noyau parabrachial (PBN)) (**Figure 3**) (37,42–48). D'autre part, une population de neurones glutamatergiques converge également vers le PVN et est ainsi impliquée dans le contrôle à court terme de la prise alimentaire (**Figure 3**) (49,50). Dans le noyau arqué, les neurones POMC et glutamatergiques sont deux populations neuronales distinctes, mais qui interagissent ensemble afin de diminuer rapidement la prise alimentaire (49,50). En effet, afin d'obtenir une régulation rapide de la prise alimentaire, l'activation des récepteurs MC4R par la MSH libérée par les neurones POMC (régulation à long terme de la prise alimentaire) doit être associée à la stimulation des synapses glutamatergiques (régulation à court terme de la prise alimentaire) (49,50).

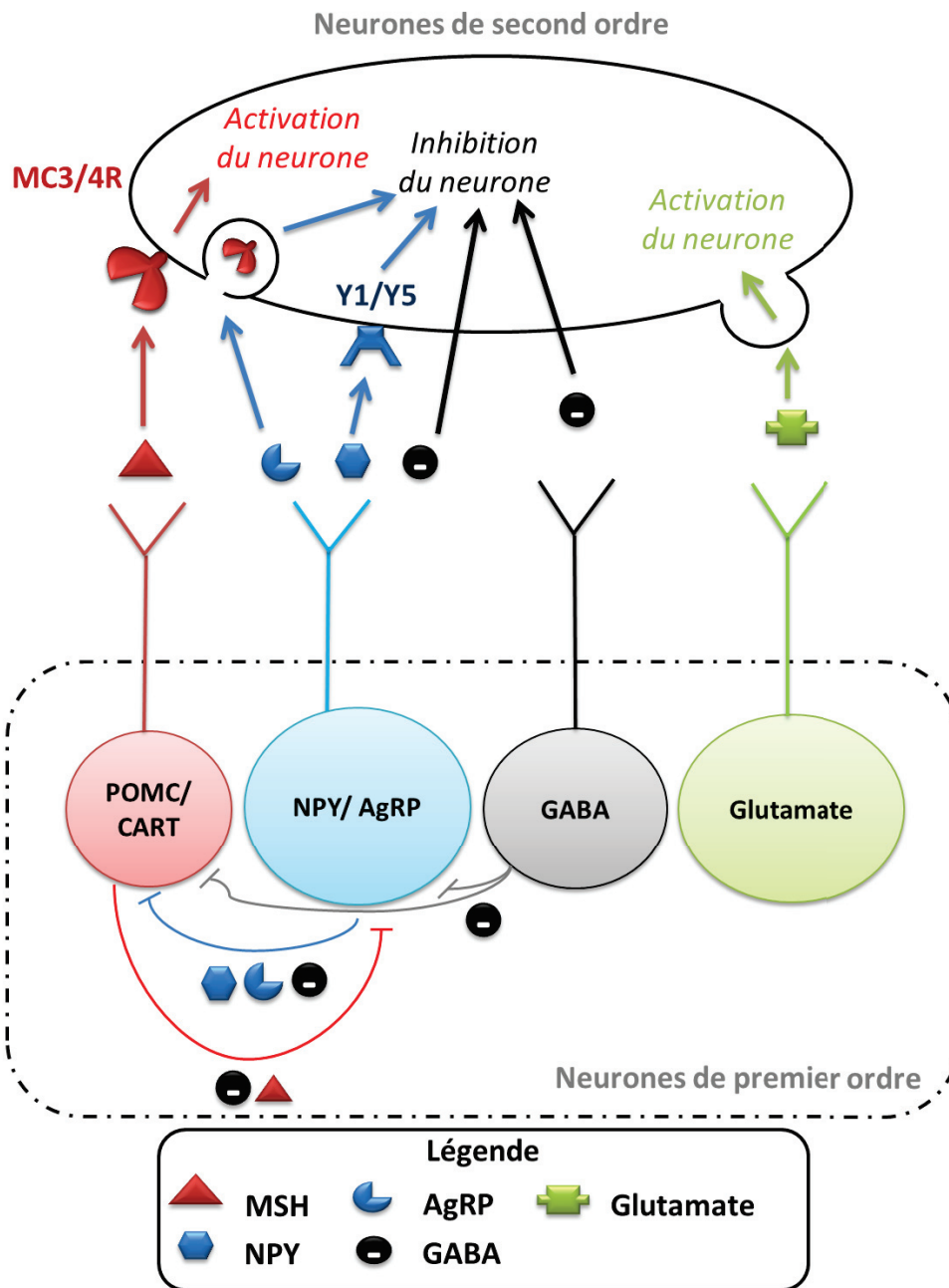


Figure 3 : Représentation schématique des projections des neurones de premier ordre du noyau arqué vers des neurones de second ordre et les principaux neurotransmetteurs impliqués

Les neurones de premier ordre du noyau arqué exercent des contrôles réciproques. Le GABA (acide γ -aminobutyrique), le NPY (neuropeptide Y) et l'AgRP (agouti-related protein) exercent un contrôle négatif sur les neurones de second ordre. Les effets inhibiteurs du GABA et du NPY passent par une hyperpolarisation du neurone ou par l'activation des récepteurs Y1/Y5, respectivement. L'AgRP inhibe l'action de la MSH (melanocyte stimulating hormone) en provoquant l'internalisation de ses récepteurs MC3/4R. La MSH et le glutamate activent le neurone de second ordre à long et court terme, respectivement.

Abréviations: CART (Cocaine and amphetamine regulated transcript), POMC (pro-opiomélanocortine).

Adapté de Andermann and Lowell, 2017.

b. Le noyau paraventriculaire

Le noyau paraventriculaire (PVN) est capable de réguler la prise alimentaire en détectant et en intégrant de nombreux signaux provenant des neurones POMC et NPY, GABA et glutamatergiques du noyau arqué et en communiquant avec le tronc cérébral et l'hypophyse (**Figure 2**) (13,46). Il est composé de neurones qui sécrètent des neurotransmetteurs anorexigènes, comme la CRH (corticotropin-releasing hormone) et la TRH (thyrotropin-releasing hormone).

Les neurones qui sécrètent le CRH interviennent à la fois dans la régulation de la prise alimentaire et de l'axe HPA (Hypothalamic pituitary adrenal axis) dont l'hyperstimulation induite par la CRH est impliquée dans les anorexies nerveuses et les troubles affectifs (51–56). En ce qui concerne la régulation de la prise alimentaire, les neurones à CRH sont à la fois capable d'inhiber l'activité des neurones NYP/AgRP et l'expression de NPY (57,58). Ainsi, la diminution de CRH au cours du jeûne permet l'activation des circuits orexigènes impliquant NPY. Bien que les effets du CRH ne dépendent pas du système mélanocortinergique, il existe une interaction directe entre ces deux systèmes. En effet, le système mélanocortinergique, via les récepteurs MC4R, est capable de réguler à la fois l'axe HPA et la production de CRH (54). Les effets du CRH sur la prise alimentaire et la dépense énergétique dépendent de sa fixation sur deux récepteurs couplés aux protéines G entraînant une augmentation de l'AMPc (CRH-R1 et CRH-R2). Plus précisément, les effets du CRH sur la régulation de l'axe HPA semblent être médiés par les récepteurs CTH-R1 alors que ceux sur la prise alimentaire impliquent principalement les récepteurs CRH-R2 (59). De plus, l'augmentation de la dépense énergétique, et notamment de la thermogenèse par la CRH est dépendante de l'augmentation du tonus sympathique (54,60).

La TRH est un acteur important à la fois dans la régulation de la prise alimentaire et de l'axe HPT (hypothalamus-pituitary-thyroid). Son administration au niveau central et périphérique entraîne une diminution de la prise alimentaire (pour revue (61)). De plus, la TRH joue un rôle important dans la régulation de la sécrétion de TSH (Thyroid stimulating hormone) par l'hypophyse (61,62). La TSH ainsi produite est capable de réguler la production et la libération de Triiodothyronine (T3) et de thyroxine (T4) par la thyroïde qui vont également intervenir dans la régulation de la prise alimentaire (61). La libération de ce neuropeptide est notamment régulée par les projections des neurones POMC et AgRP du noyau arqué sur les neurones TRH du PVN. En effet, la MSH induit la libération de la TRH, tandis que l'AgRP inhibe son expression (63,64). De plus, l'expression de la TRH dans ce noyau hypothalamique

est également régulée par les hormones produites par le tissu adipeux (dont la leptine) (65–67). Les effets de la TRH impliquent la voie de l'inositol triphosphate et sont médiés par deux types de récepteurs (TRH-R1 et TRH-R2) couplés aux protéines G et répartis spécifiquement dans le cerveau. En effet, les récepteurs TRH-R1 sont principalement retrouvés dans l'hypothalamus et le tronc cérébral, et semblent être impliqués dans les fonctions végétatives et autonomes ; tandis que les récepteurs TRH-R2 largement distribués dans le cerveau (dont le cortex et la formation réticulée) sont associés aux processus de cognition. Le contrôle de la prise alimentaire par la TRH fait intervenir des projections sur des neurones histaminergiques du noyau tuberculomammillaire (noyau hypothalamique impliqué dans le contrôle de fonctions cognitives telles que la mémoire ou le sommeil), qui eux même se projettent sur le PVN et le VMN (68,69).

c. Le noyau vendromédian

Le noyau vendromédian (VMN) est décrit comme le centre de satiété principal et reçoit des projections neuronales provenant principalement des neurones NPY/AgRP et POMC/CART du noyau arqué (70) (**Figure 2**). L'activité de ces neurones est également régulée par la glycémie, les hormones sécrétées par le tissu adipeux (dont la leptine) ou encore les acides gras circulants (13–15). Les neurones du VMN, libèrent des neurotransmetteurs anorexigènes, dont le BDNF (Brain-derived neurotrophic factor) et le SF-1 (steroidogenic factor-1) (71–73).

Les neurones du VMN émettent des projections vers d'autres noyaux hypothalamiques (dont le DMN, le PVN, et le LH), afin de réguler, entre autre, la fréquence et la taille des repas (15). Néanmoins, ces neurones se projettent aussi sur le NTS localisé dans le tronc cérébral et les aires corticales impliquées dans les mécanismes de récompense afin de réguler la prise alimentaire, la dépense énergétique, ou encore la pression artérielle (15,74–76).

d. Noyau dorsomédian

Le noyau dorsomédian (DMN) est composé de différentes populations de neurones libérant divers neurotransmetteurs, tels que l'acétylcholine, le GABA, la prolactine, le NPY, et la TRH (77–81). L'activité des neurones du DMN peut être régulée par les afférences nerveuses, les hormones (dont la leptine) ou encore les nutriments (77,79,81–83). Grâce aux prolongements qu'ils envoient vers d'autres noyaux hypothalamiques (dont le noyau arqué, le PVN et le LH) et vers le tronc cérébral, les neurones du DMN participent à la régulation de la prise alimentaire et de la dépense énergétique (81,82).

Chez la souris, l'activation des neurones cholinergiques du DMN est associée à une augmentation de la prise alimentaire. En effet, ces neurones vont activer les neurones GABA du noyau arqué (récepteurs muscariniques) qui vont ensuite inhiber les neurones anorexigènes POMC (82).

e. L'hypothalamus latéral

L'hypothalamus latéral (LH) joue un rôle important dans la régulation du métabolisme et de la prise alimentaire avec la notion de récompense (84). Le LH reçoit des projections inhibitrices et excitatrices provenant de différentes aires corticales et sous-corticales, dont les afférences des autres noyaux hypothalamiques (noyau arqué, VMN, PVN), de l'hippocampe, de l'amygdale et du noyau accumbens (85–90). Les deux principaux neurotransmetteurs impliqués sont la MCH (melanin concentrating hormone) et les orexines ; néanmoins des populations neuronales expriment aussi le glutamate, le GABA, la neurotensine, et la galanine (**Figure 2**) (84,91).

La MCH est un neuropeptide orexigène qui joue un rôle important dans le contrôle du stress, des comportements motivés (prise alimentaire ou de boisson par exemple) et de la balance énergétique (92). Bien qu'il existe deux récepteurs au MCH (MCH-R1 et MCH-R2), le récepteur MCH-R2 est principalement impliqué dans l'augmentation de la prise alimentaire et la diminution de la dépense énergétique. Les effets de la MCH sur le contrôle de l'homéostasie énergétique ne passent pas par des modifications importantes de la prise alimentaire mais plutôt par une modulation de la dépense énergétique et de l'activité locomotrice (91). Les interconnexions entre les neurones MCH du LH et les neurones NPY du noyau arqué permettent un contrôle approprié de la prise alimentaire par la détection des métabolites circulants (hormones et nutriments) et des variations de la glycémie (91,93,94).

L'orexine est présente sous deux formes (orexines A et B) qui sont exprimées par les neurones des zones dorsolatérale et latérale de l'hypothalamus (95). Outre leur rôle dans l'initiation de la prise alimentaire, les orexines sont impliquées dans de nombreuses fonctions, dont la régulation des rythmes circadiens, les circuits de récompense, la cognition, l'activité motrice et la réponse au stress (96). Dans le cadre de la régulation de la prise alimentaire, l'activité des neurones à orexines est contrôlée à la fois par les afférences nerveuses provenant du noyau arqué et du VMN, et par les signaux métaboliques (dont le glucose, la ghréline, ou encore la leptine) (pour revue (97)). Les effets des orexines sont médiés par deux types de récepteurs couplés aux protéines G (OX1-R et OX2-R) exprimés largement dans le système

nerveux central. Grâce à l'activation de ces récepteurs, les orexines peuvent directement activer les neurones de l'aire tegmentale ventrale, du noyau accumbens (ensemble de neurones de la zone corticale du prosencéphale impliqués dans les circuits de la récompense), et réguler le tonus sympathique (pour revue (97)).

Les projections des neurones GABA du LH vers l'aire tegmentale ventrale sont impliquées dans la régulation de la prise alimentaire par des systèmes de récompense (98,99). Les neurones GABA qui expriment également la galanine se projettent localement sur les neurones du LH, et sur des neurones du locus coeruleus, sans faire intervenir l'aire tegmentale ventrale pour moduler le système de la récompense (100–103). La neurotensine est un peptide anorexigène présent dans de nombreuses régions cérébrales (dont le LH) et périphériques. Il se fixe sur trois récepteurs couplés aux protéines G (NtsR1-3) mais le récepteur NtsR1 apparaît comme le principal médiateur des effets sur la prise alimentaire (104–106). Par ailleurs, une sous population de neurones qui expriment à la fois la galanine, la neurotensine, et le récepteur à la leptine, est également impliquée dans les effets anorexigènes de la leptine en impliquant le systèmes de récompense (100,107,108).

Il existe un grand nombre de connections entre le LH et les autres zones du cerveau, telles que le PBN latéral. En effet, les neurones du PBN latéral forment des synapses glutamatergiques excitatrices avec les neurones à orexines du LH (109,110). Plusieurs études ont aussi mises en évidence l'existence de projection neuronales (GABA et glutamate) du LH vers le PBN (111–114). L'ensemble de ces connections sont impliquées dans la réponse à un goût agréable chez la souris (115).

3. Le tronc cérébral

De par sa localisation, le tronc cérébral est impliqué dans la réception, l'intégration et l'émission de signaux nerveux. Le tronc cérébral, qui comprend le bulbe rachidien, le pont et le mésencéphale, est impliqué dans la régulation de l'homéostasie énergétique de la prise alimentaire. Parmi les différents noyaux du tronc cérébral impliqués dans la régulation de l'homéostasie énergétique, le NTS et le PBN ont un rôle prépondérant.

a. Le noyau du tractus solitaire

Le noyau du tractus solitaire est situé dans la partie bulbaire du tronc cérébral. Plus précisément, le NTS est un composant important du complexe vagal dorsal (CVD) qui comprend également *l'area prostroma* (région sans barrière hémato-encéphalique et à

proximité du 4^{ème} ventricule) et le noyau moteur dorsal du nerf vague (DMV) (qui contrôle l'activité nerveuse parasympathique périphérique).

Le NTS est un point important d'intégration des signaux centraux ou périphériques pour la régulation de la prise alimentaire (116–118). Il reçoit, entre autre, des afférences hypothalamiques ainsi que des afférences viscérales provenant du nerf vague et d'autres nerfs crâniens. En effet, c'est le premier relais des fibres vagales afférentes qui véhiculent les signaux de satiété en provenance du système gastro-intestinal, comme par exemple la distension gastrique ou la glycémie portale (**Figure 4**) (119,120). De plus, l'expression des récepteurs à la CRH et à la MSH (MC3/4R) permet au NTS de participer à la régulation de la prise alimentaire par l'intermédiaire du système mélanocortinergique (17,116,121–123). Néanmoins, la réception d'informations par le NTS ne se limite pas à la voie nerveuse, en effet sa proximité avec l'*area postrema* et sa capacité à intégrer les signaux périphériques circulants en détectant les nutriments et les différentes hormones [dont la leptine, la ghréline et le GLP-1 (glucagon-like peptide-1)], lui permettent d'initier une réponse adaptée (**Figure 4**) (124–131).

Afin de contrôler la prise alimentaire, les neurones du NTS envoient des projections dans plusieurs régions du cerveau dont l'hypothalamus, les noyaux du système de récompense mésolimbique (dont l'aire tegmentale ventrale et le PBN) ou encore d'autres noyaux du tronc cérébral (dont le DMV) (**Figure 4**) (132–134). Pour exemple, les neurones du NTS se projettent sur le PVN afin d'activer les neurones anorexigènes à CRH et à TRH (135).

Les neurones du NTS peuvent produire et libérer différents peptides et/ou neurotransmetteurs, tels que : les catécholamines, le GLP-1, POMC, le NPY, et la cholécystokinine (CCK) (131,133,136,137). La diminution de la prise alimentaire induite par l'activation des neurones à catécholamines et à GLP-1 du NTS implique des projections directes sur des structures du système de récompense, dont l'aire tegmentale ventrale et le noyau accumbens (132,138–143). Néanmoins, les neurones à GLP-1 du NTS semblent être impliqués dans la régulation de la prise alimentaire seulement en condition de stress particulier, comme lors d'un jeûne prolongé ou après une pré-charge de régime liquide qui mime un repas copieux (144).

Dans le NTS, le précurseur POMC, les catécholamines et le GLP-1 sont exprimés dans la même région mais par des neurones différents (116). Le rôle du précurseur POMC dans l'hypothalamus ou le tronc cérébral n'est pas exactement identique. En effet, les neurones POMC hypothalamiques, de par leur localisation proche du 3^{ème} ventricule seraient associés à

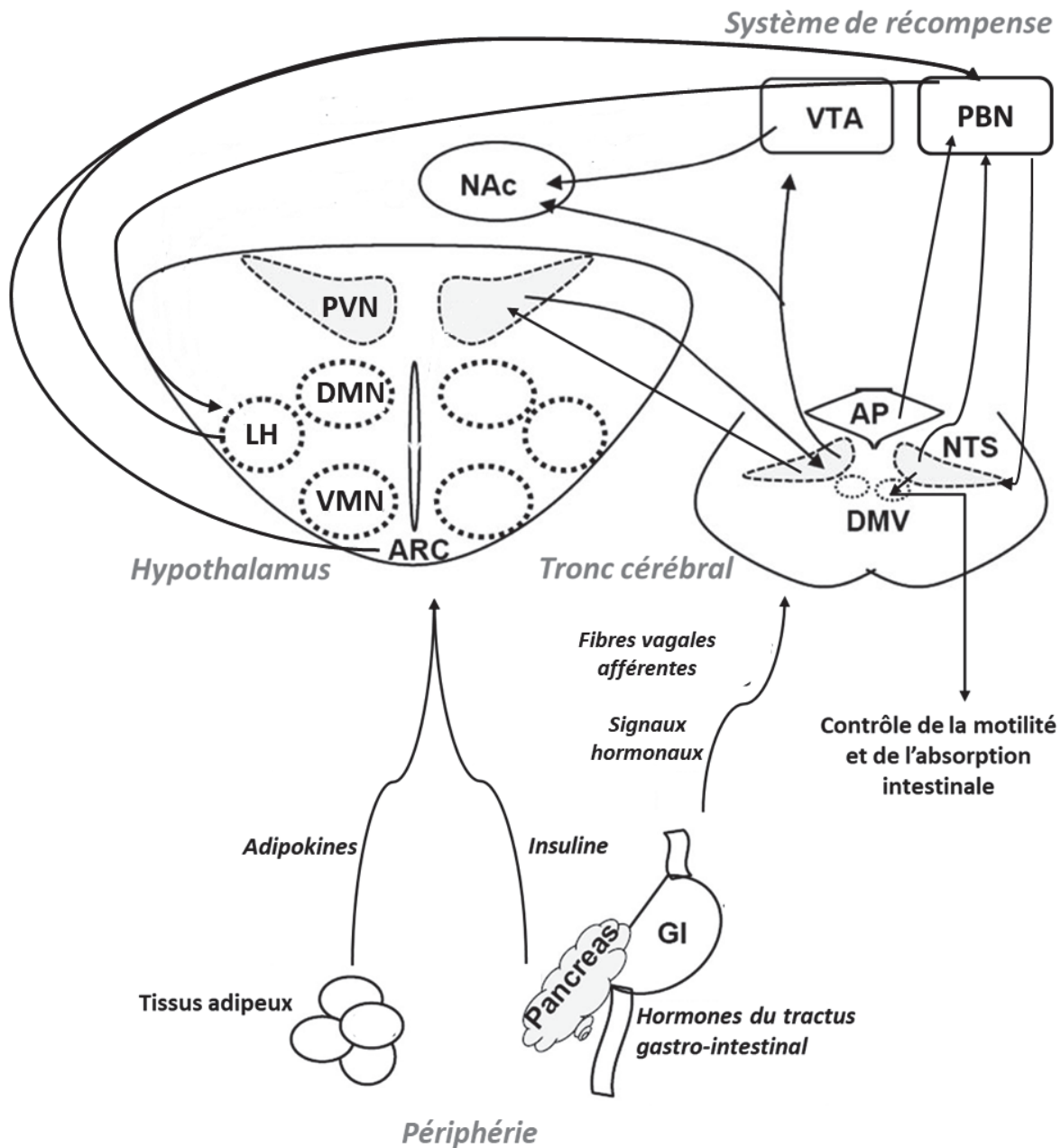


Figure 4 : Représentation schématique des principales connexions entre les tissus périphériques, le tronc cérébral, les systèmes de récompense et les noyaux hypothalamiques impliqués dans la régulation de la prise alimentaire.

Les tissus périphériques, dont le tissu adipeux, le pancréas et le tractus gastro intestinal, communiquent avec l'hypothalamus et le noyau du tractus solitaire (NTS) grâce à des signaux nerveux et hormonaux (dont l'insuline) afin de réguler la prise alimentaire. Le NTS reçoit des afférences hypothalamiques et envoie des projections vers l'hypothalamus, l'aire tegmentale ventrale (VTA), le noyau accumbens (NAc), le noyau parabrachial (PBN) et le noyau moteur dorsal du nerf vague (DMV). Le PBN reçoit également des afférences des neurones du noyau arqué (ARC) et de l'area postrema (AP).

Abréviations: DMN (noyau dorsomédian); VMN (noyau ventromédian), PVN (noyau paraventriculaire),

Adapté de Rui, 2013.

la régulation à long terme de l'alimentation, entre autre par les hormones sécrétées par le tissu adipeux (dont la leptine) tandis que ceux localisés dans le tronc cérébral seraient associés à des signaux de régulation à court terme (diminution de la taille et de la fréquence des repas) (36,118,145–147). La stimulation vagale par impulsion électrique ou par la CCK, provoque l'activation des neurones POMC du NTS (148,149). De plus, l'activation des récepteurs MC4R de ces neurones est requise pour les effets anorexigènes de la CCK. Ainsi, bien que les neurones à POMC soient minoritaires dans le NTS, ils jouent un rôle important dans la régulation de la prise alimentaire.

b. Le noyau parabrachial

Le noyau parabrachial est situé dans la partie pontique du tronc cérébral (**Figure 1**). De par la diversité des neurones qui le compose, le PBN est impliqué dans la régulation de multiples fonctions telles que la prise alimentaire, le malaise viscéral, ou encore la douleur (pour revue (150)). Les neurones du PBN sont activés à la suite d'un repas, de stimulations désagréables, nocives et menaçantes (pincement, exposition à la chaleur ou au froid, douleur viscérale) ou encore lors d'une aversion gustative (pour revues (150,151)).

L'activité des neurones du PBN est modulée par l'activation des différents récepteurs exprimés à leur surface (dont les récepteurs à la CRH, à la leptine, au NPY, à l'ocytocine, à la CCK, à la galanine ou encore les MC4R) (150,152). L'activation de ces neurones conduit à la libération de différents neuropeptides, dont le majoritaire est le CGRP (Calcitonin gene-related peptide) (150). L'action de ce peptide, découvert dans le PBN en 1983, implique sa fixation sur des récepteurs membranaires couplés aux protéines G et l'activation de l'adénylate cyclase intracellulaire (153–155). Les neurones du PBN, et plus particulièrement les neurones à CGRP, participent à la régulation de la prise alimentaire. En effet, la photo-activation de cette population neuronale chez des souris à jeun inhibe la prise alimentaire lors d'une réalimentation (156).

Des études visant à identifier les afférences du PBN qui interviennent dans la régulation de la prise alimentaire ont mis en évidence les rôles importants de l'hypothalamus et du NTS (**Figure 4**). En effet, l'activité des neurones CGRP du PBN est modulée, en partie, par les afférences des neurones du noyau arqué (157). Ainsi, l'activation des neurones AgRP du noyau arqué inhibe l'activité des neurones à CGRP du PBN et provoque une augmentation de la prise alimentaire. Par ailleurs, deux populations de neurones glutamatergiques du NTS qui expriment indépendamment la CCK et la dopamine β -hydroxylase se projettent sur les neurones à CGRP

du PBN (158). L'excitation optogénétique de ces neurones provoque l'activation des neurones à CGRP du PBN et ainsi induit une diminution de la prise alimentaire via des mécanismes de satiété et de rassasiement (159–161). De façon intéressante, l'inactivation des neurones à CGRP diminue les effets de la CCK et du GLP-1 sur la satiété suggérant l'implication des neurones à CGRP dans la réponse anorexigène de la CCK et du GLP1 (160). De plus, les neurones à CGRP du PBN sont des médiateurs importants des signaux de détresse gastro-intestinaux et sont nécessaires dans les processus d'aversion conditionnée normale (156,162). La modulation des activités gustatives et des phénomènes d'aversion conditionnée font intervenir des connexions entre le PBN et l'amygdale, le lieu de convergence des signaux sensoriels associés au malaise viscéral et au goût (150,163–168). D'autre part, des neurones à orexines, GABAergiques et glutamatergiques du LH se projettent sur le PBN, et pourraient jouer un rôle important dans la régulation de la prise alimentaire et les mécanismes d'aversion gustative (112,156,162,168,169).

Des études sont encore nécessaires pour déterminer comment les neurones à CGRP du PBN modulent à la fois la satiété et l'aversion, mais deux hypothèses ont été formulées (160). La première suggère l'existence d'une seule population de neurones à CGRP, mais d'une force de stimulation différente selon les situations (en terme de durée et de population neuronale recrutée). Dans ce cas, une situation aversive impliquerait une durée et une population recrutée plus grande. La seconde hypothèse implique l'existence de deux populations de neurones à CGRP différentes. En effet, le repas augmenterait l'activité d'un groupe de neurones localisé dans la zone dorsale du PBN latéral externe visant à diminuer la prise alimentaire, alors qu'une aversion conditionnée induirait l'activité des groupes neuronaux situés dans les parties ventrale et dorsale du PBN latéral externe (156). Néanmoins, il n'est pas exclu que ces deux hypothèses soient avérées. En effet, pour exemple, dans le NTS, différents sous types neuronaux sont activés de façon différente en fonction de la taille du repas (170).

En plus du CGRP, les neurones du PBN expriment différents neurotransmetteurs impliqués dans la régulation de la prise alimentaire, comme la CRH, la MSH ou encore les orexines (pour revue (168)). Ces différents neurotransmetteurs ont notamment été mis en évidence dans les projections des neurones sensibles au goût du PBN vers le LH (168).

En conclusion, le PBN, et plus particulièrement les neurones à CGRP, grâce à ses nombreuses connexions, notamment avec l'hypothalamus, le NTS et l'amygdale, est un acteur important dans la régulation de la prise alimentaire (**Figure 4**).

II. Contrôle périphérique de la prise alimentaire

Le contrôle périphérique de la prise alimentaire implique des régulations à court et à long terme. Alors que la régulation à court terme implique principalement des signaux qui proviennent de l'appareil digestif, le contrôle à long terme implique majoritairement des hormones produites par le tissu adipeux et le pancréas.

1. Régulations hormonales à court terme de la prise alimentaire

Le tractus gastro-intestinal est un ensemble d'organes endocrines qui produisent et libèrent de nombreuses hormones et peptides biologiquement actifs (171). Ils sont pour la plupart impliqués dans la régulation de la prise alimentaire (**Figure 5**). En dehors de cette régulation humorale, la prise alimentaire est également contrôlée par la distension gastrique, qui exerce un effet satiétogène (pour revue (172)).

a. La cholécystokinine

La cholécystokinine est la première hormone intestinale capable de moduler la prise alimentaire à avoir été mise en évidence (173). Il existe plusieurs isoformes bioactives qui résultent de différentes hydrolyses de la pré-procholécystokinine par des pro-hormones convertases (174,175). Au niveau périphérique, ces peptides sont principalement sécrétés par les cellules entéro-endocrines I en réponse aux lipides et aux protéines contenus dans le bol alimentaire (**Figure 5**) (176,177). Les isoformes CCK33 et CCK22 sont prédominantes dans l'intestin et les isoformes CCK8 et CCK-58 sont les seules à avoir été retrouvées dans le système nerveux central (178,179).

La CCK contrôle la digestion en régulant les sécrétions du pancréas exocrine et de la vésicule biliaire, mais aussi en contrôlant la mobilité gastrique et intestinale (180,181). Cette hormone sécrétée par le duodénum joue également un rôle important dans la régulation de la prise alimentaire en modulant la taille du repas ou encore l'intervalle entre les repas selon l'isoforme mise en jeu (182,183). En effet, la CCK58 réduit la taille du repas en induisant à la fois le rassasiement et la satiété, et la CCK8 seulement en induisant le rassasiement (184).

Les effets de la CCK sont médiés par des récepteurs membranaires couplés à des protéines G qui sont largement exprimés dans les cellules du tractus gastro-intestinal, les cellules acineuses du pancréas, la vésicule biliaire, ou encore le cerveau (notamment au niveau du tronc cérébral et de l'hypothalamus) (176,185–188). L'action de la CCK est médiée par deux

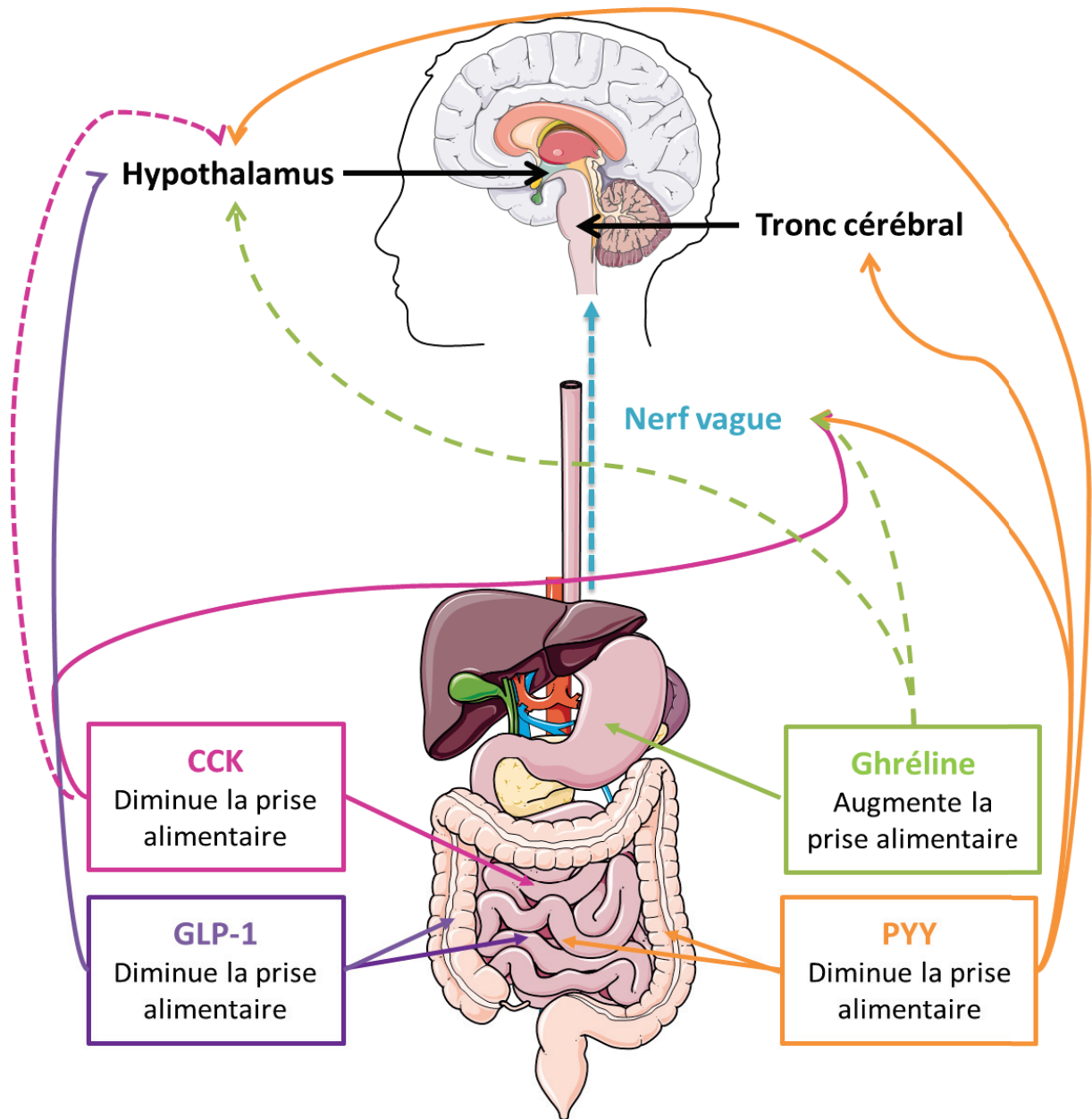


Figure 5 : Lieux de synthèse et d'action des principales hormones gastro-intestinales impliquées dans la régulation de la prise alimentaire.

La Cholécystokinine (CCK) produite dans le duodénum active principalement des récepteurs présents sur les afférences du nerf vague qui induit l'activation des neurones du NTS impliqués dans la réduction de la prise alimentaire. De plus, la CCK provoque également l'activation des neurones hypothalamiques impliqués dans le contrôle de la prise alimentaire. Le glucagon-like peptide-1 (GLP-1) produit dans l'iléon et le côlon diminue la prise alimentaire via l'activation des neurones hypothalamiques. Le peptide tyrosine tyrosine (PYY) produit dans l'iléon et le côlon diminue la prise alimentaire via l'activation du nerf vague, mais aussi des neurones hypothalamiques et du tronc cérébral. La ghréline est un peptide orexigène sécrété principalement par l'estomac qui contrôle la prise alimentaire par l'intermédiaire des afférences vagales et/ou des neurones hypothalamiques.

types de récepteurs (CCK-1R et CCK-2R) qui présentent des spécificités tissulaires (188,189). L'expression des récepteurs CCK-1R est largement retrouvée en périphérie au niveau du tractus gastro-intestinal, du foie et du pancréas, mais également dans différentes régions centrales (dont l'hypothalamus et *l'area postrema*), ainsi qu'au niveau des afférences du nerf vague qui se projettent sur le NTS (179,190). En revanche, le récepteur CCK-2R (aussi appelé récepteur à la gastrine) est prédominant dans le système nerveux central (179,190). Les effets anorexigènes de la CCK passent principalement par sa fixation sur les récepteurs CCK-1R présents sur les afférences du nerf vague qui induit l'activation des neurones du NTS impliqués dans la réduction de la prise alimentaire (**Figure 5**) (148,191–195). Plus précisément, dans le NTS, les neurones à POMC et le système mélanocortinergique sont les principaux médiateurs des effets de la CCK sur la régulation de la prise alimentaire (116,148). Néanmoins, l'administration périphérique de la CCK provoque également l'activation des neurones de certains noyaux hypothalamiques (dont le PVN), suggérant également leur implication dans le contrôle de la prise alimentaire par la CCK (**Figure 5**) (196).

b. Le glucagon-like-peptide 1

Le glucagon-like-peptide 1 est une hormone synthétisée et libérée par le tractus gastro-intestinal lors de la prise d'un repas (**Figure 5**) (197). Dans l'intestin, le GLP-1 est obtenu par clivage enzymatique du gène codant pour le pro-glucagon par la convertase 1. Le GLP-1 est un membre de la famille des incrétines, c'est-à-dire qu'il est capable de moduler les sécrétions pancréatiques et par conséquent l'homéostasie glucidique (198). C'est un polypeptide anorexigène de 30 acides aminés, libéré par les cellules L de l'iléon et du côlon (199,200). Les taux circulants de GLP-1 augmentent après un repas et chutent au cours du jeûne.

Les récepteurs au GLP1 (GLP1-R) appartiennent à la famille des récepteurs couplés aux protéines G (201). Ils sont largement exprimés dans le cerveau (noyau arqué, PVN, et NTS), les fibres vagues afférentes, le tractus gastro-intestinal et le pancréas (199,202). Des études basées sur l'administration centrale et périphérique d'agonistes du GLP-1 (Liraglutide) ont permis de mieux comprendre les mécanismes d'action du GLP-1. Lors d'une administration périphérique, l'agoniste du GLP-1 est retrouvé dans tous les organes circumventriculaires et ses effets anorexigènes requièrent la présence des récepteurs centraux au GLP-1, notamment au niveau des neurones POMC/CART du noyau arqué (203,204). Ces effets sont renforcés indirectement par la fixation du GLP1 sur les neurones GABA du noyau arqué ce qui entraîne l'inhibition de l'activité des neurones orexigènes NPY/AgRP (203).

En dehors de son rôle dans la diminution de la prise alimentaire, le GLP-1 induit la synthèse de l'insuline et sa libération en réponse au glucose, inhibe la sécrétion de glucagon et retarde la vidange gastrique (200,205,206).

c. Le peptide tyrosine tyrosine

Le peptide tyrosine tyrosine (PYY) est un polypeptide composé de 36 acides aminés membre de la famille des polypeptides pancréatiques (qui comprend également le polypeptide pancréatique et le NPY) (207). Il existe deux formes de PYY, le PYY (1-36) et le PYY (3-36) qui sont sécrétées par les cellules L intestinales de l'iléon et du colon en quantité proportionnelle au contenu énergétique du repas (**Figure 5**) (208–210). Le PYY (3-36) est obtenu après le clivage d'un résidu tyrosine-proline de l'extrémité N-terminale du PYY (1-36) par la dipeptidyl-peptidase IV et représente la forme circulante majoritaire (211).

Il existe plusieurs récepteurs au PYY (Y1, Y2, Y4, Y5, et Y6) couplés aux protéines G mais le récepteur Y2 est celui avec lequel le PYY (3-36) possède la plus grande affinité. Des études ont montré que le PYY (3-36) est capable de pénétrer la barrière hématoencéphalique et d'activer le nerf vague (212,213). De plus, l'expression du récepteur Y2 a été mise en évidence dans les régions centrales qui contrôlent la prise alimentaire (208,209,214). De ce fait, l'injection périphérique de PYY (3-36) induit l'expression du marqueur d'activation neuronale c-Fos dans le noyau arqué, le NTS et *l'area postrema* et réduit la prise alimentaire en augmentant les délais entre les repas (pour revue (215,216)). L'activation du récepteur Y2 dans l'hypothalamus, notamment au niveau du noyau arqué, entraîne une diminution de la prise alimentaire en activant les neurones POMC et en inhibant les neurones NPY (212,214,215,217).

En plus de son rôle central dans la régulation de la prise alimentaire, le PYY retarde la vidange gastrique et est impliqué dans l'augmentation de la dépense énergétique (218,219).

d. La Ghréline

La ghréline est un peptide orexigène qui est sécrété principalement par l'estomac, et en moindre mesure par l'intestin, le pancréas, les reins, l'hypothalamus et l'hypophyse (**Figure 5**) (220,221). La ghréline intervient dans la régulation de nombreuses fonctions, dont la prise alimentaire, le maintien du poids corporel et de la masse grasse, ou encore le métabolisme glucidique (222). Sa sécrétion est induite par la diminution de la glycémie au cours du jeûne et est diminuée par son élévation après la prise d'un repas (222).

La ghréline est présente sous deux formes, une forme désacétylée, et une forme acétylée par la *ghrelin O-acyltransferase* qui serait la forme biologiquement active. Néanmoins, des études suggèrent que la forme désacétylée exercerait les mêmes fonctions que la forme acétylée (notamment sur le métabolisme glucidique) (223–225). En effet, le récepteur de la ghréline GHS-R1a (Growth hormone secretagogue receptor 1a), couplé aux protéines G, fixe à la fois la forme acétylée et désacétylée de la ghréline. Le GHS-R1b est une forme tronquée du récepteur GHS-R1a qui, selon les cas, peut potentialiser ou diminuer l'efficacité de la signalisation de GHS-R1a (223,226,227). En effet, une faible quantité de GHS-R1b favorise le trafic de GHS-R1a vers la membrane plasmique, tandis qu'une élévation de la quantité de GHS-R1b exerce un effet allostérique négatif sur la signalisation GHS-R1a (227).

Les GHS-R1a sont fortement exprimés par les afférences du nerf vague et les neurones hypothalamiques impliqués dans la régulation de l'homéostasie énergétique, mais également par des cellules périphériques dont celles du tractus gastro-intestinal où ils sont impliqués dans le contrôle de la motilité intestinale et de l'homéostasie glucidique et lipidique (228–231). De façon intéressante, leur expression a également été détectée dans les astrocytes du noyau arqué, suggérant qu'en plus de leur rôle de soutien des neurones, ces structures joueraient également un rôle essentiel dans la régulation de l'homéostasie énergétique (232–234). Par ailleurs, les voies d'action de la ghréline dans le contrôle de la prise alimentaire n'ont pas encore été clairement identifiées et pourraient impliquer les afférences vagales ou les neurones AgRP/NPY du noyau arqué séparément, ou les deux conjointement (235,236).

Enfin, outre son rôle dans la régulation à court terme de la prise alimentaire, la ghréline diminue l'utilisation des graisses au niveau du tissu adipeux blanc en activant la lipogénèse et en inhibant la lipolyse, ce qui lui confère un rôle important dans le contrôle du poids à long terme (237–240).

2. Régulations hormonales à long terme de la prise alimentaire

Les hormones libérées dans le sang par les organes ou tissus périphériques permettent de renseigner le cerveau, notamment l'hypothalamus et le NTS, de l'état métabolique de l'organisme afin qu'il initie des signaux permettant de réguler la prise alimentaire et la dépense énergétique et ainsi maintenir l'équilibre de la balance énergétique.

a. L'insuline

L'insuline est une hormone formée par deux chaînes peptidiques (de 21 et 30 acides aminés) liées par des ponts disulfures, et sécrétée par les cellules β des îlots pancréatiques.

L'insuline est une hormone clé qui informe de l'état métabolique de l'organisme. Pour exemple, sa concentration plasmatique augmente en réponse à l'augmentation de la glycémie à la suite d'un repas.

Dans les cellules β -pancréatiques, le gène de l'insuline code pour la préproinsuline, un précurseur qui interagit par avec des particules de reconnaissance du signal par l'intermédiaire de sa séquence peptidique signal N-terminale hydrophobe (241). Cette interaction entraîne une série de réactions qui ont pour but de faciliter l'adressage de la préproinsuline dans le réticulum endoplasmique (RE) où elle est clivée en proinsuline sous l'action de peptidases, puis modifiée par des protéines chaperonnes (242–244). Ensuite, la proinsuline est transportée du RE vers l'appareil de Golgi, où elle est insérée dans des vésicules de sécrétion immatures dans lesquelles elle est clivée en insuline et en peptide-C. Ces derniers sont stockés dans des vésicules de sécrétion matures avec l'amyline et d'autres produits de sécrétion des cellules β (245,246). La sécrétion d'insuline est régulée par la concentration de glucose sanguin qui est détectée par le transporteur de glucose 2 (GLUT2) (247). Le mécanisme de sécrétion de cette hormone lorsque la glycémie s'élève fait schématiquement intervenir une augmentation de l'utilisation de glucose par la cellule β -pancréatique, une production accrue d'ATP et une diminution du rapport ADP/ATP conduisant à la fermeture de canaux K^+ ATP-dépendants. Cela entraîne une dépolarisation cellulaire qui permet l'ouverture de canaux Ca^{2+} dépendant du voltage. L'augmentation du calcium intracellulaire et d'autres seconds messagers (AMPc), stimulent la libération d'insuline.

L'insuline exerce de nombreuses fonctions parmi lesquelles on retrouve la régulation de la prise alimentaire, du stockage d'énergie (hormone hypoglycémisante), mais également de la croissance. En effet, l'insuline joue un rôle important à la fois au niveau central et périphérique dans la régulation à court et long terme de l'homéostasie glucidique et énergétique (248,249). L'administration intra-cerebro-ventriculaire (ICV dans le 3^{ème} ventricule) ou intranasale d'insuline ou d'insulino-mimétiques conduit à une importante diminution de la prise alimentaire et de la dépense d'énergie, à la fois chez l'homme et le rongeur (250–253).

La fixation de l'insuline sur son récepteur (IR) de la famille des récepteurs à tyrosine kinase entraîne son activation par auto-phosphorylation sur 3 tyrosines (254,255). Dans cet état, le récepteur recrute et phosphoryle les protéines impliquées dans plusieurs voies de signalisation, dont les deux principales sont les voies IRS/PI3K/Akt-PKB et IRS/MAPK (**Figure 6**). Ainsi, les protéines IRS- 1 et 2 (insulin receptor substrate) phosphorylées sur des

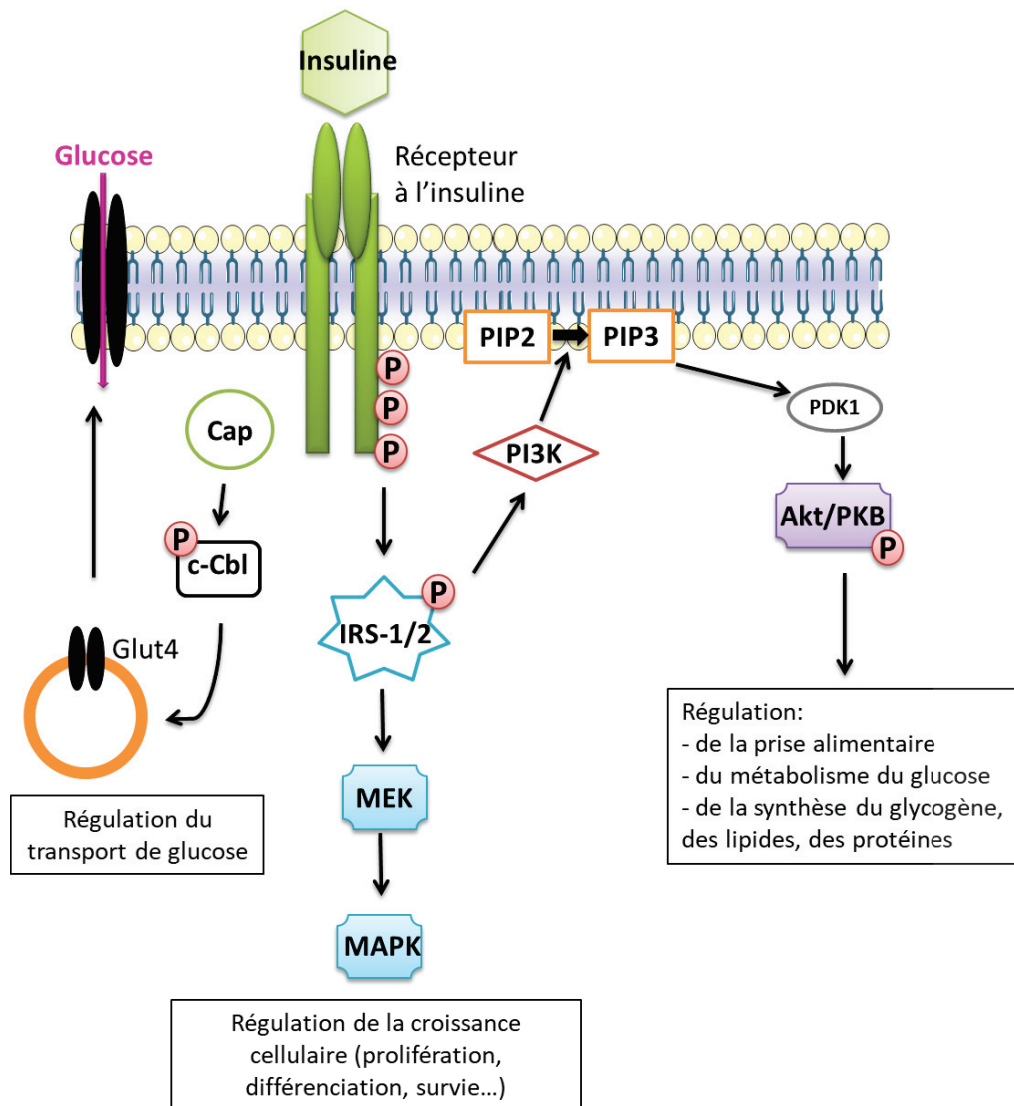


Figure 6 : Voie de signalisation de l'insuline

La fixation de l'insuline sur son récepteur provoque l'activation de trois voies de signalisations : IRS/PI3K/Akt-PKB, IRS/MAPK, CAP/c-Cbl.

Le récepteur de l'insuline phosphorylé sur 3 tyrosines, recrute et phosphoryle les protéines IRS- 1 et 2 (insulin receptor substrate) sur des tyrosines. Ensuite, les protéines IRS-1/2 vont activer la PI3K (phosphoinositide 3-kinase) qui transforme le PIP2 (Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate) en PIP3 (phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate) au niveau de la membrane. Ce dernier est responsable du recrutement d'Akt/PKB (protéine kinase B) qui va être phosphorylé par la PDK-1 (3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1). Akt ainsi phosphorylé active de multiples voies de signalisation impliquées dans la régulation de la prise alimentaire et du métabolisme du glucose. En parallèle, IRS-2 active la voie de la MAPK (Mitogen-activated protein kinases), impliquée dans la croissance cellulaire. La troisième voie implique le recrutement de la protéine Cap (c-Cbl-associating Protein) par le récepteur de l'insuline. Cap est responsable de la phosphorylation de c-Cbl (Casitas B-lineage lymphoma), qui induit la translocation de GLUT-4 (glucose transporteur 4) à la membrane plasmique pour augmenter le captage du glucose.

tyrosines activent ensuite la PI3K (phosphoinositide 3-kinase) qui transforme le PIP2 (Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate) en PIP3 (phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate). Ensuite, le recrutement de la protéine Akt/PKB (protéine kinase B) entraîne l'activation de multiples voies de signalisation impliquées notamment dans la régulation de la prise alimentaire et du métabolisme du glucose. En parallèle IRS-2 recrute Grb-2 (growth factor receptor-bound protein 2) responsable de l'activation de la voie de la MAPK (**Figure 6**). D'autre part, lorsque la concentration plasmatique en insuline est importante, l'hormone peut se fixer sur les récepteurs à l'IGF-1 (insulin-like growth factor-1).

Les récepteurs à l'insuline sont largement distribués dans le cerveau, en particulier dans les noyaux hypothalamiques impliqués dans la régulation de la prise alimentaire, dont le noyau arqué (256–258). A cet endroit, la fixation de l'insuline sur son récepteur entraîne une diminution de la prise alimentaire en activant et en inhibant les neurones POMC/CART et NPY/AgRP, respectivement (259–261). Néanmoins, alors que l'inactivation des récepteurs à l'insuline dans les neurones POMC n'a pas d'effet sur la prise alimentaire, son inactivation au niveau des neurones NPY entraîne une importante augmentation de la prise alimentaire associée à une hausse de l'expression de NPY (262,263). De plus, une altération de la signalisation de cette hormone dans les neurones NPY est associée au développement du syndrome métabolique (263). Par conséquent, les neurones NPY du noyau arqué jouent un rôle clé dans les effets centraux de l'insuline sur la prise alimentaire. D'autre part, l'inactivation des récepteurs à l'insuline spécifiquement dans les neurones AgRP a peu d'impact sur la prise alimentaire, ce qui suggère, d'une part qu'un nombre important de neurones ne co-expriment pas NPY et AgRP, et d'autre part qu'une partie seulement des effets de l'insuline sur l'alimentation est médiée par des neurones co-exprimant NPY et AgRP (9,262–264). De façon intéressante, une sous-population de neurones co-exprimant NPY et la neurotensine (sans expression d'AgRP) semble avoir une fonction importante dans la médiation des effets de l'insuline sur la prise alimentaire (263,265).

La régulation de la prise alimentaire par l'insuline implique également des neurones NPY localisés en dehors de l'hypothalamus. Pour exemple, l'administration d'insuline directement dans l'amygdale diminue la prise alimentaire en réduisant l'expression de NPY dans cette zone du cerveau (266,267).

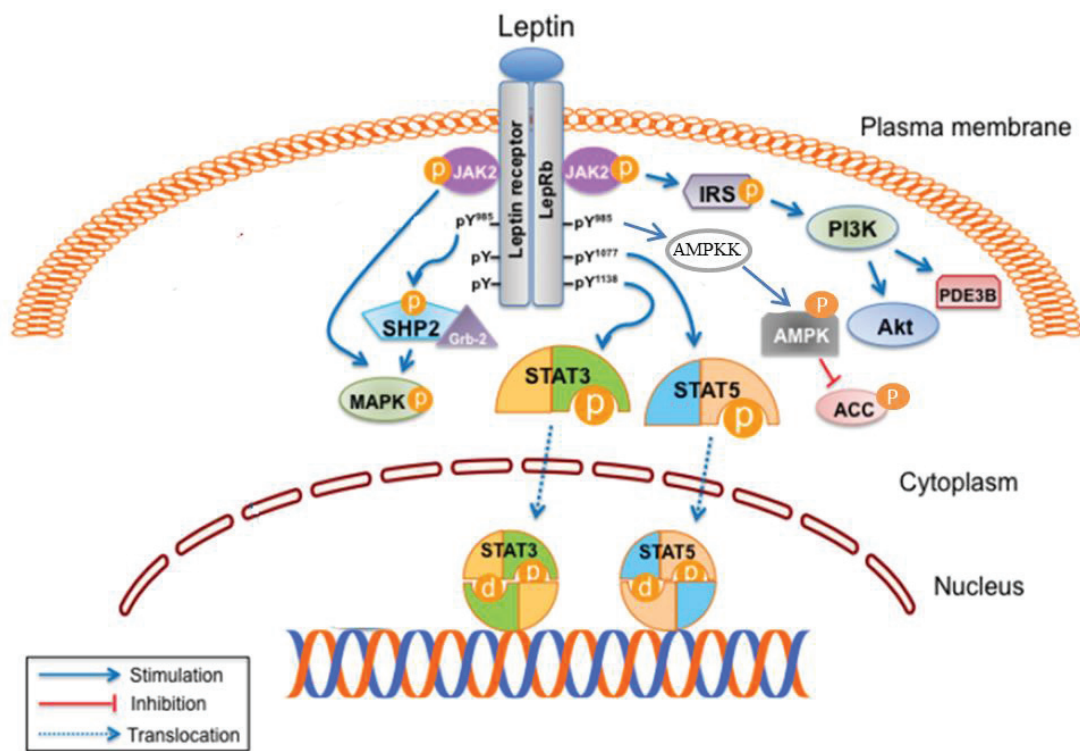


Figure 7 : Voies de signalisation de la leptine

La fixation de la leptine sur son récepteur membranaire LepRB entraîne sa dimérisation et la formation d'un complexe LepRb/JAK2 (janus kinase 2). L'auto-phosphorylation de JAK2 et la phosphorylation de LepRB permet l'interaction de LepRB avec STAT3 et STAT5 (signal transducer and activator of transcription 3/5) et leur phosphorylation. Des dimères de STAT3 et STAT5 sont ensuite formés puis transloqués dans le noyau afin d'activer la transcription des gènes cibles.

L'activation de JAK2 permet la fixation de SHP2 (protéine tyrosine phosphatase 2) sur LepRB et le recrutement de Grb2 (growth factor receptor-bound protein 2) ce qui entraîne l'activation de la MAPK (mitogen-activated protein kinases) par phosphorylation. La MAPK est également activée par la leptine indépendamment de SHP2. La fixation de la leptine entraîne également d'activation de la voie IRS/PI3K (insulin receptor substrate / phosphoinositide 3-kinase) qui conduit à la phosphorylation d'Akt/PKB (protéine kinase B) et de la phosphodiesterase 3B (PDE3B). Enfin, la fixation de la leptine sur son récepteur entraîne également l'activation de l'AMPKK (AMP-activated protein kinase kinase), la phosphorylation de l'AMPK (AMP-activated protein kinase), qui est notamment responsable de l'inhibition d'ACC (acetyl-coenzyme A carboxylase) par phosphorylation.

Adapté de Park and Ahima, 2014.

b. La leptine

La leptine est une protéine codée par le gène *Ob*, produite par le tissu adipeux en quantité proportionnelle à sa masse, permettant ainsi de renseigner l'organisme des réserves de lipides à long terme (268). La leptinémie diminue lors de famines et augmente fortement dans un contexte de suralimentation et d'obésité (269). La sécrétion de la leptine est augmentée par l'insuline, les glucocorticoïdes ou encore les cytokines pro-inflammatoires, alors qu'elle est diminuée par les catécholamines (270). La leptine est une hormone anorexigène qui est impliquée dans la régulation de nombreuses fonctions, dont l'équilibre énergétique, la thermogénèse, le développement neuronal et la reproduction.

Les effets de la leptine sont médiés par des récepteurs spécifiques exprimés à la fois dans le cerveau au niveau de l'hypothalamus, de l'hypophyse et du tronc cérébral mais également dans certains tissus périphériques comme les reins, les poumons, le foie et les ovaires. Il existe 6 isoformes (LepRa-f) du récepteur à la leptine qui fait partie de la famille des récepteurs aux cytokines de classe I et qui est codé par le gène *Db* (271). Le rôle de chacune de ces isoformes est encore mal connu, néanmoins, seule la forme longue du récepteur (Lep-Rb) contient le domaine intracellulaire nécessaire à l'activation de la signalisation JAK-STAT par la leptine (271). Le récepteur Lep-Rb est fortement exprimé dans le cerveau et participe entre autre à la régulation de la prise alimentaire et du métabolisme énergétique (73). Il est abondant dans l'hypothalamus (particulièrement dans le noyau arqué, l'hypothalamus latéral, le DMN ou encore le VMN), mais aussi dans d'autres régions cérébrales comme le NTS, l'*area postrema* ou encore l'aire tegmentale ventrale. La fixation de la leptine sur son récepteur active plusieurs voies de signalisation, dont les voies JAK2/STAT3, IRS/PI3K (commune avec l'insuline), SHP2/MAPK et AMPK/ACC (**Figure 7**) (73). La voie de signalisation impliquant la voie JAK2/STAT3 est la voie majoritairement impliquée dans la régulation de l'homéostasie énergétique par la leptine.

Dans le noyau arqué, la leptine entraîne la phosphorylation de STAT3 qui diminue l'expression de NPY/AgRP et augmente l'expression de POMC en se fixant sur les promoteurs des gènes *Pomc*, *Npy* et *Agrp* (73,94,272,273). Dans le PVN, la leptine augmente l'expression du neurotransmetteur anorexigène TRH (65–67). D'autre part, dans le LH, les récepteurs Lep-Rb sont exprimés par les neurones à MCH et à orexines (73). De même, dans le VMN, la leptine stimule la libération de BDNF et de SF-1 qui sont connus pour diminuer la prise alimentaire (71–73). Les récepteurs à la leptine sont également retrouvés à la surface des neurones du DMN

où leur activation n'est pas impliquée dans le contrôle de la prise alimentaire mais plutôt dans la régulation de la dépense énergétique et du poids (83).

Au niveau du tronc cérébral, les récepteurs à la leptine exprimés par les neurones du NTS et de l'*area postrema* sont impliqués dans la détection des signaux de satiété provenant du tractus-gastro-intestinal (hormones et distension gastrique) (127,129,130). En effet, l'absence des récepteurs à la leptine dans les neurones à CCK et à GLP-1 du NTS conduit à une hyperphagie et à une prise de poids (127,130).

Par ailleurs, les récepteurs à la leptine sont présents à la surface des neurones dopaminergiques de l'aire tegmentale ventrale, une région cérébrale impliquée dans les comportements motivés, comme la prise alimentaire. En effet, alors que l'injection de leptine directement dans cette région provoque une diminution de la prise alimentaire, l'absence des récepteurs dans cette zone conduit à une hyperphagie (128).

Enfin, le développement d'une hyperphagie et d'une obésité morbide chez des souris déficientes pour le gène de la leptine (souris *Ob/Ob*) ou pour son récepteur (souris *Db/Db*), montre l'importance de la signalisation de la leptine dans le maintien de l'homéostasie énergétique (274).

B. Maintien de l'homéostasie énergétique

En condition physiologique, l'organisme met en place des mécanismes de stockage d'énergie en période postprandiale, et de déstockage au cours du jeûne afin de maintenir l'homéostasie énergétique.

I. Maintien de l'homéostasie énergétique en période postprandiale

Lors de la prise d'un repas, les nutriments sont absorbés tout au long du tractus digestif et vont être véhiculés par la circulation sanguine vers les différents tissus dans lesquels ils vont être stockés sous différentes formes afin de répondre aux besoins énergétiques ultérieurs de l'organisme.

1. Devenir des glucides alimentaires

Le glucose entre dans la cellule via des transporteurs qui présentent une spécificité tissulaire (275). En effet, le transport du glucose par diffusion facilitée est assuré par les transporteurs GLUT2 ou GLUT4 dans les cellules hépatiques et pancréatiques ou musculaires

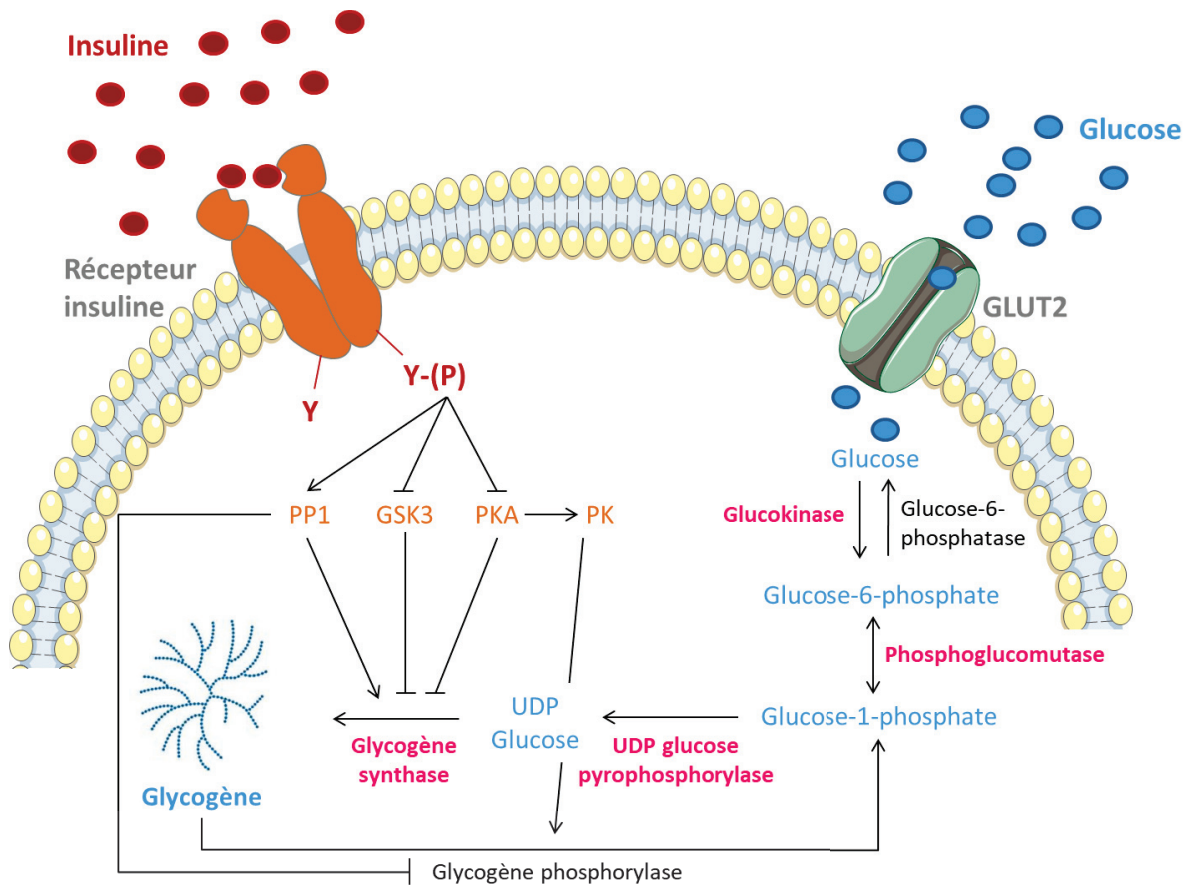


Figure 8 : Métabolisme du glycogène dans le foie

Les réactions impliquant les enzymes responsables de la synthèse (en rose), et de la dégradation (en noir) du glycogène sont représentées dans la cellule hépatique (la phosphoglucomutase est commune aux deux voies). La glycogène synthase et la glycogène phosphorylase sont activées par déphosphorylation et phosphorylation, respectivement. L'insuline stimule la synthèse de glycogène en **1/** phosphorylant la PP1 (Protein phosphorylase 1), qui va déphosphoryler la glycogène synthase (active) et la glycogène phosphorylase (inactive) ; et en **2/** réprimant l'inactivation de la glycogène synthase en inhibant des kinases telles que la GSK3 (glycogen synthase kinase 3) et la PKA (protein kinase A).

Au cours du jeûne, le glucagon (non représenté) augmente la concentration intracellulaire d'AMPC, et active successivement la PKA, la PK (phosphorylase kinase) et la glycogène phosphorylase, et inhibe la glycogène synthase (par phosphorylation) afin de favoriser la dégradation du glycogène.

Abréviations: GLUT2 (Glucose transporter 2), UDP-glucose (uridine diphosphate glucose).

et adipocytaires, respectivement (275,276). GLUT2 est localisé à la membrane plasmique alors que le transporteur GLUT4 est séquestré dans des vésicules cytoplasmiques et est transloqué à la membrane plasmique sous l'effet de l'insuline (**Figure 6**) (276–278).

En réponse à une augmentation de la glycémie et de l'insulinémie, le glucose entre rapidement dans les cellules où il est immédiatement phosphorylé en glucose-6-phosphate (G6P) par une hexokinase (glucokinase dans le foie) puis métabolisé pour fournir de l'énergie ou des squelettes carbonés (Pour revue (279)). Plus précisément, dans le foie ou les muscles, une partie du glucose est stocké sous forme de glycogène. De plus, l'excès de glucose provenant de l'alimentation peut être transformé en lipides par la voie de la lipogenèse dans le foie et le tissu adipeux. Les lipides pourront être stockés dans le foie sous forme de gouttelettes (minoritairement), ou exportés vers le tissu adipeux pour y être également stockés (majoritairement) (280). Chez le rongeur, la lipogenèse *de novo* prend place dans le foie et le tissu adipeux, alors que chez l'humain elle prend principalement place dans le foie (largement minoritaire dans le tissu adipeux) (281,282). En situation pathologique, l'excès de lipides dans le foie conduit à l'installation d'une stéatose hépatique.

a. La synthèse de glycogène

Pour la synthèse de glycogène, le G6P produit est transformé en Uridine diphosphate - glucose (UDP-glucose) et incorporé à une chaîne de glycogène grâce à l'enzyme clé de la voie de synthèse du glycogène, la glycogène synthase (**Figure 8**). L'insuline régule la synthèse de glycogène en activant la protéine phosphatase 1 (PP1) qui va par déphosphorylation activer la glycogène synthase et inhiber la glycogène phosphorylase responsable de la dégradation du glycogène (283). Par ailleurs, la voie de synthèse du glycogène est également régulée par la disponibilité en G6P. En effet, le G6P active la glycogène synthase de façon allostérique, mais également en stimulant sa déphosphorylation par la PP1. De plus, afin de garantir un stockage optimal du glycogène, le G6P inhibe sa voie de dégradation en stimulant ou en inhibant la glycogène phosphorylase par la PP1 ou la phosphorylase kinase, respectivement (283,284).

b. La lipogenèse de novo

La synthèse de lipides à partir de glucose est composée de plusieurs étapes successives (**Figure 9**). Premièrement, la glycolyse permet d'obtenir du pyruvate qui sera transformé dans la mitochondrie en acétyl-Coenzyme A (acétyl-CoA), puis en citrate via le cycle de Krebs. Dans le cytosol, le citrate sera transformé en acétyl-CoA qui sera utilisé comme substrat pour

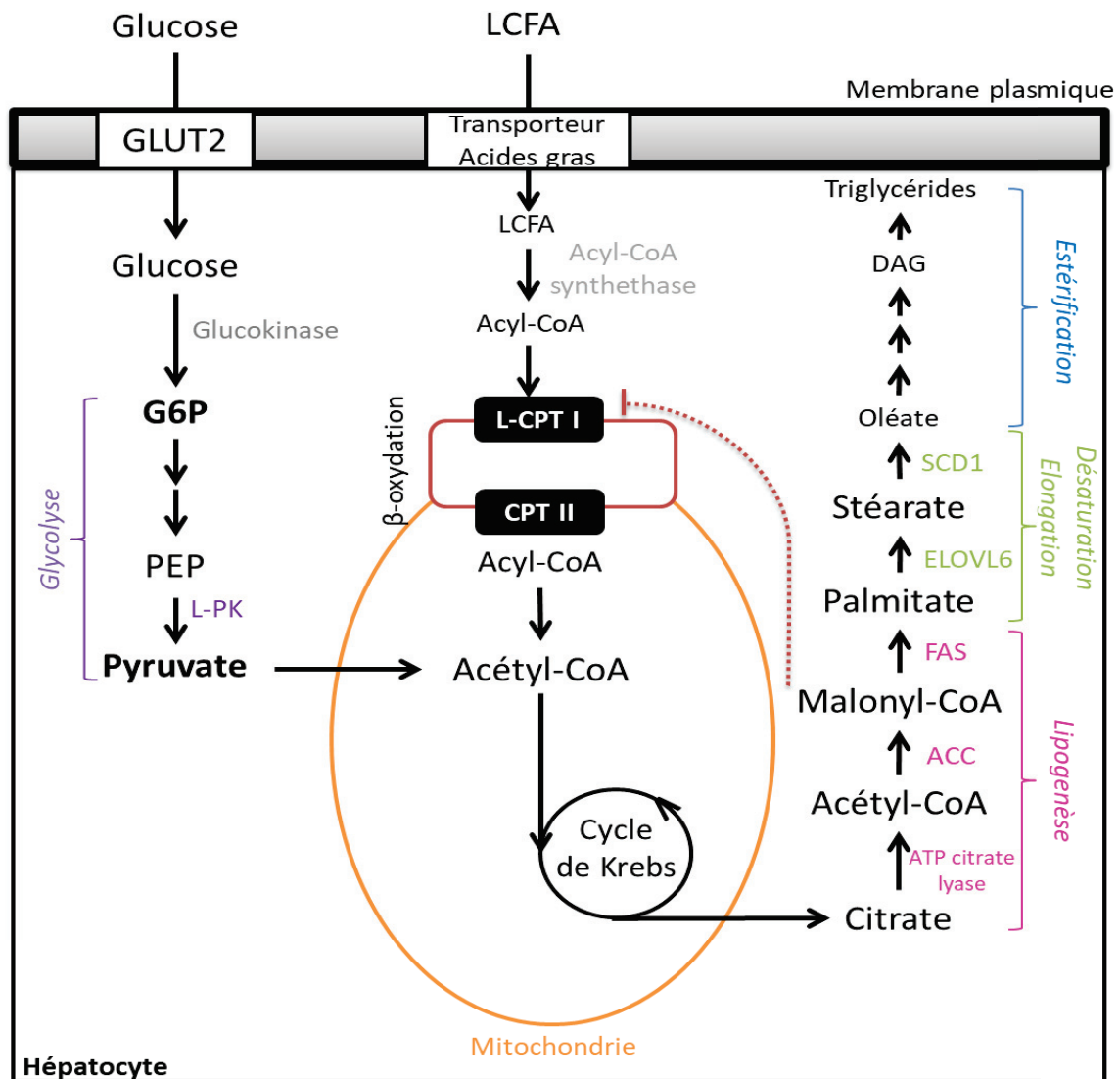


Figure 9 : Voies métaboliques impliquées dans la synthèse *de novo* de lipides dans le foie.

Le glucose qui entre dans la cellule via le transporteur GLUT2 est immédiatement phosphorylé en glucose-6-phosphate (G6P) par la glucokinase et transformé en pyruvate via la glycolyse dans le cytosol. Ensuite, dans la mitochondrie, le pyruvate est transformé en acétyl-CoA puis en citrate. Une fois dans le cytosol, le citrate est transformé en acétyl-CoA et utilisé comme substrat pour la synthèse des acides gras par deux enzymes clés : l'acétyl-CoA carboxylase (ACC) et la fatty acid synthase (FAS). Le palmitate obtenu est ensuite modifié par élongation et désaturation, puis estérifié pour obtenir des triglycérides.

Les acides gras à longue chaîne (LCFA: long chain fatty acid) entrent dans le cytosol de l'hépatocyte où ils sont transformés en Acyl-CoA afin d'intégrer la voie de la β -oxydation des acides gras dans les mitochondries. Le malonyl-CoA obtenu sous l'action de l'ACC est capable d'inhiber L-CPT1 (liver carnitine palmitoyl transferase 1), l'enzyme limitante de la β -oxydation des acides gras. Ainsi l'oxydation des acides gras est inhibée, et l'estérification est augmentée.

Abréviations: PEP (phosphoenolpyruvate), L-PK (liver pyruvate kinase), Elov16 (elongase 6), SCD1 (stearoyl-CoA desaturase), DAG (diacylglycerol).

Adapté de Postic and Girard, 2008.

la synthèse des acides gras grâce aux deux enzymes clés, l'acétyl-CoA Carboxylase (ACC) et la Fatty acid synthase (FAS) (**Figure 9**).

Dans un premier temps, l'ACC réalise la réaction de carboxylation de l'acétyl-CoA en malonyl-CoA, un métabolite commun aux voies de synthèse et de dégradation des lipides. Grâce à son action inhibitrice sur la carnitine palmitoyl transférase 1 (CPT1), le malonyl-Coenzyme A (malonyl-CoA) inhibe la β -oxydation en empêchant le transport des acétyl-CoA à travers la membrane mitochondriale. Il existe deux isoformes d'ACC qui sont codés par deux gènes distincts ; ACC1 et AAC2. L'isoforme 1 participe à la lipogenèse *de novo* et est exprimé dans le cytosol des cellules hépatiques et adipocytaires (285). L'isoforme 2 participe à la régulation de la β -oxydation des acides gras et est exprimée principalement dans les mitochondries des cellules musculaires squelettiques et cardiaques (286,287). Ensuite, les molécules de malonyl-CoA obtenues sont cycliquement ajoutées (7 cycles maximum) à une molécule d'acétyl-CoA grâce à l'action de la FAS pour former le palmitate (**Figure 9**). Le palmitate pourra ensuite être modifié via des mécanismes d'élongation et/ou de désaturation afin d'obtenir une grande variété d'acide gras. Les mécanismes d'élongation sont assurés par des élongases, Elovl (Elongation of very long chain fatty acid) qui comprennent 7 isoformes différentes, dont seules les isoformes 1, 2, 3, 5 et 6 sont exprimées dans le foie (288). Les réactions de désaturation sont catalysées par diverses désaturases qui ajoutent des doubles liaisons à différentes positions ($\Delta 5$, $\Delta 6$, et $\Delta 9$). Parmi les désaturases $\Delta 9$, la stearoyl-CoA desaturase (SCD1) transforme le stéarate en oléate et le palmitate en palmitoléate, deux composants majeurs des phospholipides membranaires, des triglycérides, et des esters de cholestérol. Néanmoins, le rôle de SCD1 ne s'arrête pas à la désaturation des acides gras puisqu'elle est également impliquée dans la régulation de la lipogenèse *de novo* (289). En effet, dans le foie, elle module l'expression des enzymes ACC et FAS et la maturation des facteurs de transcription lipogéniques SREBP-1c (Sterol regulatory element binding protein 1c) et ChREBP (Carbohydrate response element binding protein) (289).

Les acides gras obtenus grâce à la lipogenèse *de novo* à partir de composés glucidiques sont finalement estérifiés sous formes de triglycérides par la glycérol-3-phosphate acyltransférase (GPAT) et la diacylglycerol acyltransférase (DGAT). En condition physiologique, les triglycérides ainsi formés sont transportés vers le tissu adipeux sous forme de VLDL (very low density lipoprotein).

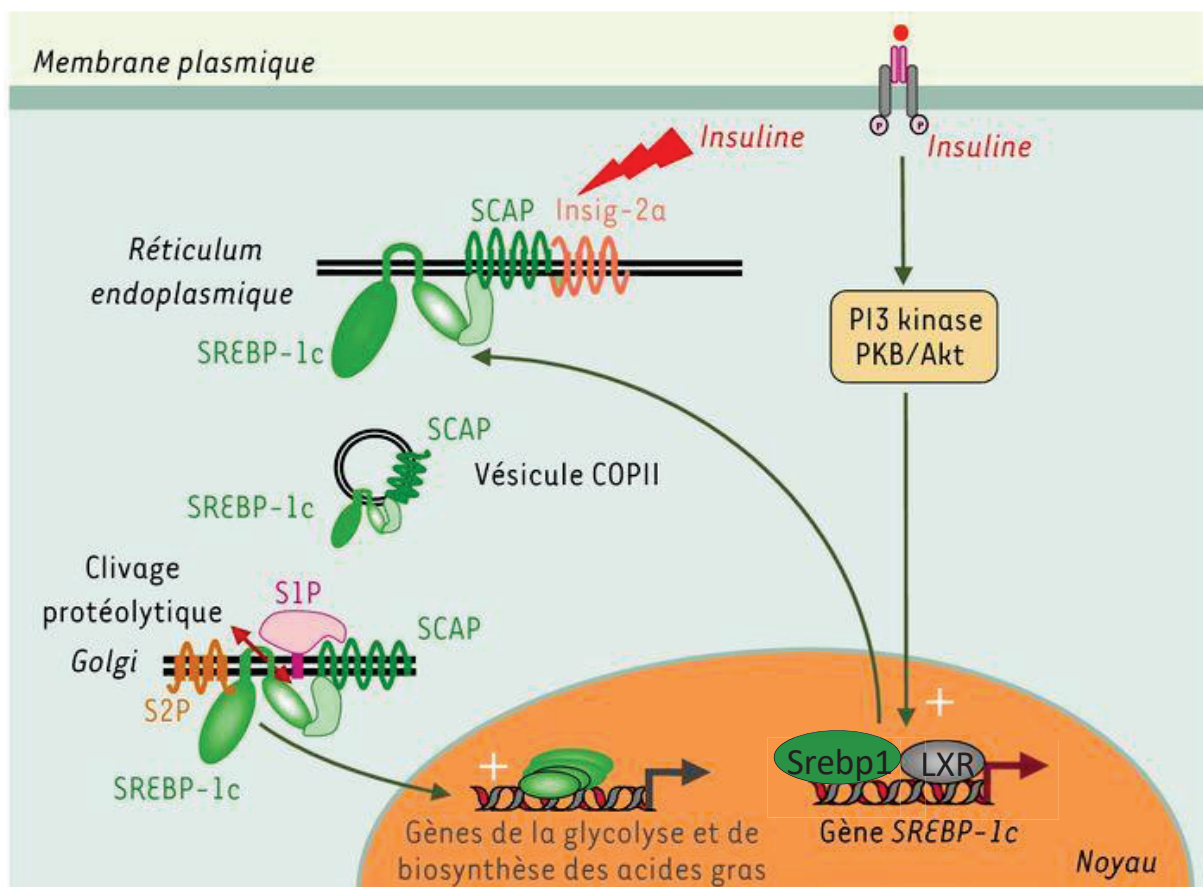


Figure 10 : Régulation de la transcription et du clivage du facteur de transcription SREBP-1c par l'insuline

La fixation de l'insuline sur son récepteur active la transcription du gène *Srebp1c* (sterol regulatory element binding protein) via la voie PI3K/Akt-PKB, et entraîne la synthèse de la protéine précurseur de SREBP-1c. Cette forme s'ancre à la membrane du réticulum endoplasmique et interagit avec SCAP (SREBP cleavage-activating protein). La liaison de SCAP avec Insig-2a (insulin induced gene 2a) retient SREBP-1c dans le réticulum. L'insuline active le clivage protéolytique de la forme précurseur, conduisant à la dissociation du complexe SCAP/SREBP-1c et Insig-2a. Ensuite, le complexe SCAP/SREBP-1c migre vers l'appareil de Golgi via des vésicules COPII (Coat Protein II), où il subit un double clivage protéolytique par les protéases SP1 et SP2 (Site1/2 protease). Cela entraîne la libération de la forme active de SREBP-1c qui migre dans le noyau et active la transcription de gènes codant pour des protéines impliquées dans la glycolyse et de la lipogenèse *de novo*.

Abréviation: LXR (Liver X receptor).

Adapté de Fougère et al., 2005.

En fonction de l'état nutritionnel, le contrôle de la lipogenèse *de novo* met en jeu deux facteurs de transcription SREBP-1c et ChREBP qui sont régulés par l'insuline et le glucose, respectivement.

L'insuline active à la fois la transcription et le clivage de la forme immature de SREBP-1c, l'isoforme prédominante de la famille des facteurs de transcription SREBP (**Figure 10**). En effet, l'insuline active la transcription du gène *Srebp1c* par la voie PI3K/Akt, en stimulant la fixation du facteur de transcription LXR α (Liver x receptor) et de SREBP-1c sur son propre promoteur (290–294). SREBP-1c est ensuite exprimé à la membrane du RE où il interagit avec la protéine SCAP (SREBP cleavage-activating protein) (295). Ce complexe SREBP-1c/SCAP est tout d'abord maintenu dans le RE grâce à une liaison de SCAP avec la protéine Insig-2a (Insulin induced gene 2a) (295). La dissociation du complexe SREBP-1c/SCAP-Insig-2a sous l'action de l'insuline ou une déplétion en cholestérol permet la libération et la migration du complexe SREBP-1c/SCAP vers l'appareil de Golgi, où il sera clivé par les protéases S1P et S2P (Site 1/2 Proteases) afin de libérer la forme active de SREBP-1c dans le cytosol qui sera transloquée au noyau. Dans le noyau, ce facteur de transcription induit la transcription des gènes de la glycolyse et de la lipogenèse (296–299).

Le glucose active ChREBP en entraînant la déphosphorylation de sa forme inactive cytosolique (phosphorylée sur la sérine 196) qui est ensuite transloquée dans le noyau (**Figure 11**) (300–303). ChREBP subit aussi des modifications post-traductionnelles par acétylation et O-glycosylation qui augmentent son activité transcriptionnelle (304,305). Dans le noyau, l'hétérodimérisation de ChREBP avec la protéine Mlx (max like protein x) active la transcription des gènes impliqués dans la voie de la lipogenèse *de novo* (dont *Acca*, *Fasn*, *Scd1*) (306). Deux isoformes de ChREBP ont été mises en évidence : ChREBP α et β (pour revue (300)). Alors que l'isoforme ChREBP α correspond à l'isoforme longue, la forme ChREBP β est dépourvue du domaine LID, qui est responsable de l'inhibition de l'activité de ce facteur de transcription en présence de faibles concentrations de glucose. Cette modification confère à ChREBP β une activité transcriptionnelle constitutivement plus élevée (307). De façon intéressante, la réponse au glucose serait amplifiée grâce au contrôle qu'exercerait ChREBP α sur ChREBP β (300,302). Plus précisément, ChREBP α serait d'abord activé par le glucose puis, à son tour, stimulerait l'expression de ChREBP β grâce à sa fixation sur un domaine ChoRE (carbohydrate response element) identifié dans l'exon 1b de ChREBP. D'autre part, ChREBP régule également la voie de la glycolyse par l'activation de la transcription de la L-PK (liver pyruvate kinase), une enzyme clé de cette voie non régulée par SREBP-1c (298,308,309).

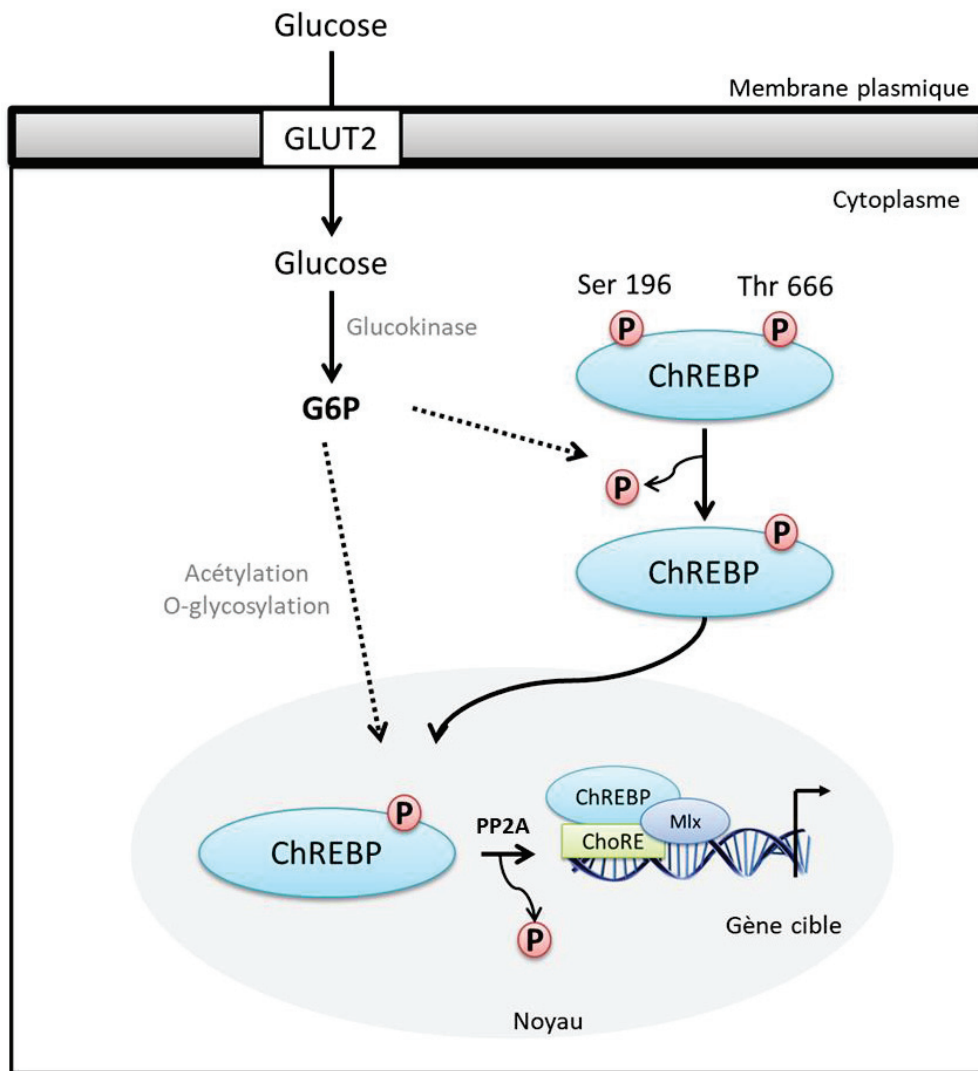


Figure 11 : Mécanismes de régulation transcriptionnels dépendants du glucose et de ChREBP

Le facteur de transcription ChREBP (carbohydrate response element binding protein) est présent dans le cytosol sous sa phosphorylée sur la sérine 196 et la thréonine 666. L'augmentation du glucose-6-phosphate (G6P) cytosolique à l'état nourri stimule la déphosphorylation de ChREBP sur la sérine 196, et conduit à sa translocation dans le noyau. La deuxième déphosphorylation sur la thréonine 666 par la protéine phosphatase 2A (PP2A) est requise pour la liaison de ChREBP sur l'ADN. Dans le noyau, ChREBP agit sous la forme d'hétérodimères avec la protéine Mlx (max like protein X) et se fixe sur un domaine ChoRE (carbohydrate response element) pour activer la transcription de ses gènes cibles. De plus, le glucose augmente l'activité transcriptionnelle de ChREBP par acétylation et O-glycosylation.

Le glucagon, une hormone libérée par les cellules α du pancréas suite à une baisse de la glycémie, joue également un rôle important dans l'inhibition de la lipogenèse *de novo* mais aussi dans l'induction de la β -oxydation des acides gras (**Figure 12**). Les effets du glucagon dépendent de sa fixation sur son récepteur couplé aux protéines G et de l'augmentation de l'AMPc intracellulaire qui va entraîner l'activation de plusieurs voies de signalisation impliquant la PKA et le facteur de transcription CREB (**Figure 12**). La PKA va inactiver l'activité de ChREBP en le phosphorylant sur les résidus Ser196 et Thr666 et ainsi inhiber la lipogenèse *de novo* (**Figure 12**) (310–312). Les effets du glucagon sur la lipogenèse *de novo* sont également médiés par l'activation du facteur de transcription CREB-H, un nouveau membre de la famille des facteurs de transcription CREB (**Figure 12**) (313). Dans le foie, CREB-H a été identifié comme inhibiteur de la lipogenèse *de novo* en bloquant la maturation de SREBP-1c via l'augmentation de l'expression du gène et de la protéine Insig-2 (313).

Enfin, les enzymes responsables de la synthèse *de novo* de lipides sont directement régulées par l'état nutritionnel et les hormones pancréatiques. Par exemple, l'isoforme ACC1 est régulée de façon transcriptionnelle et post-traductionnelle par l'insuline, le glucagon et le glucose. En effet, à l'état nourri, l'insuline et le glucose activent sa transcription, alors que le glucagon la diminue au cours du jeûne (314). L'inactivation d'ACC1 par phosphorylation au cours du jeûne est assurée par le glucagon via l'action de la PKA et de l'AMPK (AMP-activated protein kinase) (**Figure 12**) (315). De la même façon, l'expression de la FAS est induite par l'insuline et le glucose lors d'un repas, et est réprimée par le glucagon lors d'un jeûne.

2. Devenir des lipides alimentaires

Après leur passage dans la circulation sanguine, les lipides alimentaires vont rejoindre successivement le foie et le tissu adipeux afin d'y être stockés pour une utilisation ultérieure. Après un repas, l'insuline est la principale hormone de régulation du métabolisme lipidique. En effet, l'insuline sécrétée en période post-prandiale possède une action anti-lipolytique en inhibant l'hormone sensitive lipase (HSL) dans le tissu adipeux. Ceci a pour effet d'augmenter le stockage des lipides sous forme de triglycérides dans les adipocytes et de réduire la libération des acides gras libres dans la circulation sanguine (pour revue (316)).

Les lipides sont transportés dans la circulation sanguine sous forme de lipoprotéines qui sont classées en fonction de leur densité. Par ordre croissant de densité, on retrouve les chylomicrons, les VLDL, les IDL (Intermediate density lipoprotein), les LDL (Low density lipoprotein) et enfin les HDL (High density lipoprotein) (Pour revue (316)). Le métabolisme

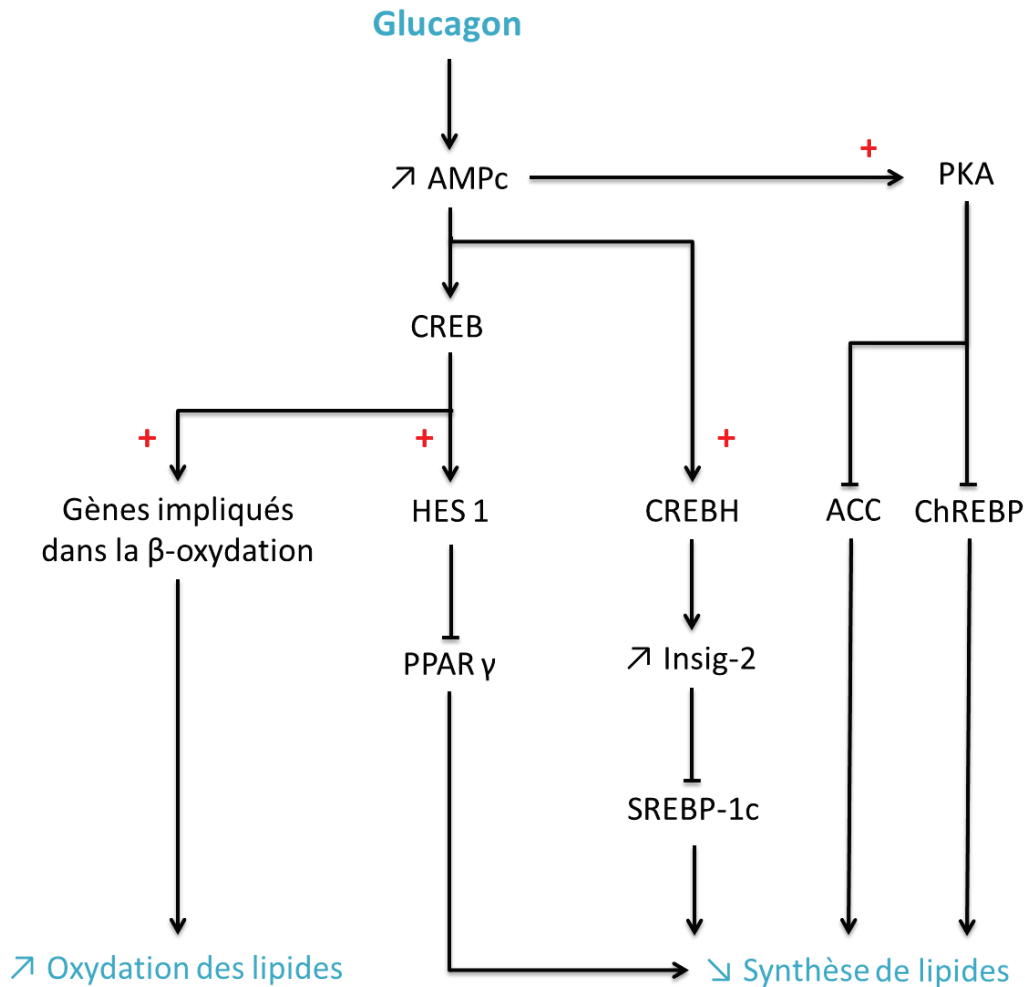


Figure 12 : Mécanismes de régulation du métabolisme lipidique par le glucagon

La fixation du glucagon sur son récepteur couplé aux protéines G augmente les taux intracellulaires d'AMPc (adénosine monophosphate cyclique) qui entraîne l'activation de plusieurs voies de signalisation impliquant la protéine kinase A (PKA) et le facteur de transcription CREB (C-AMP Response Element-binding protein). Le glucagon inhibe la lipogenèse *de novo* : **1/** en inactivant ChREBP (carbohydrate response element binding protein) et ACC (acetyl-CoA carboxylase) par phosphorylation ; **2/** en activant le facteur de transcription CREB-H qui va bloquer la maturation de SREBP-1c (sterol regulatory element binding protein) ; et **3/** en activant les facteurs de transcription CREB et HES 1 (hairy and enhancer of split-1). De plus, le glucagon augmente l'expression des gènes impliqués dans la β -oxydation des acides gras tels que PGC1 (peroxisome proliferator activator receptor γ coactivator-1 α).

Abréviations: Insig-2 (insulin induced gene 2a), PPAR γ (peroxisome proliferator activator receptor γ).

des lipides est composé de différentes voies dites endogène et exogène et la voie de retour du cholestérol (**Figure 13**).

a. La voie exogène :

Les lipides contenus dans le bol alimentaire sont absorbés par les entérocytes puis libérés dans le sang grâce notamment à différents transporteurs : CD36 (cluster of differentiation 36) pour l'absorption des acides gras libres, FATP (Fatty acid transfert protein) pour les acides gras, FABP (fatty acid binding protein) pour les acides gras et les phospholipides, NPC1L1 (Niemann-Pick C1-like 1 protein) et ABCG5/G8 (ATP Binding Cassette Subfamily G Member 5/8) pour le cholestérol et les phytostérols (Pour revue (316)).

Sous l'influence de la microsomal triacylglycerol transfer protein (MTP), les lipides absorbés par les entérocytes sont associés avec des apolipoprotéines ApoB-48 (mais aussi ApoA-I et Apo A-IV) afin de former des chylomicrons. L'insuline régule négativement l'expression du gène codant pour la MTP afin de diminuer le flux intra-portal de lipides allant au foie (317). Les chylomicrons rejoignent successivement la lymphe et la circulation sanguine où la lipoprotéine lipase (LPL) exprimée par les cellules endothéliales pourra hydrolyser leur contenu en triglycérides et ainsi libérer des acides gras libres dans la circulation sanguine (**Figure 13**) (318). Les chylomicrons « remnants » ainsi obtenus sont ensuite captés par le foie via le récepteur au LDL et le récepteur LRP (LDL receptor-related protein) qui sont tous les deux capables de fixer l'ApoE. Cette apolipoprotéine est retrouvée en abondance dans le sang et est synthétisée et sécrétée principalement par le foie mais également par d'autres tissus comme le rein, la peau ou encore le cerveau (pour revue (319)).

b. La voie endogène

Dans le foie, la formation des VLDL met en jeu la MTP qui permet d'associer l'apolipoprotéine B100 (ApoB100) aux lipides provenant à la fois des chylomicrons « remnants », du tissu adipeux, ou encore du cholestérol libre (317,320,321).

L'insuline contrôle la production des VLDL par plusieurs mécanismes (**Figure 13**). D'une part, elle est capable d'inhiber la synthèse des VLDL dans les hépatocytes en diminuant les taux d'acides gras libres circulants notamment par inhibition d'HSL. Et d'autre part, elle empêche la phase de maturation et d'assemblage des VLDL en inhibant les phospholipases D1 et ARF-1 (ADP ribosylation factor 1) et en diminuant l'expression de la MTP et la traduction de l'apolipoprotéine B (316,317,322–327).

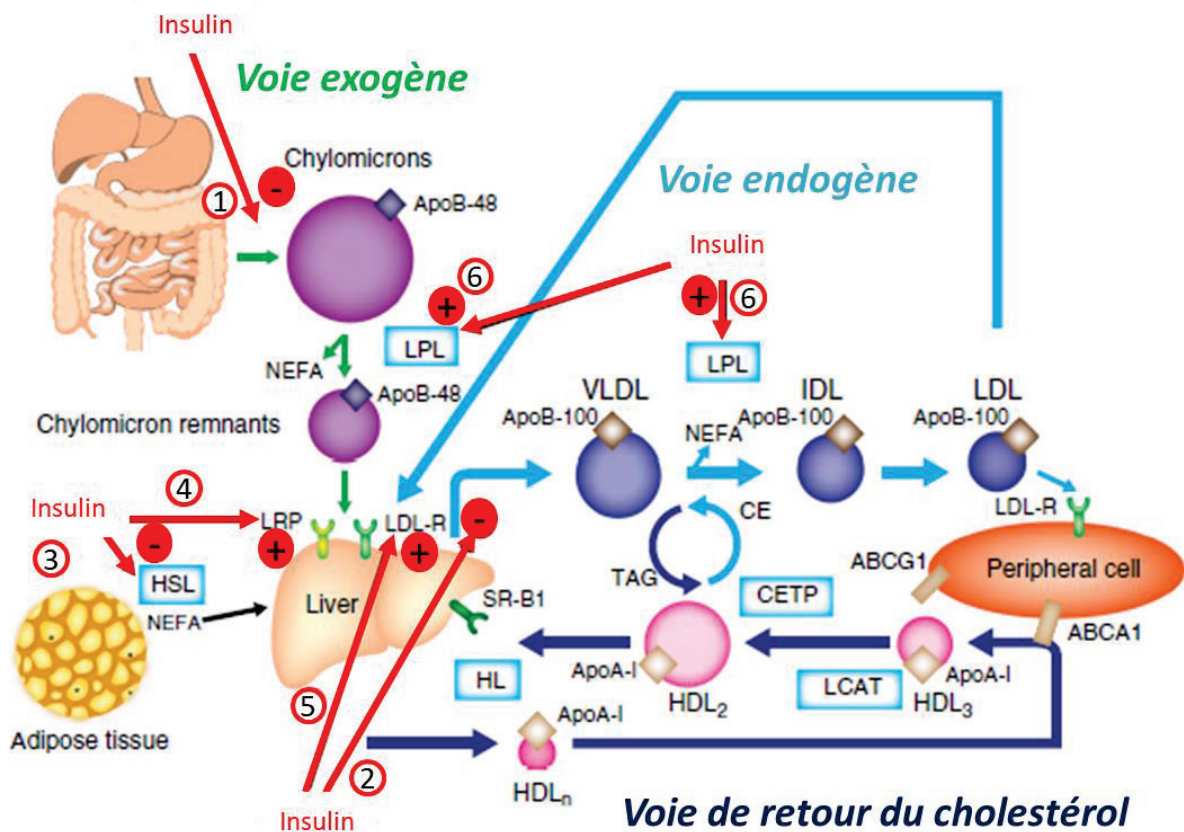


Figure 13 : Représentation générale du métabolisme des lipides et des effets de l'insuline

La voie exogène : Les lipides contenus dans le bol alimentaire sont absorbés par les entérocytes puis libérés dans le sang et associés aux apolipoprotéines ApoB-48 pour former les chylomicrons. La lipoprotéine lipase (LPL) exprimée par les cellules endothéliales hydrolyse les chylomicrons et libère des acides gras libres (NEFA : non esterified fatty acids). Les chylomicrons « remnants » qui en résultent sont captés par le foie via le LDL-R (LDL-receptor) et le LRP (LDL receptor-related protein).

La voie endogène : Dans le foie, la synthèse des VLDL (very low density lipoprotein) correspond à l'association de l'apolipoprotéine ApoB-100 aux chylomicrons « remnants » issus de la lipolyse du tissu adipeux, et du cholestérol libre, qui seront ensuite libérés dans le sang. Ensuite, de la même façon que pour les chylomicrons, les triglycérides (TAG: triacylglycerol) contenus dans les VLDL sont hydrolysés par la LPL. Il existe ensuite des échanges de lipides entre les VLDL et les HDL (high density lipoprotein), qui aboutissent à la formation des IDL (intermediate density lipoprotein) qui seront pour la plupart convertis en LDL (low density lipoprotein).

La voie de retour du cholestérol : Le foie et l'intestin synthétisent et libèrent les HDL_n dans la circulation sanguine. Rapidement, en se fixant sur le transporteur ABCA1 (ATP-binding cassette protein 1) exprimé par les cellules périphériques, les HDL₃ se chargent en cholestérol non estérifié et en phospholipides. Puis les HDL₂ sont obtenus après estérification du cholestérol (CE: cholesterol ester) contenu dans les HDL₃, et le transfert des TAG provenant des VLDL. Pour finir, les HDL retournent au foie.

L'insuline : (1) diminue le flux intra-portal de lipides allant au foie, (2) inhibe la production de VLDL, (3) diminue la lipolyse en inhibant la lipase HSL (hormone sensitive lipase) dans le tissu adipeux, (4) augmente l'expression de LRP (5) augmente l'expression du récepteur au LDL et (6) active la LPL.

Abréviations: ABCA1 (ATP-binding cassette A1), CETP (cholesteryl ester transfer protein), LCAT (lécithine-cholestérol acyltransférase), SR-B1 (Scavenger receptor class B type 1).

Ensuite, de la même façon que pour les chylomicrons, les triglycérides contenus dans les VLDL sont hydrolysés par la LPL, libérant des acides gras libres qui pourront être utilisés comme source d'énergie ou stockés dans le tissu adipeux. La perte progressive des triglycérides contenus dans les VLDL conduit au transfert d'une partie des apolipoprotéines (dont l'ApoC et l'ApoE) et des phospholipides vers les HDL (impliqués dans la voie de retour de cholestérol), afin de former les IDL (328). La plupart des IDL sont convertis en LDL grâce à une lipolyse supplémentaire qui implique les lipases hépatiques (dégradation des triglycérides et phospholipides). Les IDL restants sont éliminés par le foie grâce aux récepteurs LRP et LDL-R qui en reconnaissant l'ApoE, entraîne leur internalisation (316,319).

Le LDL, souvent décrit comme le « mauvais cholestérol », est le transporteur principal du cholestérol dans le sang. Il est composé d'un cœur de cholestérol estérifié entouré d'une enveloppe de phospholipides, de cholestérol non-estérifié et d'ApoB100. La fixation du LDL sur son récepteur présent à la surface des cellules entraîne son endocytose et sa dégradation par les enzymes lysosomales permettant ainsi la libération du cholestérol.

L'insuline favorise le catabolisme des lipoprotéines riches en triglycérides comme les VLDL en activant la LPL et en inhibant l'expression de l'ApoC-III (inhibiteur de la LPL) (318,329). De plus, l'insuline augmente indirectement le captage et la clairance des chylomicrons « remnants » en induisant la translocation du récepteur LRP à la membrane plasmique des hépatocytes (330). Finalement, l'insuline augmente la clairance des LDL en augmentant l'expression et l'activité des récepteurs au LDL (331).

c. La voie de retour du cholestérol

La voie de retour du cholestérol implique le HDL cholestérol, qui de par sa fonction de récupération du cholestérol contenu dans les cellules périphériques, est souvent décrit comme le « bon cholestérol ». Le foie et l'intestin synthétisent et libèrent les HDL dans la circulation sanguine qui ne contiennent à ce stade que des apolipoprotéines et dont la principale est l'Apo-A-I. Rapidement, au contact des cellules périphériques, les HDL vont se charger en cholestérol non estérifié et en phospholipides provenant du cytoplasme cellulaire grâce à la fixation de l'Apo-A-I sur le transporteur ABCA1 (ATP-binding cassette protein 1) (332). Enfin, le cholestérol contenu dans les particules de HDL est estérifié par la LCAT (lecithin-cholesterol acyltransferase).

Le cholestérol contenu dans les HDL retourne au foie par deux voies majoritaire : la voie directe permet au cholestérol estérifié d'être directement capté, puis hydrolysé par le foie

grâce au récepteur SR-B1 (scavenger receptor B1) et la voie indirecte qui met en jeu des échanges de lipides entre les différentes particules de lipoprotéines (**Figure 13**). En effet, il existe des échanges entre les HDL, les VLDL et les LDL cholestérol qui impliquent des protéines de transfert comme la CETP (cholesteryl ester transfer protein) et la PLTP (phospholipid transfer protein). La CETP est à la fois impliquée dans le transfert du cholestérol estérifié des HDL vers les VLDL, et du passage des triglycérides des VLDL vers les HDL. La PLTP est impliquée dans le transfert des lipides des VLDL vers les HDL. Ces échanges de lipides permettent d'enrichir les HDL en triglycérides et en phospholipides qui pourront être hydrolysés par les lipases hépatiques. Les particules de HDL appauvries en lipides pourront alors de nouveau être impliquées dans la voie de retour du cholestérol.

3. Devenir des protéines alimentaires

Dans l'estomac et l'intestin grêle, les protéines alimentaires sont successivement digérées en acides aminés qui sont des molécules composées d'une fonction acide carboxylique et d'une fonction amine. L'alimentation permet d'apporter les 9 acides aminés essentiels chez l'homme (tryptophane, lysine, méthionine, phénylalanine, thréonine, valine, leucine, isoleucine et l'histidine) qui ne peuvent pas être synthétisés par l'organisme.

Contrairement aux glucides et aux lipides, les acides aminés ne peuvent pas être stockés et le groupement amine doit être retiré du reste du squelette carboné par désamination ou transamination. La désamination consiste en la dissociation de la fonction amine par les désaminases alors que la transamination consiste à échanger une fonction amine entre un acide α -aminé et un α -cétoacide grâce à des aminotransférases. La fonction amine libérée à partir de l'acide aminé est convertie en ammoniac qui sera transformé en urée ou en acide urique via le cycle de l'urée et excrétés dans les urines. Dans d'autres cas, l'ion ammonium peut être recyclé pour la synthèse d'un autre acide aminé (333). Une fois la fonction amine enlevée ou déplacée, le squelette carboné peut intervenir dans la synthèse de plusieurs classes de composés organiques : peptides, glucides ou acides gras. On parle alors d'acides aminés protéinogènes, glucoformateurs et céto-gènes.

Dans le cas des acides aminés protéinogènes, le squelette carboné peut conduire à la formation d'un nouvel acide aminé, et par conséquent à la synthèse de peptides et protéines. Les acides aminés glucoformateurs permettent d'obtenir des glucides nécessaires au maintien de l'homéostasie énergétique au cours du jeûne par la voie de la néoglucogenèse dans trois organes : le foie, les reins et l'intestin. Pour finir, les acides aminés céto-gènes sont transformés

en acétyl-CoA, puis en corps cétoniques, au même titre que les acides gras issus de la β -oxydation dans des conditions de jeûne prolongé.

Grâce à la circulation portale et à l'expression de nombreuses enzymes clés du métabolisme des acides aminés, le foie est le site majoritaire de captage et de transformation des acides aminés absorbés. En effet, le catabolisme des acides aminés commence dans le foie mais fait également intervenir différents organes tels que l'intestin, le muscle, ou encore les reins (333,334). Outre son rôle dans l'absorption des acides aminés, l'intestin est capable de les métaboliser et de les utiliser comme source d'énergie. Plus précisément, l'intestin utilise la glutamine libérée par la protéolyse musculaire comme source d'énergie et comme substrat néoglucogénique au cours du jeûne (335–337).

Les repas stimulent l'anabolisme en inhibant la protéolyse et en activant la synthèse protéique (338). La stimulation de la synthèse protéique dans le muscle, qui est principalement régulée par l'action combinée de l'insuline et des acides aminés, intervient rapidement après un repas (338–342). De plus, ces effets sont potentialisés par l'augmentation des glucocorticoïdes après le repas (343). La régulation de la synthèse protéique par l'insuline implique la voie IRS/PI3K (344).

II. Maintien de l'homéostasie énergétique au cours du jeûne

Au cours du jeûne, l'organisme va chercher à mobiliser ses réserves. Or, le maintien de la glycémie entre 0,9-1 g/L est une condition essentielle pour le maintien des fonctions métaboliques et le fonctionnement optimal de certains organes, dont le cerveau. La plupart des mammifères, y compris les humains sont incapables de tolérer des épisodes d'hypoglycémie supérieurs à quelques minutes, au risque d'induire des dommages cellulaires irréversible. Au contraire, une hyperglycémie peut conduire à l'installation d'une insulino-résistance voir au développement du diabète de type 2 (DT2). En dehors des périodes de repas, plusieurs mécanismes se mettent en place afin de garantir l'homéostasie énergétique. Parmi les mécanismes mis en place au cours du jeûne, la production endogène de glucose (PEG), et plus précisément la glycogénolyse est la première à se mettre en place. Ensuite la néoglucogenèse, la lipolyse adipocytaire et la protéolyse musculaire se mettent en place.

Pendant les périodes de jeûne le glucose n'est pas la seule source d'énergie. En effet, les corps cétoniques sont essentiels pour le fonctionnement de plusieurs organes, tels que le cerveau, les reins, l'intestin et le cœur (279,345–347). Ainsi, pendant le jeûne, l'utilisation du glucose en tant que source d'énergie et son renouvellement global sont réduits afin de le

préserver pour fournir des squelettes à 3 carbones nécessaires à la synthèse des nucléotides et la duplication chromosomique (pour revue (279)).

1. La production endogène de glucose

a. Généralités

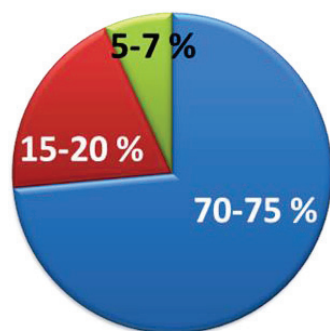
La production endogène de glucose permet de maintenir la glycémie stable entre les repas et pendant les périodes de jeûne. Elle implique deux voies métaboliques, la glycogénolyse et la néoglucogenèse.

Le foie, les reins et l'intestin sont les trois organes capables de produire et de libérer du glucose dans la circulation sanguine car ils sont les seuls à exprimer la glucose-6-phosphatase (G6Pase). Cette enzyme est composée de deux sous unités localisées dans la membrane du RE: une sous unité catalytique (G6PC) qui catalyse la transformation du G6P en glucose et phosphate inorganique et une sous-unité transportrice (G6PT) qui permet le transport du G6P le cytosol vers la lumière du RE (348).

En période post-absorptif (6 et 12h de jeûne chez la souris et chez l'homme, respectivement), le foie est le principal tissu producteur de glucose. En effet, sa production représente 70-75% de la production totale glucose alors que celle des reins et de l'intestin correspondent à environ 15-20 % et 5-7 %, respectivement (279,345,349,350) (**Figure 14**).

Dans un premier temps, le foie est capable de produire du glucose par la glycogénolyse à partir de ses stocks de glycogène (351). Lorsqu'un jeûne se prolonge, le foie produit du glucose *via* la néoglucogenèse, à partir du lactate (issu du métabolisme anaérobie et oxydé en pyruvate), des acides aminés glucoformateurs issus de la protéolyse musculaire (tels que l'alanine, la glycine et la thréonine), ou encore à partir du glycérol issu de la lipolyse des triglycérides du tissu adipeux. Si le jeûne perdure entre 24-48h chez le rat, la participation du foie à la PEG chute jusqu'à atteindre environ 20-25%, tandis que les reins et l'intestin assurent environ 50-55 % et 20%, respectivement, de la production de glucose totale (**Figure 14**) (279,350,352). Dans ces deux tissus, les stocks en glycogène sont négligeables et leur production de glucose est donc assurée exclusivement par la néoglucogenèse. La production de glucose extra-hépatique est essentielle pour le maintien de la glycémie lors de jeûnes prolongés puisque les souris invalidées pour la G6Pase hépatique maintiennent leur glycémie au cours d'un jeûne long grâce à l'induction de la production de glucose par les reins et l'intestin (353).

Etat post-absorptif
(6h sans nourriture)



■ Foie

■ Reins

■ Intestin

Au cours du jeûne
(24-48h)

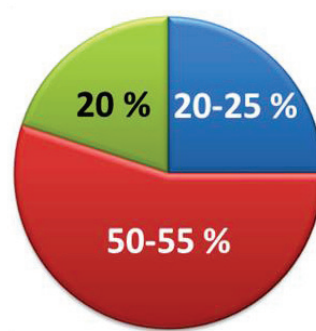


Figure 14 : Estimation de la participation des trois organes néoglucogéniques dans la production endogène de glucose totale selon l'état nutritionnel chez le rat.

Pendant la période post-absorptive, le foie est le principal producteur de glucose, néanmoins au cours du jeûne sa participation diminue au profit d'une augmentation de la production de glucose par les reins et l'intestin

Adapté de Soty et al., 2017.

Il est à noter que l'absence de PEG peut être fatale chez les patients atteints de glycogénoses de type I, qui sont des maladies métaboliques associées à un déficit en G6Pase. Plus précisément, une mutation du gène *G6pc* ou *G6pt*, entraîne une glycogénose de type 1a ou de type 1b, respectivement. Ces glycogénoses se caractérisent par des hypoglycémies sévères lors d'un jeûne court et nécessitant une prise en charge nutritionnelle très stricte jour et nuit par l'apport de sucres lents pour maintenir la glycémie. De plus, ces patients développent une hépatomégalie et des complications métaboliques telles que la stéatose hépatique et la maladie chronique rénale. L'ensemble de ces troubles métaboliques conduisent très souvent à l'apparition de tumeurs hépatiques et rénales (354,355).

b. La glycogénolyse

La glycogénolyse permet la production de glucose à partir de la dégradation du glycogène stocké dans le foie. Le muscle n'exprimant pas la G6Pase, le glycogène musculaire ne participe pas à la régulation de la glycémie mais est utilisé localement *via* la voie de la glycolyse pour fournir l'énergie nécessaire lors d'un effort musculaire.

Au cours du jeûne, la fixation du glucagon sur son récepteur couplé aux protéines G entraîne l'augmentation de la concentration intracellulaire d'AMPc, qui active successivement la PKA, la phosphorylase kinase et enfin la glycogène phosphorylase qui est responsable de la libération de glucose-1-phosphate (**Figure 8**). Sous l'effet de la phosphoglucomutase, le glucose-1-phosphate est transformé en G6P qui va ensuite être déphosphorylé et ainsi transformé en glucose par la G6Pase afin d'être libéré dans la circulation sanguine via le transporteur GLUT2.

Le glycogène est une source d'énergie rapidement mobilisable. Néanmoins les stocks sont rapidement épuisés, environ après 12h et 24-48h de jeûne chez la souris et chez l'homme, respectivement. Au-delà, le maintien de la glycémie est assuré par la néoglucogenèse.

c. La néoglucogenèse

La néoglucogenèse correspond à la synthèse *de novo* de glucose à partir de composés non glucidiques tels que le pyruvate, le lactate, les acides aminés glucoformateurs et le glycérol. Néanmoins, il existe des substrats préférentiels en fonction du métabolisme de chacun des trois organes néoglucogéniques. En effet, les principaux substrats de la néoglucogenèse hépatique (PHG) sont l'alanine, le lactate et le glycérol, alors que les reins utilisent préférentiellement la glutamine, le lactate et l'alanine (356,357) (**Figure 15**). L'intestin utilise principalement la glutamine, et dans une moindre mesure le glycérol comme substrat de la néoglucogenèse (358).

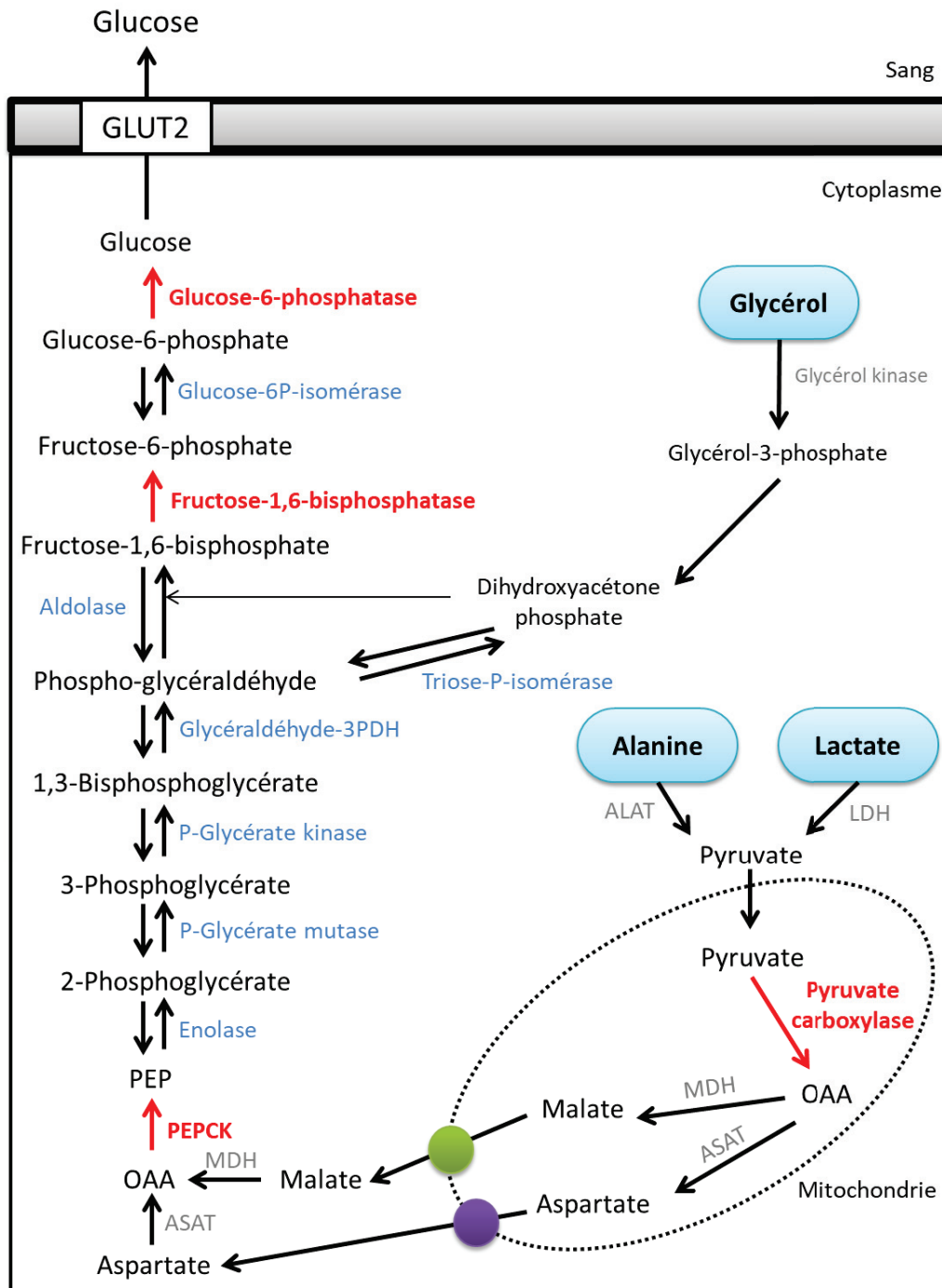


Figure 15 : La néoglucogénèse hépatique à partir du lactate, de l'alanine et du glycérol

Les enzymes notées en bleu sont communes à la glycolyse et à la néoglucogénèse. Les enzymes spécifiques de la néoglucogénèse sont notées en rouge.

L'alanine et le lactate sont transformés en pyruvate afin d'intégrer la néoglucogénèse. Le glycérol s'insère dans la voie de la néoglucogénèse via le DHAP (dihydroacétone phosphate). Il est classiquement admis que le glucose produit est libéré dans la circulation sanguine par le transporteur GLUT2.

Légende: PEP (phosphoenolpyruvate), OAA (oxaloacétate), ALAT (alanine transaminase), LDH (lactate deshydrogénase), MDH (malate deshydrogénase), ASAT (Aspartate aminotransférase).

● Transporteur de dicarboxylase ● Transporteur aspartate glutamate (cas de la néoglucogénèse à partir du lactate).

La glutamine est l'acide aminé plasmatique le plus abondant et est considérée comme un précurseur néoglucogénique clé pour le rein et l'intestin qui expriment une glutaminase ayant une haute affinité pour la glutamine. En revanche le foie qui exprime une glutaminase de faible affinité pour la glutamine est incapable d'utiliser cet acide aminé comme substrat néoglucogénique (pour revue (359)). De façon intéressante, la néoglucogénèse intestinale (NGI) permet de produire de l'alanine et du lactate, qui peuvent être ensuite utilisés par le foie (357,360).

Certaines enzymes impliquées dans la néoglucogénèse sont communes à la glycolyse car elles sont capables de fonctionner dans les deux sens. Cependant, quatre d'entre-elles sont spécifiques et représentent donc des points clés de régulation. Elles permettent de réaliser les trois étapes irréversibles de la néoglucogénèse (**Figure 15**). Dans l'ordre, on retrouve la transformation du pyruvate en phosphoénolpyruvate qui fait intervenir successivement la pyruvate carboxylase dans la mitochondrie et la phosphoénolpyruvate carboxykinase cytosolique (PEPCK-c) dans le cytoplasme, puis, la transformation du fructose-1,6-bisphosphate en fructose-6-phosphate par la fructose-1,6-bisphosphatase et enfin, la transformation du G6P en glucose par la G6Pase (**Figure 15**). La pyruvate carboxylase catalyse la formation d'oxaloacétate à partir de pyruvate dans la mitochondrie.

La pyruvate carboxylase, la PEPCK-c et la fructose-1,6-bisphosphatase sont exprimées dans de nombreux tissus, alors que l'expression de la G6Pase est restreinte à trois organes : le foie, les reins et l'intestin, et leur confère la capacité de produire et de libérer du glucose dans la circulation sanguine (361).

d. Régulation de la production endogène de glucose

La production endogène de glucose est inhibée à l'état nourri par l'insuline, et est activée au cours du jeûne par le glucagon, les catécholamines (adrénaline et noradrénaline), et des corticostéroïdes notamment.

L'augmentation de l'insulinémie post-prandiale va entraîner une diminution de la concentration plasmatique de glucose en induisant son captage par les tissus et en inhibant la PEG. Dans le foie, l'insuline, d'une part, stimule la synthèse et réduit la dégradation du glycogène et d'autre part, inhibe la néoglucogénèse. En effet, à court terme, l'insuline agit très rapidement en augmentant les flux métaboliques à travers la glycolyse. Plus précisément, l'insuline active le complexe enzymatique phosphofructokinase 2 / fructose-2,6-bisphosphatase qui catalyse la synthèse du fructose-2,6-bisphosphate, un activateur allostérique de la

phosphofructokinase 1. Ceci augmente donc le flux à travers la glycolyse au détriment de la voie néoglucogénique (362). A plus long terme, l'insuline contrôle la néoglucogenèse en diminuant la transcription des gènes codant pour la PEPCK-c et la G6PC. Plus précisément, l'activation de la voie de signalisation de l'insuline entraîne la phosphorylation de la protéine Akt (Ser473) qui va elle-même phosphoryler le facteur de transcription FoxO1 (Forkhead box) (Thr24) afin de l'inactiver par exclusion nucléaire (361,363–365). Une fois dans le cytoplasme, FoxO1 est dégradé par le protéasome (366). Par ailleurs, la phosphorylation de FoxO1 par Akt provoque des modifications de son domaine de liaison à l'ADN, et réduit ainsi sa capacité à se fixer sur les éléments de réponse à l'insuline (IRE) (367–372). D'autre part, l'insuline diminue l'activité de la G6Pase mais également la transcription et l'activité de la fructose-1,6-bisphosphatase (373–376).

Les trois tissus néoglucogéniques sont sensibles à l'insuline (361,377). Dans les situations où les taux d'insuline sont bas, comme dans le jeûne prolongé ou encore le diabète induit par destruction des cellules β pancréatiques, on observe une augmentation de la production de glucose par l'intestin associée à une augmentation de l'expression de la G6PC et de la PEPCK-c (358,360).

L'insuline régule également la PEG en modulant la disponibilité en substrats néoglucogéniques. En effet, l'insuline réduit l'approvisionnement du foie en acides gras libres et en glycérol provenant du tissu adipeux et en acides aminés glucoformateurs en provenance des muscles (alanine notamment) (378,379). Par ailleurs, l'insuline a la capacité d'inhiber la PEG en diminuant la libération de glucagon, qui a pour fonction principale de stimuler la PHG, en induisant l'activité de la G6Pase à court terme (380–384). La fixation du glucagon sur son récepteur se traduit par une augmentation de l'AMPc et l'activation de la PKA, qui d'une part, active la fructose-1,6-bisphosphatase, et d'autre part, phosphoryle le facteur de transcription CREB. Ce dernier active ensuite d'autres facteurs de transcription, dont HNF4 (hepatic nuclear factor 4) et C/EBP (CAAT/enhancer binding protein) afin d'induire la transcription du gène *G6pc* (353,375,385–387).

Le système nerveux, et notamment la balance entre l'activité du système nerveux sympathique (SNS) et parasympathique (SNP), est également impliqué dans la régulation de la PEG par l'intermédiaire des catécholamines synthétisées à partir de la tyrosine. En effet, le SNS contrôle la libération de noradrénaline par les terminaisons nerveuses, et la sécrétion d'adrénaline par les glandes surrénales. Ces deux catécholamines exercent leurs effets en tant

que neurotransmetteur ou hormone, respectivement, grâce à leur fixation sur des récepteurs transmembranaires α et β adrénergiques (ADR α et β). Lors d'une hypoglycémie induite par l'insuline, l'augmentation d'adrénaline circulante est responsable de l'augmentation de la PEG en stimulant l'activité de la G6Pase hépatique (388). De plus, l'effet activateur de l'adrénaline sur la PEG est potentialisé par sa capacité à inhiber la sécrétion d'insuline et à induire la libération de glucagon (389). Par ailleurs, l'activation de la voie de signalisation de l'insuline dans l'hypothalamus régule la PHG en modulant le tonus sympathique/parasympathique au niveau du foie et du tissu adipeux (pour revue (390)). Plus précisément, la fixation de l'insuline sur ses récepteurs au niveau des neurones AgRP du noyau arqué inhibe la PHG par l'activation des fibres vagues parasympathiques innervant le foie (391,392). Ainsi, l'activation du SNS joue un rôle important dans l'induction de la glycogénolyse, et donc de la PHG, en réponse à l'hypoglycémie (393,394). Au contraire, l'activation du SNP entraîne une baisse de la glycémie en diminuant la PHG et en activant la glycogène synthase au niveau du foie (395).

Les glucocorticoïdes, dont la cortisone et le cortisol, sont des molécules naturelles produites et sécrétées par les glandes surrénales. Suite à leur fixation, l'internalisation du complexe glucocorticoïdes-récepteur permet aux glucocorticoïdes de réguler la transcription des gènes codants pour la PEPCK-c et la G6PC. En effet, l'internalisation du complexe ligand-récepteur entraîne l'activation de facteurs de transcriptions tels que HNF3 β et 4 et C/EBP pour la régulation de l'expression de PEPCK-c, ou encore des facteurs de transcription FoxO, HNF-1 et CREB pour la régulation de l'expression de la G6Pase (396–401). Les effets des glucocorticoïdes sur la PHG apparaissent après plusieurs heures de jeûne, contrairement aux effets des catécholamines et du glucagon (402). Par ailleurs, les glucocorticoïdes inhibent le captage et l'utilisation du glucose par les cellules périphériques.

Les adipokines, des hormones libérées par le tissu adipeux telles que la leptine ou l'adiponectine, sont également capables de réguler le métabolisme glucidique en modulant la PEG notamment au niveau hépatique. La leptine est capable de réguler la PEG en modulant les flux de glucose dans le foie, sans modifier la production de glucose totale (390,403–406). En effet, la leptine augmente l'expression des gènes codant pour la G6PC et de la PEPCK-c mais diminue également la glycogénolyse dans le foie (403,405). Ces effets sont dépendants du système mélanocortinergique central et de l'AMPK- α 2 hépatique (403,407). L'adiponectine est capable de moduler la prise alimentaire et le métabolisme énergétique, dont la PEG. Chez l'homme, des taux circulants bas d'adiponectine sont associés à une insulino-résistance (408).

L'injection intraveineuse d'adiponectine diminue la PEG de 65% en réduisant de moitié l'expression hépatique de la PEPCK-c et de la G6PC, sans affecter le captage périphérique du glucose (409,410).

2. La lipolyse

Les lipides stockés dans le tissu adipeux représentent la source principale d'énergie de l'organisme. Au cours du jeûne, l'action combinée de la diminution du taux d'insuline plasmatique et de l'augmentation de la libération d'adrénaline et de noradrénaline active la lipolyse qui correspond à l'hydrolyse des triglycérides et à la libération d'acide gras libres et de glycérol dans la circulation (411). Une fois dans le sang, les acides gras libres rejoignent les tissus périphériques où ils servent de substrat à la β -oxydation. Le glycérol est utilisé comme substrat de la néoglucogenèse hépatique.

Les adipocytes sont les principales cellules capables de libérer des lipides dans le sang (412,413). En condition physiologique, la lipolyse est principalement assurée par le tissu adipeux, qui va mobiliser ses réserves lipidiques afin de fournir des substrats énergétiques aux autres cellules. En revanche, une augmentation de la formation et de la sécrétion de VLDL par le foie est associée à un contexte pathologique caractérisé par une stéatose hépatique (dans le cadre de l'obésité et du diabète), et conduit à des taux de triglycérides et de LDL plasmatiques élevés et de HDL bas (414). Ces modifications représentent des facteurs de risques de développement du syndrome métabolique et du DT2 (415).

a. La lipolyse du tissu adipeux

La lipolyse correspond à l'hydrolyse par des lipases d'une molécule de triglycéride en trois acides gras libres et un glycérol. Il existe trois lipases qui agissent l'une après l'autre afin d'obtenir une hydrolyse complète de chaque molécule de triglycéride (**Figure 16**). Dans un premier temps, les triglycérides sont hydrolysés en diacylglycérol (DAG) par l'ATGL (adipose triglyceride lipase), l'enzyme limitante de la lipolyse (416). Ensuite, l'enzyme HSL transforme le DAG en monoacylglycérol (MG), qui sera finalement hydrolysé par la monoglycéride lipase (MGL) afin de libérer du glycérol et des acides gras libres (417,418). Les acides gras libérés sont pris en charge par les protéines chaperonnes FABP4 et transportés vers la membrane plasmique de l'adipocyte afin d'être sécrétés dans le sang (419).

La lipolyse est régulée par les catécholamines dont les effets dépendent de leur affinité pour les isoformes α_2 et β des récepteurs adrénergiques (ADR β_1 , 2 et 3) exprimées à la surface des adipocytes (420–422). En effet, l'induction de la lipolyse dépend de l'activation des

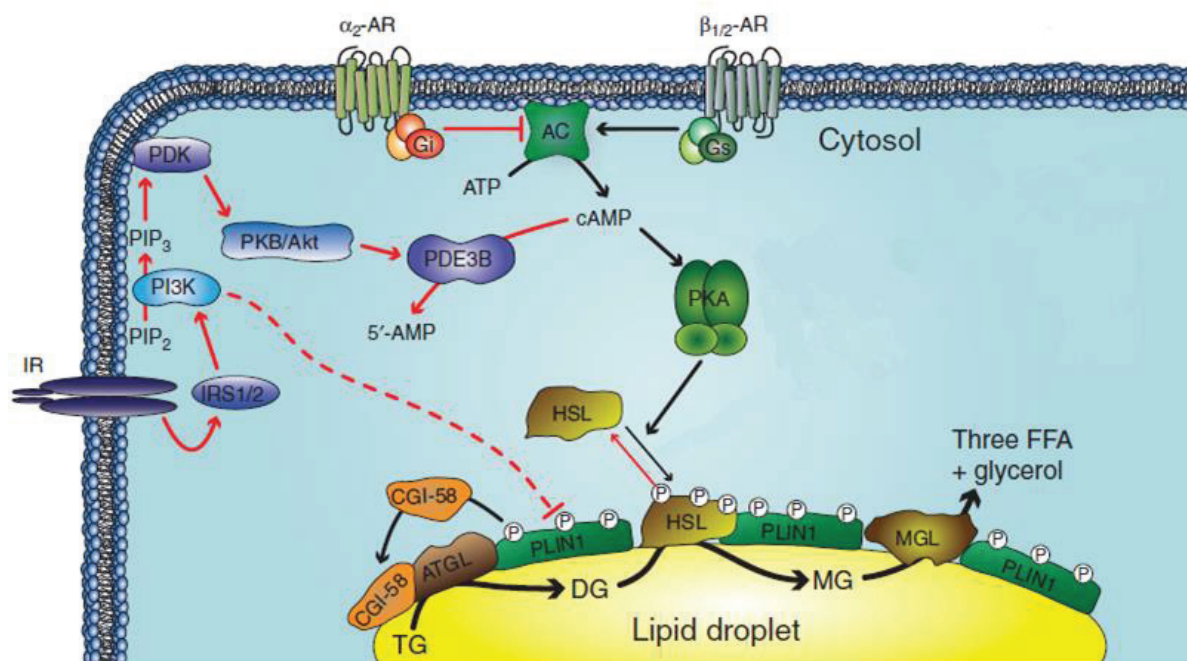


Figure 16 : Mécanismes de régulations de la lipolyse adipocytaire

L'induction de la lipolyse dépend de la phosphorylation de l'enzyme HSL (hormone-sensitve lipase) et de la périlipine-1 (PLIN1) par la PKA (proteine kinase A) suite à l'activation des récepteurs adrénergiques $\beta_{1/2}$ ($\beta_{1/2}$ -AR). La fixation de l'insuline sur son récepteur entraîne l'activation de la PDE3B ((phosphodiesterase 3B) qui est responsable de la conversion de l'AMPc en 5'-AMP, qui freine l'activation de la PKA, et par conséquent la lipolyse. Les effets de l'insuline passent également par une voie indépendante de la voie PI3K/Akt (pointillés rouges).

Abbréviations: AC (adenylyl cyclase), ATGL (adipose triglycerids lipase), CGI-58 (comparative gene identification-58), DG (diacylglycerol), FFA (free fatty acid), IR (insulin receptor), IRS1/2 (insulin récepteur substrate 1/2), MG (monoacylglycerol), MGL (monoglyceride lipase), PDK (phosphoinositide-dependent kinase), PI3K (phosphatidylinositol 3-kinase), PKB/Akt (protein kinase B), TG (triglycérides), α_2 -ARs (récepteurs adrénergiques α_2).

Adapté de Nielsen et al., 2014.

récepteurs adrénergiques β , alors que son inhibition dépend de l'activation des récepteurs adrénergiques α_2 (423,424). L'induction des récepteur ADR- β ou ADR- α_2 active ou inhibe, l'adénylate cyclase, respectivement (**Figure 16**) (423). Lorsque l'adénylate cyclase est activée, l'AMPc produit active la PKA, qui va ensuite phosphoryler la périlipine-1 (une protéine associée aux gouttelettes lipidiques) et la HSL cytoplasmique (425–427). La phosphorylation de la périlipine-1 provoque la libération et la dispersion de la protéine CGI-58 (Comparative Gene Identification-58) dans le cytoplasme, ce qui renforce l'activité des lipases du tissu adipeux, notamment de l'enzyme ATGL (428–430). De plus, la phosphorylation de la lipase HSL par la PKA provoque son activation et sa translocation du cytosol vers la surface des gouttelettes lipidiques où elle se fixe à la périlipine-1 phosphorylée afin d'accéder aux DAG produits par ATGL (431–433).

Les hormones pancréatiques, l'insuline et le glucagon jouent également un rôle important dans la régulation de la lipolyse. En effet, l'insuline est la principale hormone responsable de l'inhibition de la lipolyse (**Figure 16**) (434). Sa fixation sur son récepteur entraîne la phosphorylation d'Akt puis de la Phosphodiesterase 3 qui est responsable de la dégradation de l'AMPc en 5'-AMP (435). Ainsi, en diminuant la concentration d'AMPc intracellulaire, l'insuline empêche l'activation de la PKA induite par la stimulation des récepteurs ADR- $\beta_1/2$ et par conséquent inhibe la lipolyse. Par ailleurs, les effets de l'insuline sur la lipolyse pourraient impliquer un autre mécanisme encore mal identifié. En effet, l'insuline serait capable de réduire sélectivement la phosphorylation de la périlipine-1, sans modifier la phosphorylation d'HSL (**Figure 16**) (413). Par ailleurs, le glucagon, via l'activation de l'adénylate cyclase est également impliqué dans l'activation de la lipolyse.

b. La β -oxydation des acides gras

La β -oxydation des acides gras est un processus de dégradation des acides gras en acetyl-CoA qui serviront ensuite à produire de l'ATP via le cycle de Krebs et la chaîne respiratoire mitochondriale. Selon la taille des chaînes d'acides gras, la β -oxydation prend place dans les peroxysomes et/ou dans les mitochondries. En effet, les acides gras à très longue chaîne (supérieur à 18 carbones) sont catabolisés par la β -oxydation peroxysomale puis mitochondriale, tandis que les acides gras à courte et moyenne chaîne sont directement pris en charge par la mitochondrie.

Dans le cytosol, les acides gras sont conjugués avec le coenzyme A par l'acyl-CoA synthétase afin de former des acyl-CoA qui sont ensuite dirigés vers les mitochondries ou les

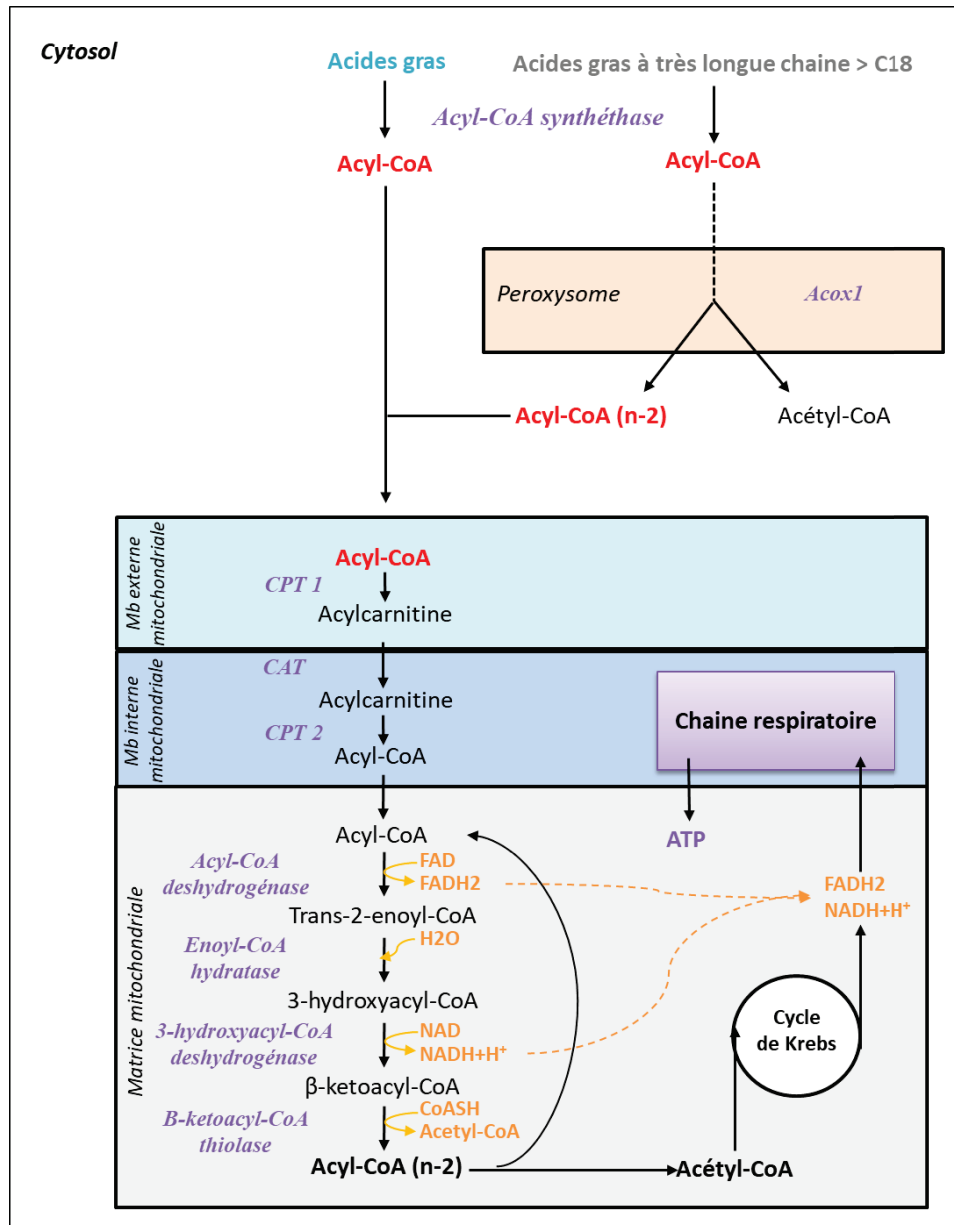


Figure 17 : Principales étapes de la production d'énergie à partir de la β -oxydation des acides gras

Dans le cytosol, les acides gras sont transformés en acyl-CoA qui sont ensuite dirigés vers les mitochondries ou les peroxysomes (>C18).

Dans les peroxysomes, la première enzyme impliquée est Acox1 (Peroxisomal acyl-coenzyme A oxidase 1) qui est responsable de la désaturation des acyl-CoA en 2-trans-énoyl-CoA. Dans la membrane externe mitochondriale, les acyl-CoA issus des peroxysomes ou des acides gras à courtes et moyennes chaînes sont transformés par la CPT1 (carnitine palmitoyltransferase 1) en acyl-carnitine qui est ensuite transporté par la CAT (carnitine translocase) vers la membrane interne mitochondriale. Ensuite, la CPT2 (carnitine palmitoyltransferase 2) transforme les molécules d'acyl-carnitine en acyl-CoA qui sont ensuite dirigées vers la voie de la β -oxydation dans la matrice mitochondriale.

Chaque boucle de β -oxydation mitochondriale permet d'obtenir un acyl-CoA auquel deux carbones ont été enlevés et qui réintègre la voie de la β -oxydation et un acétyl-CoA qui entre dans le cycle de Krebs pour y être oxydé et générer du NADH, H^+ (Nicotinamide adénine dinucléotide) et du FADH_2 (Flavine adénine dinucléotide). Les coenzymes produits par la β -oxydation et le cycle de Krebs sont ensuite utilisés par la chaîne respiratoire mitochondriale afin de produire de l'ATP (adénosine triphosphate).

peroxysomes selon leur taille. La β -oxydation dans les peroxysomes permet la libération d'acétyl-CoA et de molécules d'acyl-CoA raccourcis. La première étape de la β -oxydation dans les peroxysomes implique l'enzyme *Acox1* (Peroxisomal acyl-coenzyme A oxidase 1) qui catalyse la désaturation de l'acyl-CoA en 2-trans-énoyl-CoA (**Figure 17**). Au niveau de la membrane externe de la mitochondrie, les molécules d'acyl-coA sont transformées par la carnitine palmitoyltransferase 1 (CPT1) en acyl-carnitine qui est ensuite transporté par la carnitine translocase (CAT) vers la membrane interne (**Figure 17**). Cette dernière est ensuite transformée par la carnitine palmitoyltransferase 2 (CPT2) en acyl-CoA afin d'être dirigée vers la voie de la β -oxydation dans la matrice mitochondriale.

La β -oxydation mitochondriale est composée de quatre étapes impliquant successivement l'acyl-CoA deshydrogénase, l'énoyl-CoA hydratase, la 3-hydroxyacyl-CoA deshydrogénase et la β -ketoacyl-CoA thiolase (**Figure 17**). Ces enzymes catalysent des réactions qui libèrent du FADH_2 (Flavine adénine dinucléotide), du NADH,H^+ (Nicotinamide adénine dinucléotide) et de l'acétyl-CoA. Au terme de ces réactions, l'acyl-CoA auquel deux carbones ont été enlevés, réintègre la voie de la β -oxydation. L'acétyl-CoA libéré à chaque boucle de β -oxydation entre dans le cycle de Krebs où il est oxydé pour générer du NADH,H^+ et du FADH_2 . Les coenzymes produits par la β -oxydation et le cycle de Krebs sont ensuite utilisés par la chaîne respiratoire mitochondriale afin de produire de l'ATP.

L'expression des protéines impliquées dans la β -oxydation des acides gras est principalement régulée par les facteurs de transcription PPAR (peroxisome proliferator-activated receptors). Il existe trois isoformes de ces récepteurs nucléaires (PPAR α , PPAR γ et PPAR β / δ) qui présentent des spécificités tissulaires (436). En effet, alors que PPAR α est principalement exprimé dans les cellules hépatiques, intestinales, endothéliales, immunitaires et musculaires lisses, PPAR- δ/β est principalement exprimé dans les cellules musculaires squelettiques, les adipocytes, ou encore les macrophages (437). Les acides gras libres et leurs dérivés issus de la lipolyse adipocytaire sont des ligands naturels de PPAR α (438). Plus précisément, la fixation d'un ligand sur PPAR entraîne son hétérodimérisation avec RXR (retinoid X receptor). Ce complexe se fixe sur des séquences PRE (PPAR-responsive elements) localisées dans les régions promotrices des gènes cibles impliqués dans la β -oxydation et induit ainsi leur expression. Parmi l'ensemble des gènes régulés par PPAR, on retrouve *Acox1*, la première enzyme impliquée dans la β -oxydation peroxysomale (439).

D'autre part, le glucagon est également impliqué dans l'induction de la voie la β -oxydation et dans l'inhibition de la lipogenèse *de novo* via l'augmentation de l'expression des cofacteurs PGC1 (Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1) et de HES-1 (Hairy Enhancer of Split) par le facteur de transcription CREB (**Figure 12**) (440–442).

Lors d'un jeûne prolongé, les métabolites du cycle de Krebs, tel que l'oxaloacétate, sont utilisés comme substrats de la néoglucogenèse, et les acétyl-CoA issus de la β -oxydation sont dirigés vers le foie pour former des corps cétoniques, qui peuvent être utilisés comme source énergétique, notamment par les muscles et le cerveau.

3. La protéolyse

La protéolyse, notamment dans le muscle squelettique, est régulée par quatre voies qui mettent en jeu le système ubiquitine-protéasome, l'autophagie lysosomale, les calpaïnes dépendantes du calcium, et les caspases (443). La contribution de chaque voie dépend de différents facteurs, comme l'apport en acides aminés, le statut énergétique ou encore les hormones pancréatiques (444–446).

Le système ubiquitine-protéasome met en jeu une cascade enzymatique impliquant les enzymes E1 (ubiquitin-activating enzyme), E2 (ubiquitin conjugating enzymes) et E3 (ubiquitin ligases). L'enzyme E1 utilise l'ATP pour former une liaison thiol-ester avec l'ubiquitine (447). Les enzymes E2 et E3 participent au transfert des molécules d'ubiquitine activées sur des substrats protéiques afin de former des chaînes de poly-ubiquitine. Ces dernières sont ensuite reconnues par le protéasome 26S qui dégrade le substrat protéique en petits peptides et acides aminés (447). Le transfert irréversible d'une ubiquitine activée sur le substrat protéique par E2 est une étape limitante de la protéolyse et représente par conséquent une cible de régulation importante (448). A cette étape, l'insuline est capable à la fois de diminuer l'expression du gène codant pour E2 et la formation des complexes d'ubiquitine (449). Un déficit énergétique est également capable d'augmenter l'expression de la sous-unité α du protéasome 26S (450)

L'autophagie lysosomale impliquée dans la protéolyse met en jeu deux voies : la macro-autophagie et l'autophagie médiée par des chaperonnes qui sont activées par un jeûne court ou prolongé, respectivement (451–454). La macro-autophagie est un processus qui permet de dégrader les protéines en mettant en jeu un phagophore qui fusionne avec les lysosomes afin de former un autophagosome puis un autolysosome. L'autophagie implique des protéines chaperonnes cytosoliques qui fixent des substrats protéiques pour les adresser aux lysosomes où ils sont transloqués afin d'y être dégradés en petits peptides et acides aminés.

L'activation des calpaïnes dépendantes du calcium participe également à la protéolyse musculaire puisque la calpaïne 3 est fortement exprimée dans le muscle squelettique (455,456). Les calpaïnes ont une capacité limitée de dégradation des substrats protéiques intramusculaires complexes. Bien que les mécanismes d'action restent encore mal connus, il semblerait que les calpaïnes contribuent à la protéolyse musculaire en coupant les protéines myofibrillaires en fragments d'actomyosine plus petits qui seront ensuite pris en charge par le système ubiquitine-protéasome (457,458).

Les caspases sont également impliquées dans la protéolyse dans les muscles squelettiques (459). Pour exemple, la caspase-3 qui est activée par la caspase-9, initie la dégradation des protéines en clivant les protéines myofibrillaires en fragments plus petits qui seront pris en charge par le système ubiquitine-protéasome (459).

La protéolyse est régulée par les hormones (telle que l'insuline) et les nutriments (en particulier les acides aminés). Pour exemple, l'inhibition de la protéolyse lysosomale dans le foie et dans le muscle squelettique à la suite d'un repas est dépendante de l'insuline et/ou des acides aminés (460,461). Par ailleurs, la protéolyse est activée dans le cadre de nombreuses situations de stress tels que l'excès ou le manque de nutriment (451,462). Plus précisément, l'insuline inhibe *in vitro* la protéolyse musculaire en activant la voie IP3K/Akt et p70S6K (Ribosomal protein S6 kinase β -1) (463). De plus, la phosphorylation des protéasomes 20S et 19S par Akt à la suite d'un repas, conduit à l'inactivation du système ubiquitine-protéasome (449). Au contraire, un déficit énergétique à court terme entraîne une diminution de la phosphorylation d'Akt dans le muscle. Cela se traduit par une augmentation de l'expression des facteurs de transcription de la famille FoxO qui induisent alors la transcription d'ubiquitines ligases impliquées dans la protéolyse musculaire (464–467). De plus, le facteur de transcription FoxO3 est impliqué dans le contrôle de l'expression des gènes de l'autophagie dont LC3 (Microtubule-associated proteins 1A/1B light chain 3B) et BNIP3 (BCL2/adenovirus E1B 19 kDa protein-interacting protein 3) (468).

Les taux d'acides aminés ont également un rôle important dans la régulation de la protéolyse. En effet, la privation en acides aminés de myotubes en cultures (cellules C2C12) induit la protéolyse en impliquant la voie de signalisation de la PI3K (444). Les acides aminés libérés au cours du jeûne via la protéolyse vont permettre de fournir l'énergie nécessaire au bon fonctionnement cellulaire, en fournissant des substrats pour la néoglucogenèse (hépatique, intestinale et rénale) ou encore pour la cétogenèse.

III. La dépense énergétique

La dépense d'énergie, au même titre que la prise alimentaire est un composant majeur dans le maintien de la balance énergétique. Sa régulation est donc un enjeu majeur dans la prévention des maladies métaboliques comme l'obésité.

1. Les différents postes de dépense d'énergie

La dépense énergétique totale est la somme de plusieurs postes de dépense d'énergie: le métabolisme de base, la thermogenèse alimentaire, l'activité physique, ou encore la thermorégulation (469,470).

a. Le métabolisme de base

Le métabolisme de base est un processus physiologique clé qui correspond à l'énergie dépensée pour maintenir la survie, la croissance, et la reproduction d'un organisme. Il est le principal poste de dépense d'énergie puisqu'il représente environ 60 à 80% de la dépense énergétique totale (470–472). Chez l'homme, le métabolisme de base est déterminé par calorimétrie indirecte en mesurant le taux de consommation d'oxygène à neutralité thermique (20-25°C) chez un sujet éveillé, au repos et à jeûne depuis plus de 12 heures. Le métabolisme de base est dépendant de la taille, de la composition corporelle, de l'âge, du genre et de l'espèce. La surface et le volume corporel sont des paramètres importants dans sa détermination. De plus, des corrélations ont été mises en évidence entre le métabolisme de base et l'espérance de vie. Ainsi les gros animaux vivraient plus longtemps grâce à leur métabolisme de base plus bas, et inversement (473).

Le métabolisme de base est modulé par le statut nutritionnel d'un individu. En effet, pendant une période de restriction alimentaire, l'organisme tend à diminuer sa dépense énergétique en diminuant son métabolisme de base en réponse à la perte de poids (474–478). Ce phénomène d'adaptation métabolique rend les sujets plus à même à reprendre du poids au fil du temps et rend compte des difficultés rencontrées lors des régimes hypocaloriques ou des traitements amincissants (479–481).

b. La thermogenèse alimentaire

La thermogenèse alimentaire représente environ 10% de la dépense énergétique totale et correspond à l'ensemble de l'énergie dépensée pour digérer, absorber et stocker les nutriments contenus dans le bol alimentaire. Elle est dépendante de la consommation d'ATP par les entérocytes lors de l'absorption des nutriments mais également des processus

postprandiaux mis en place pour l'utilisation et le stockage de l'énergie absorbée (482). Bien qu'il ait été suggéré que l'obésité et l'insulino-résistance pourraient être associées à une diminution de la thermogénèse alimentaire, sa contribution dans le développement des maladies métaboliques est encore débattue en raison des difficultés de mesure (482–485).

La thermogénèse alimentaire varie principalement en fonction du contenu nutritionnel et énergétique du bol alimentaire. En effet, la thermogénèse alimentaire, qui est exprimée en pourcentage de la dépense énergétique totale, est déterminée selon si le repas ingéré est riche en : lipides (0 et 3 %), glucides (5 à 10 %), protéines (20 à 30 %), l'alcool (10 à 30 %) (486,487). Le SNP, par l'intermédiaire des récepteurs muscariniques, module l'effet thermique des nutriments administrés par voie orale, très probablement en régulant la vidange gastrique et le stockage des nutriments (482). Par ailleurs, la thermogénèse postprandiale dite « facultative », correspond à une dépense d'énergie supplémentaire qui est principalement induite par l'ingestion de glucose. Les mécanismes et les tissus impliqués dans ce processus ne sont pas encore clairement identifiés mais il semblerait que l'activation des récepteurs β -adrénergiques dans le muscle squelettique et le TAB chez la souris y jouent un rôle important (482).

c. L'activité physique

L'activité physique représente entre 15 et 30 % de la dépense énergétique totale selon les individus et est définie comme tout mouvement locomoteur résultant de la contraction des muscles squelettiques (488,489). L'inactivité physique est un facteur de risque de développement de nombreuses maladies chroniques, dont l'obésité et le diabète, et est considérée comme le quatrième facteur de risque de mortalité mondiale par l'organisation mondiale de la santé (OMS) (490). En effet, la dépense d'énergie dissipée lors d'une activité physique est le moyen le plus efficace pour maintenir une balance énergétique équilibrée et obtenir une diminution du poids stable à long terme (491–493)

Les principaux déterminants de l'activité physique sont les facteurs génétiques et environnementaux propres à chaque individu (environnement social, lieu de vie, histoire personnelle) (pour revue (494)). La régulation de l'activité physique implique de nombreux mécanismes qui mettent en jeu les systèmes nerveux, cardiovasculaires et musculaires. Le cerveau contrôle le comportement d'une personne face à l'activité physique en intégrant différents paramètres comme la motivation, le sentiment de récompense/sanction, ou encore la personnalité. Les capacités cardio-respiratoires quant à elles déterminent la durée et l'intensité de l'activité physique, mais peuvent également affecter la motivation. Finalement, la capacité

musculaire propre à chaque individu contrôle la performance. Tous ces facteurs peuvent interagir entre eux afin de déterminer le niveau d'activité physique d'un individu.

d. La thermorégulation

La thermorégulation est une fonction physiologique importante chez les espèces homéothermes comme les mammifères. La thermogénèse représente l'énergie dépensée pour la production de chaleur et fait intervenir deux processus, la thermogénèse avec ou sans frisson qui correspond à une contraction involontaire des muscles permettant de produire de la chaleur pour maintenir une température corporelle stable. De ce fait, la thermogénèse est importante dans la résistance au froid mais également dans le maintien de la balance énergétique et représente environ 10 % de la dépense énergétique totale. Les thermorécepteurs et les afférences sensorielles provenant de la peau informent les centres nerveux (notamment localisés dans l'hypothalamus) des variations de la température corporelle. Une fois ces informations intégrées au niveau central, la thermogénèse est induite dans deux tissus : le muscle squelettique et le TAB (495). Dans cette partie, seule la thermogénèse du muscle squelettique sera décrite, celle prenant place dans le TAB sera détaillée dans la partie suivante.

Le muscle squelettique est capable de réaliser de la thermogénèse avec ou sans frissons. L'existence d'une thermogénèse musculaire sans frisson et sa contribution dans la production de chaleur ont été démontrés chez le rongeur mais restent encore discutés chez d'autres mammifères (496–498). De plus, elle joue un rôle important, seule ou en synergie avec la thermogénèse du TAB dans des conditions de froid extrêmes (497–499).

La thermogénèse sans frissons dans le muscle est activée par la liaison de la sarcolipine à la pompe calcique SERCA (sarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase) localisée dans la membrane du réticulum sarcoplasmique. Ces pompes sont impliquées dans la recapture du calcium intracellulaire vers le réticulum sarcoplasmique et permettent ainsi la relaxation musculaire. Néanmoins, les pompes SERCA n'utilisent pas toujours toute l'énergie issue de l'hydrolyse de l'ATP pour pomper les ions Ca^{2+} et une partie peut être libérée sous forme de chaleur. Ainsi, le glissement du calcium sur les pompes SERCA crée un découplage de cette pompe via l'hydrolyse de l'ATP (500). Ce processus permet à la fois de produire de la chaleur via les pompes SERCA mais aussi de maintenir des taux cytosoliques de calcium élevés qui vont ensuite activer des voies qui régulent le métabolisme musculaire et l'activité mitochondriale (500).

De façon intéressante, la thermogénèse est capable de moduler le métabolisme de repos. En effet, lors d'une exposition au froid, plus la température à la surface de la peau est basse, plus la thermogénèse est activée, et plus elle augmente le métabolisme de base (495).

2. La thermogénèse sans frisson du tissu adipeux

La thermogénèse du tissu adipeux est un poste de dépense important, notamment dans la résistance au froid et le maintien de l'homéostasie énergétique. La thermogénèse sans frisson du tissu adipeux prend principalement place dans le TAB mais également dans une moindre mesure dans le tissu adipeux blanc. De façon intéressante, cette dépense d'énergie est modulable puisqu'elle est diminuée dans le cadre de l'obésité. De ce fait, la dépense d'énergie par le TAB notamment est une cible thérapeutique importante dans la prévention et la lutte contre l'obésité (501).

a. Les différents types d'adipocytes

Il existe différents types de tissus adipeux : le blanc, le beige et le brun, qui se caractérisent par leur fonction, leur morphologie et leur capacité à produire de la chaleur (502). Les différents adipocytes sont répartis dans l'organisme selon des territoires préférentiels. En effet, chez l'homme et le rongeur, il existe du TAB dans plusieurs régions dont la principale est la région inter-scapulaire (503–507). Chez la souris, le tissu adipeux blanc est localisé de manière diffuse mais principalement autour des gonades, des viscères ou sous la peau.

Les adipocytes blancs sont spécialisés dans le stockage des lipides, mais sont aussi impliqués dans la sécrétions d'adipokines capables d'influencer le métabolisme (508). Ils possèdent une gouttelette lipidique unique qui occupe la large majorité du cytoplasme et un nombre limité de mitochondries. Les adipocytes bruns et beiges produisent aussi des adipokines mais sont surtout impliqués dans la production de chaleur et l'oxydation des acides gras (509). Ils possèdent de multiples petites gouttelettes lipidiques et de nombreuses mitochondries qui leur confèrent la capacité d'être métaboliquement très actifs. Les adipocytes beiges, quant-à-eux, se développent dans le tissu adipeux blanc (principalement sous-cutané) en réponse à différents stimuli, comme une exposition au froid et présentent ainsi une morphologie et des caractéristiques intermédiaires entre les deux tissus adipeux, blanc et brun (510–512).

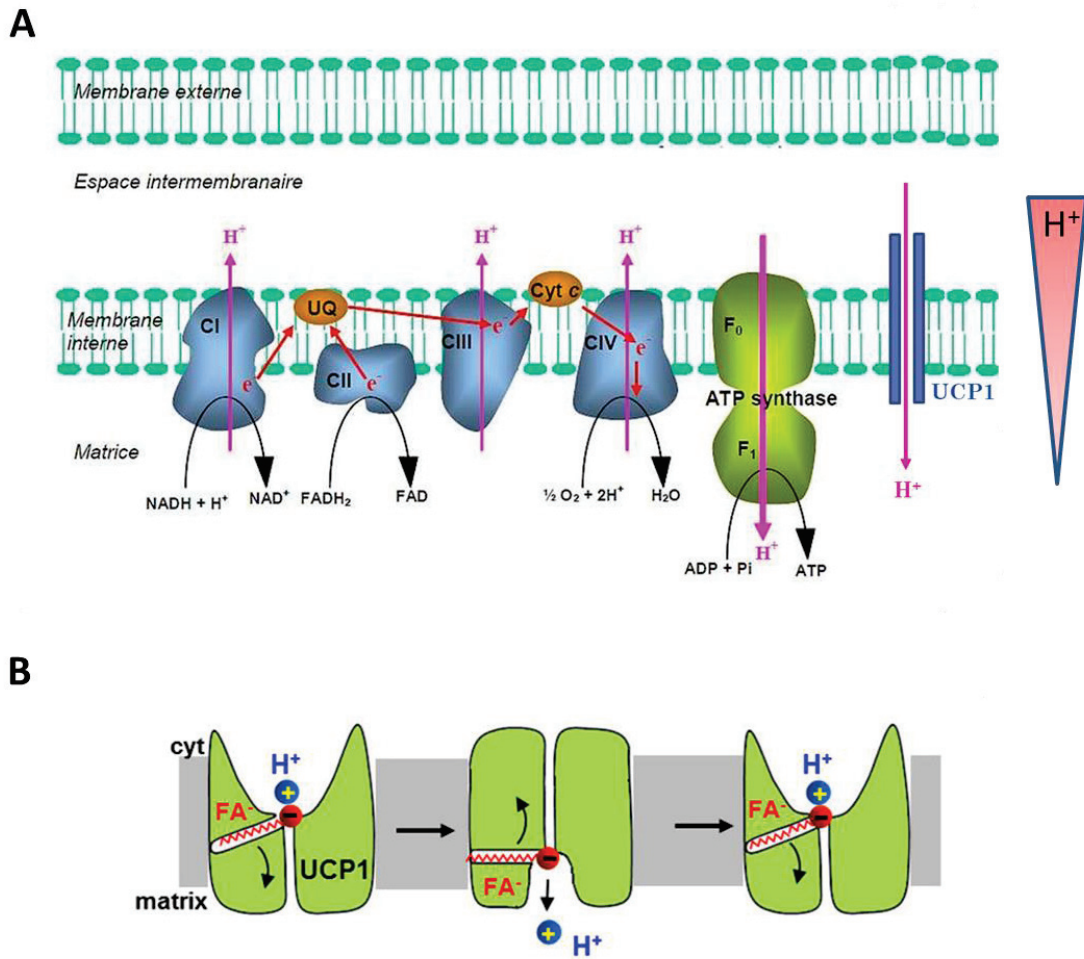


Figure 18 : Représentation schématique du découplage de la chaîne respiratoire mitochondriale (A) et de la production de chaleur par UCP1 (B)

(A) L'énergie générée lors du transport des électrons entre les différents complexes mitochondriaux permet de libérer des électrons dans l'espace intermembranaire mitochondrial, et crée ainsi un gradient électrochimique entre cet espace et la matrice mitochondriale qui est utilisé par l'ATP synthase afin de produire de l'ATP. Dans le tissu adipeux brun, l'oxydation des co-enzymes est découplée de la formation d'ATP grâce à la présence de la protéine découplante mitochondriale 1 (UCP1) qui augmente la conductance de la membrane mitochondriale interne afin de dissiper le gradient de proton sous forme de chaleur.

(B) L'interaction d'un anion d'acide gras avec UCP1 permet la fixation d'un H^+ et entraîne leur translocation dans la matrice mitochondriale. Ensuite, le H^+ est libéré tandis que l'anion d'acide gras reste associé à UCP1 qui revient à sa position initiale afin d'amorcer un nouveau cycle de translocation de H^+ .

Adapté de Bertholet and Kirichok, 2017

b. Les mécanismes impliqués dans la production de chaleur

La capacité thermogénique d'un tissu dépend du niveau d'expression d'UCP1 (uncoupling protein 1), une protéine découplante localisée dans la membrane mitochondriale interne (513–516).

Dans la chaîne respiratoire mitochondriale, l'oxydation des co-enzymes réduits (NADH et FADH₂) issus de la β -oxydation fournit des électrons qui vont être échangés entre les quatre complexes de la chaîne respiratoire (**Figures 18-A**). L'énergie générée lors de cet échange permet de libérer des protons dans l'espace intermembranaire mitochondrial, et crée ainsi un gradient électrochimique entre cet espace et la matrice mitochondriale qui est utilisé par l'ATP synthase afin de produire de l'ATP (517). Dans le TAB, l'oxydation des co-enzymes peut être découplée de la formation d'ATP grâce à la présence de la protéine UCP1 qui augmente la conductance de la membrane mitochondriale interne afin de dissiper le gradient de proton sous forme de chaleur (**Figure 18-A**) (518). UCP1 est responsable du symport d'un acide gras à longue chaîne anionique et d'un proton H⁺ par cycle (**Figure 18-B**) (519,520). Premièrement, l'interaction d'un acide gras anionique avec UCP1 par l'intermédiaire d'interactions hydrophobes ou avec la bicouche de phospholipides de la membrane mitochondriale interne permet la fixation d'un H⁺ et leur translocation dans la matrice mitochondriale par changement de conformation. Ensuite, l'ion H⁺ est libéré tandis que l'acide gras anionique reste associé à UCP1 grâce à des interactions hydrophobes avec sa queue carbonée. Pour terminer, l'acide gras sous forme anionique revient à sa position initiale afin d'amorcer un nouveau cycle de translocation de H⁺.

Les acides gras à longue chaîne, produits par la lipolyse sous le contrôle d'une stimulation adrénergique sont des activateurs endogènes de la thermogénèse qui assurent un fonctionnement efficace d'UCP1 pour le transport des protons H⁺ (510). De plus, en condition physiologique, les acides gras à longue chaîne permettent également d'éliminer par compétition, l'inhibition exercée sur UCP1 par les nucléotides puriques (comme l'ATP) et favorisent ainsi la fuite de protons thermogènes à travers UCP1 (519). Par ailleurs, la levée de l'inhibition d'UCP1 est également régulée par d'autres mécanismes, dont l'élévation du pH, l'association avec des protéines qui rendent la membrane interne imperméable aux protons (dont la cardiolipine), ou encore par les espèces réactives de l'oxygène (518,521,522).

c. Le tissu adipeux brun

Le TAB est le principal acteur de la thermogenèse sans frisson (510,523,524). L'activité du TAB varie en fonction de l'âge, de la masse grasse, de la température extérieure ou encore du genre (503,525,526).

La différenciation des adipocytes bruns et blancs fait intervenir des facteurs communs tel que PPAR γ qui est requis pour leur maturation et qui coopère avec les cofacteurs C/EBP (527). Malgré ces similitudes, les adipocytes blancs et bruns ne sont pas issus des mêmes progéniteurs. En effet, les adipocytes bruns présentent des caractéristiques communes avec les cellules musculaires et dérivent d'un précurseur commun du dermomyotome (528,529). Ils expriment Myf5 (Myogenic factor 5), un gène impliqué dans la différenciation musculaire dont l'expression avait été préalablement décrite comme restreinte aux précurseurs des muscles squelettiques (530). De plus, la signature protéomique des adipocytes bruns est semblable à celles des muscles squelettiques (**Figure 19**) (531).

D'autres facteurs de transcriptions sont également impliqués dans la détermination en adipocytes bruns tels que PRDM16 (PR domain containing 16), PGC1, BMP, FoxC2, et SRC (steroid receptor coactivator).

PRDM16 - est un régulateur essentiel de la différenciation des précurseurs Myf5⁺ en adipocyte brun plutôt qu'en myocyte, mais les mécanismes qui aboutissent à son activation dans le TAB restent encore inconnus (532,533). L'invalidation de PRDM16 chez la souris entraîne la diminution, et non la disparition des caractéristiques moléculaires et morphologiques du TAB, ainsi que l'augmentation des marqueurs de cellules musculaires, suggérant l'implication d'autres facteurs (530). PRDM16 interagit avec PGC1 α et β afin de contrôler la différenciation des adipocytes. Ce complexe induit l'expression des marqueurs des adipocytes bruns tels que UCP1 et Elovl3, et inhibe les marqueurs musculaires, comme la myogenine (533).

PGC1 α - qui a été identifié pour la première fois dans le TAB, est un co-facteur transcriptionnel capable d'interagir avec PPAR γ afin d'activer les voies du métabolisme oxydatif et de la biogenèse mitochondriale à la fois dans le muscle et les adipocytes bruns (534). L'expression ectopique de ce facteur de transcription dans des adipocytes blanc en culture augmente l'expression d'UCP1 et d'autres gènes impliqués dans la phosphorylation oxydative, dont COX II et IV (cytochrome c oxidase), l'ATP synthase, et augmente également la biogenèse mitochondriale (534). L'activité transcriptionnelle de PGC-1 α est inhibée par RIP140 (receptor

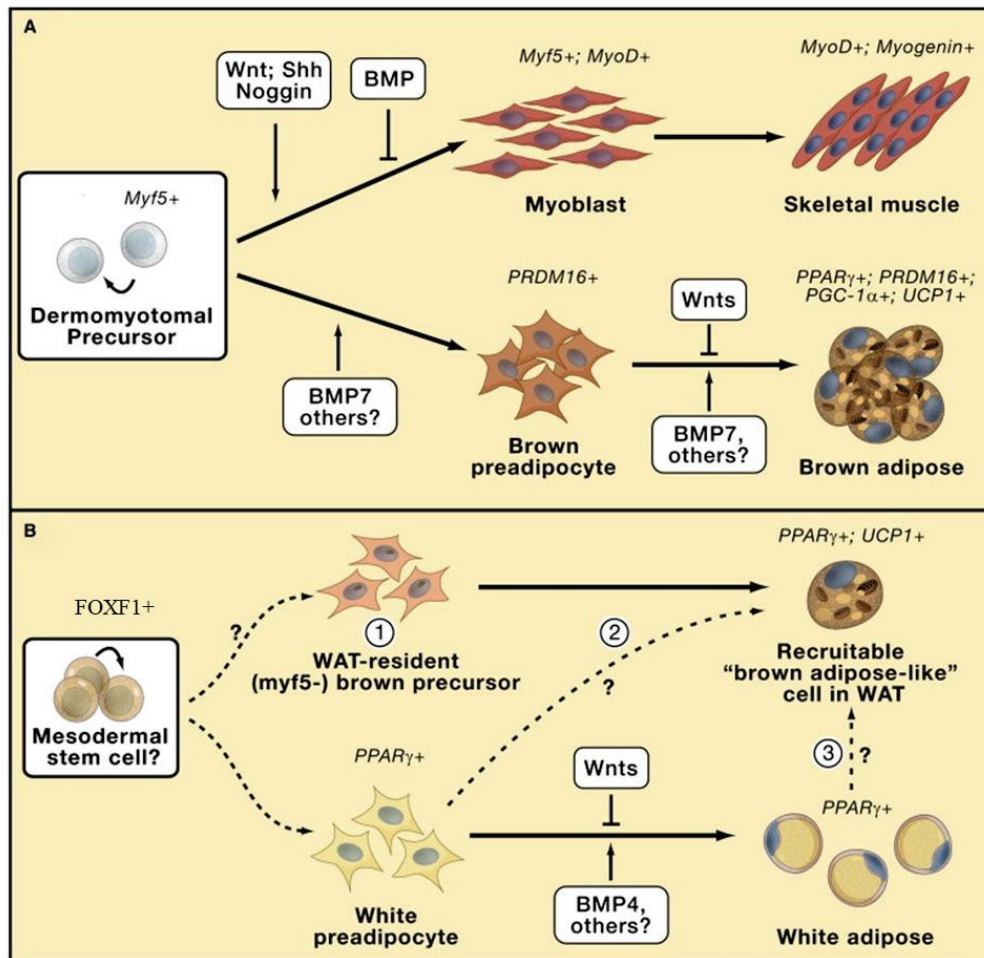


Figure 19 : Facteurs impliqués dans la différenciation des adipocytes bruns et blancs

(A) Les adipocytes bruns et les muscles squelettiques proviennent d'un précurseur commun du dermomyotome, qui exprime Myf5. La différenciation des adipocytes bruns est induite par les BMP (bone morphogenetic protein) (dont BMP-7), qui sont par ailleurs responsables de l'inhibition de la voie myogénique. PRDM16, PPAR γ/α , PGC-1 α et UCP1 sont des marqueurs des adipocytes bruns et sont impliqués dans leur différenciation. La voie Wnt inhibe la différenciation des pré-adipocytes bruns en cellule brune mature. Au contraire, l'expression de myoD (myoblast determination protein 1) et l'engagement des cellules issues du précurseurs du dermomyotome dans la voie musculaire, sont induits par les voies Wnt, Sonic Hedgehog (Shh) et Noggin. (B) Les cellules souches embryonnaires de la lignée adipeuse blanche sont encore mal connues, néanmoins, il semblerait que ces cellules soient issues du mésoderme et expriment FOXF1 (forkhead box F1). La différenciation des préadipocytes blancs qui expriment PPAR γ en cellules adipeuses blanches matures semble être stimulé par certaines BMP. Les cellules adipeuses adaptatives de type beige exprimant UCP1 qui se développent dans le tissu adipeux blanc (en réponse au froid ou à la stimulation β -adrénergique) semblent être dérivées (1) d'un compartiment spécialisé de précurseurs bruns n'exprimant pas Myf5, mais engagés dans la différenciation des adipocytes bruns ; (2) d'une différenciation dirigée à partir de préadipocytes blancs et/ou (3) d'une transdifférenciation d'adipocytes blancs matures.

Adapté de Kajimura et al., 2010.

interacting protein of 140 kDa), un corépresseur de nombreux récepteurs nucléaires dont l'invalidation provoque l'apparition d'adipocytes bruns (535).

Les protéines BMP appartiennent à la famille des facteurs de croissance TGF- β (transforming growth factor). L'isoforme BMP-7 est principalement impliquée dans la différenciation des adipocytes bruns. En effet, il est capable d'induire l'expression de PRDM16 et PGC-1 α dans des fibroblastes en culture (536). De plus, des embryons déficients pour BMP-7 montrent une diminution de la quantité d'adipocytes exprimant UCP1 (532).

FoxC2 - bien qu'il soit exprimé à la fois dans le tissu adipeux blanc et brun, est un facteur de transcription qui favorise le développement d'adipocytes bruns, mais dont le mécanisme est encore inconnu (537).

Les protéines de la famille des SRC - dont SRC-1 et SRC2 sont également capables d'augmenter ou de diminuer l'activité de PGC1 α , respectivement (538). L'activation de la voie Wnt est également impliquée dans la répression de l'adipogenèse brune et blanche en diminuant l'expression de PPAR γ et C/EBP α dans les cellules précurseurs (539).

d. Le brunissement du tissu adipeux blanc

Le brunissement du tissu adipeux blanc correspond à l'apparition d'adipocytes beiges capables de produire de la chaleur et est induit dans certaines conditions, dont une exposition au froid, un effort physique ou un traitement avec des agonistes β 3-adrénergiques (510–512,540,541). Contrairement aux adipocytes bruns qui se différencient pendant la période fœtale, la différenciation des adipocytes beiges correspond à la différenciation de cellules résidentes du tissu adipeux blanc (**Figure 19**). Les adipocytes beiges expriment UCP1 et ont une morphologie multiloculaire similaires aux adipocytes bruns mais n'ont néanmoins pas la même origine embryonnaire puisqu'ils ne proviennent pas d'un progéniteur exprimant Myf5 (511,532). L'origine de ces cellules restent encore à définir, mais il semble qu'elles dériveraient de cellules précurseurs du mésoderme exprimant le facteur de transcription FoxF1 (542) (**Figure 19**).

En condition basale, l'expression d'UCP1 est faible dans les adipocytes beiges mais augmente en réponse à une stimulation β 3-adrénergique sans pour autant atteindre les taux mesurés dans le TAB (512,543). Le brunissement du tissu adipeux blanc est sous le contrôle du système nerveux sympathique ou encore d'hormones telles que FGF21 (fibroblast growth factor 21) ou l'irisine ; et il implique l'induction de facteurs de transcriptions communs à la

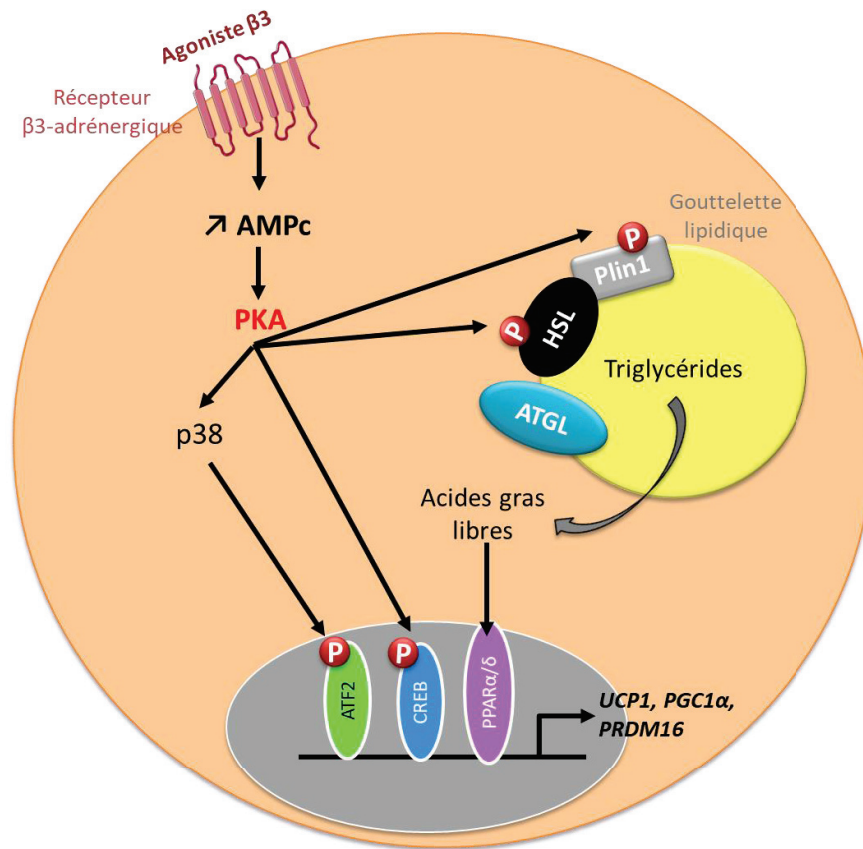


Figure 20 : Mécanismes de régulation de la thermogenèse du tissu adipeux par le système nerveux sympathique.

La stimulation des récepteurs β3-adrénergiques conduit à l'activation de la protéine kinase A (PKA) qui phosphoryle l'hormone sensitive lipase (HSL), la périlipine-1 (Plin1), et les facteurs de transcription CREB (c-AMP response element-binding protein) et ATF2 (activating transcription factor 2). En conséquence, l'expression des gènes associés à la thermogenèse du tissu adipeux est augmentée.

Abréviations: AMPc (adénosine monophosphate cyclique), ATGL (adipose triglycérade lipase), PGC1α (peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1α), PPARα/δ (peroxisome proliferator-activated receptors α/δ), PRDM16 (PR domain containing 16), UCP1 (uncoupling Protein 1).

différenciation des adipocytes bruns, tels de PRDM16, PGC1 α ou encore FoxC2. PRDM16 interagit avec PGC1 α et β afin de contrôler la différenciation des adipocytes beiges. Ce complexe induit l'expression des marqueurs des adipocytes bruns/beiges tels que UCP1 et Elovl3 et inhibe les marqueurs des adipocytes blancs (533). La surexpression du facteur de transcription FoxC2 dans le tissu adipeux blanc provoque l'apparition de cellules semblables aux adipocytes bruns associée à une augmentation des gènes thermogéniques, dont UCP1 et PGC-1 α (544).

La capacité des cellules adipocytaires résidentes du tissu adipeux blanc à dépenser de l'énergie sous forme de chaleur sous certaines conditions, représente une cible thérapeutique attractive dans le traitement de l'obésité.

3. La régulation de la dépense énergétique

La dépense énergétique est un acteur important dans le maintien de l'équilibre énergétique. Le rôle du SNS dans cette régulation est maintenant bien caractérisé, néanmoins d'autres facteurs circulants comme les hormones et les cytokines sont également impliqués.

a. Régulation par le système nerveux sympathique

La dépense d'énergie, notamment la thermogénèse du TAB, est dépendante de l'activation du SNS en réponse à certains stimuli comme une exposition au froid ou encore une activité physique. Chez le rongeur, la stimulation physiologique (acclimatation au froid) ou pharmacologique des récepteurs β 3-adrénergiques active rapidement la thermogénèse sans frisson dans le TAB (545). Les effets thermogènes des agonistes des récepteurs β 3-adrénergiques sont attribués à l'activation des capacités oxydatives du TAB mais également du tissu adipeux blanc (546,547). Dans ce dernier, ce phénomène correspond au brunissement et est marqué par une augmentation de l'expression des gènes impliqués dans l'oxydation des acides gras et dans la différenciation en adipocytes beiges (PRDM16 et PGC1 α) et de la protéine UCP1 (548–550).

L'activation du SNS, en induisant la lipolyse et en mobilisant les acides gras, permet de découpler la phosphorylation oxydative et de fournir des substrats pour la respiration mitochondriale (551–553). La fixation de la noradrénaline libérée par les fibres sympathiques post-ganglionnaires sur les récepteurs β 3 active la PKA qui en phosphorylant CREB va induire l'expression de c/EBP afin d'induire la différenciation des pré-adipocytes en adipocytes beiges (554). De plus, la PKA est capable de phosphoryler p38, qui en phosphorylant ATF2 (activating transcription factor 2), augmente la transcription de gènes associés à la thermogénèse comme

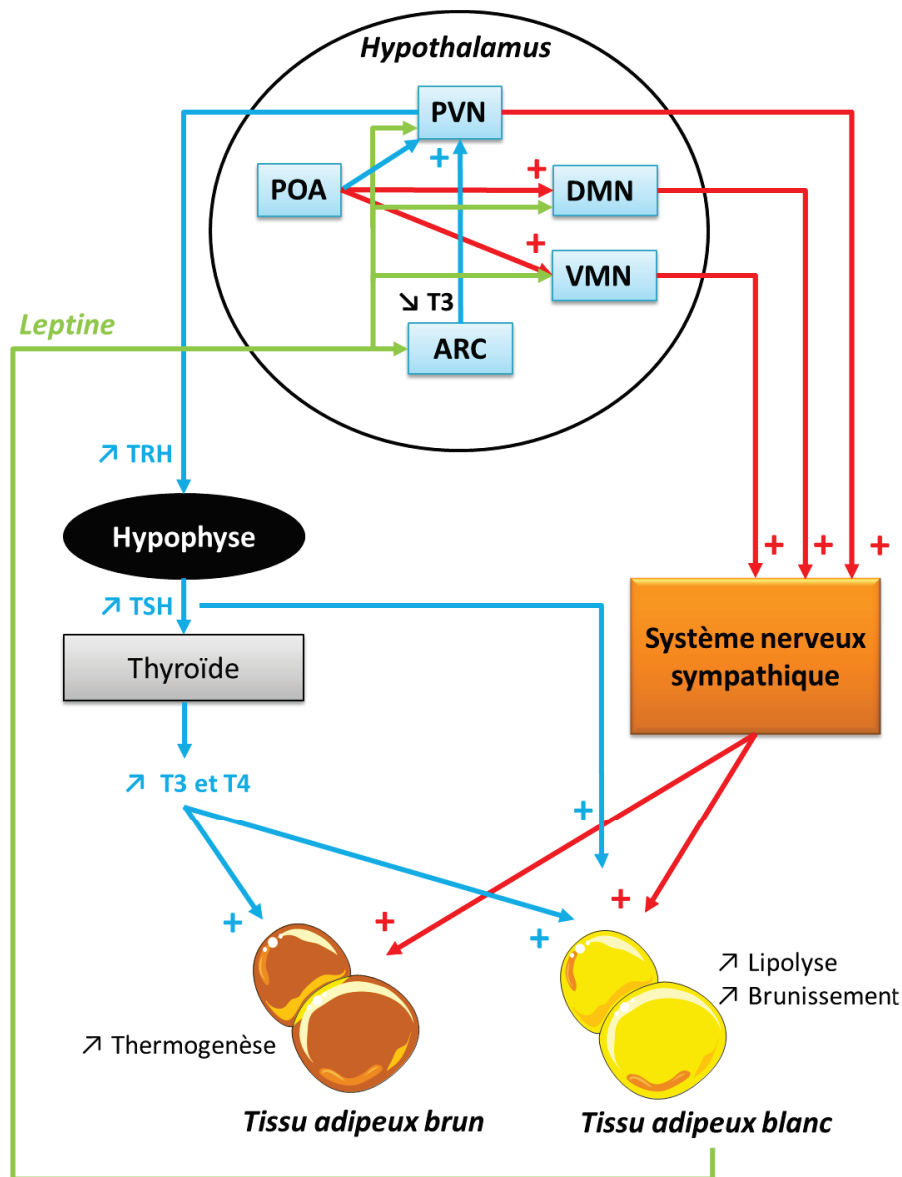


Figure 21 : Interactions entre l'axe hypothalamo-hypophysaire-thyroïdien, le système nerveux sympathique et la leptine dans la régulation du métabolisme du tissu adipeux

Une exposition au froid conduit à l'activation de neurones localisés dans l'aire pré-optique (POA), qui induit la thermogénèse du tissu adipeux en activant à la fois la libération des hormones thyroïdiennes et le tonus sympathique.

Axe hypothalamo-hypophysaire-thyroïdien : L'activation des neurones du noyau paraventriculaire (PVN) provoque la libération de TRH (thyrotropin releasing hormone) au niveau des neurones à TSH (thyroid stimulating hormone) de l'hypophyse. Ces derniers se projettent sur la thyroïde afin de stimuler la libération des hormones thyroïdiennes T3 et T4, qui sont responsables de l'augmentation de la thermogénèse des tissus adipeux brun et blanc. De plus, la TSH libérée par l'hypophyse peut directement réguler la lipolyse des tissus adipeux brun et blanc. Par ailleurs, la diminution de la T3 se traduit par l'activation des neurones du noyau arqué (ARC) qui se projettent sur le PVN, et ainsi augmente la synthèse des hormones thyroïdiennes.

Le système nerveux sympathique : L'activation des neurones du DMN (noyau dorsomédian), du PVN et du VMN (noyau ventromédian) augmente la thermogénèse et la lipolyse en augmentant le tonus sympathique exercé sur les tissus adipeux brun et blanc.

La leptine : Elle augmente la dépense énergétique en modulant la production des hormones thyroïdiennes et le tonus sympathique. Plus précisément, la leptine produite par le tissu adipeux blanc module l'activité des neurones de l'ARC, du PVN, du DMN et du VMN, et augmente le tonus sympathique exercé sur les tissus adipeux brun et blanc et la production des hormones thyroïdiennes.

UCP1 et PGC1 α (534,555,556). Enfin, la PKA, en phosphorylant la périlipine et la HSL, stimule la lipolyse qui fournit des ligands lipidiques capables d'activer la transcription de PPAR α et PPAR δ , qui induisent l'expression de gènes impliqués dans la β -oxydation des acides gras et dans la thermogénèse (**Figure 20**).

Le tonus sympathique régule la dépense énergétique en modulant l'activité des fibres sympathiques innervant les tissus mais aussi indirectement en induisant la libération de l'adrénaline par les glandes médullosurrénales.

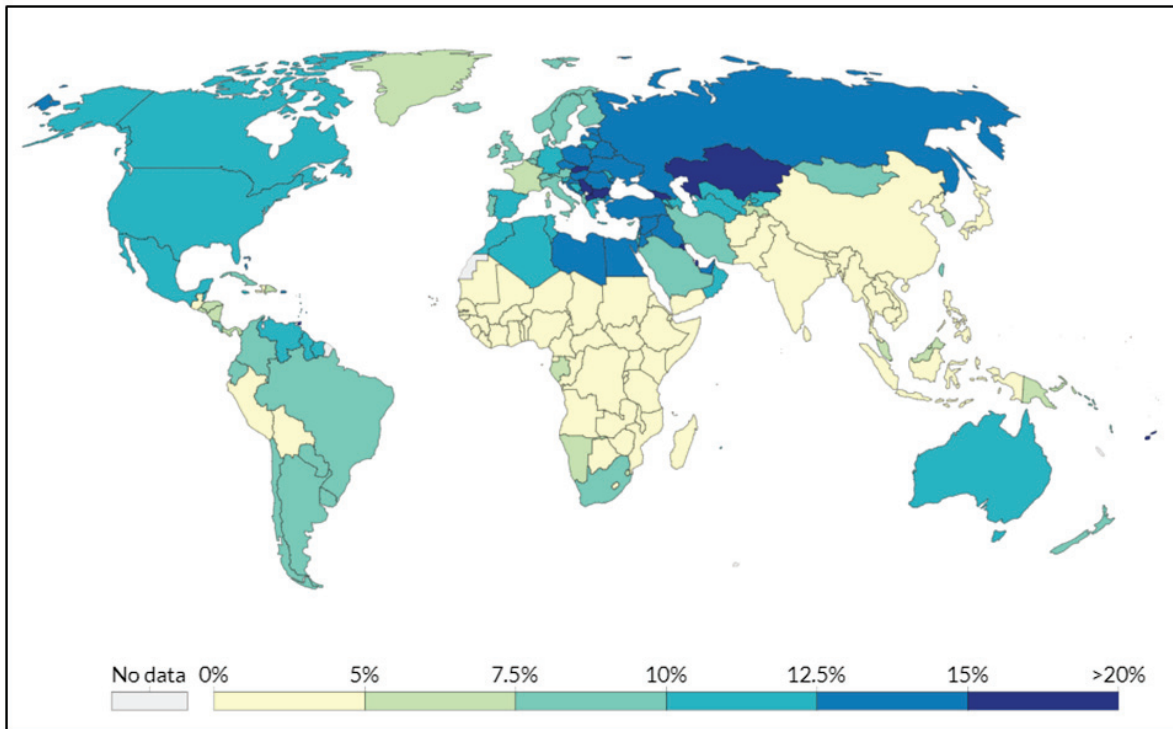
b. Régulation par les facteurs circulants

La dépense d'énergie sous forme de chaleur est régulée par de nombreux facteurs circulants tels que les hormones thyroïdiennes, la leptine, les catécholamines, l'irisine, ou encore le facteur FGF21.

Les hormones thyroïdiennes T3 (triiodothyronine) et T4 (thyroxine) - Les hormones thyroïdiennes sont des régulateurs clés de l'homéostasie énergétique à la fois chez l'homme et chez le rongeur. En effet, elles se fixent sur les récepteurs TR β (nuclear thyroid hormone receptors β) et modulent la thermogénèse en augmentant l'expression d'UCP1 et en interagissant avec le SNS (**Figure 21**) (557). Dans le cadre d'une exposition au froid, les informations concernant les changements de température ambiante ou corporelle convergent vers l'aire pré-optique localisé dans l'hypothalamus, qui en envoyant des projections en direction du PVN activent les neurones à TRH qui libèrent ce neurotransmetteur au niveau des neurones à TSH de l'hypophyse (pour revue (558)). Ces derniers en se projetant sur la thyroïde entraînent la libération des hormones thyroïdiennes T3 et T4 qui régulent positivement la dépense énergétique. De plus, la TSH libérée par l'hypophyse peut directement réguler la lipolyse du tissu adipeux blanc et brun (pour revue (558)). D'autre part, l'aire pré-optique envoie également des terminaisons nerveuses en direction des neurones du DMN et du VMN qui contrôlent la thermogénèse et la lipolyse en augmentant le tonus sympathique exercé sur le tissu adipeux (**Figure 21**) (pour revue (558)).

La leptine – Cette adipokine influence la dépense énergétique en modulant l'activité de plusieurs neurones hypothalamiques qui contrôlent la sécrétion des hormones thyroïdiennes et l'activité du système nerveux sympathique (**Figure 21**) (79,558,559). Plus précisément, la leptine active les neurones à POMC/CART du noyau arqué, à TRH du PVN, à prolactine du DMN et les neurones SF-1 du VMN et inhibe les neurones NPY/AgRP du noyau arqué (79,559,560).

En 1996 :



En 2016 :

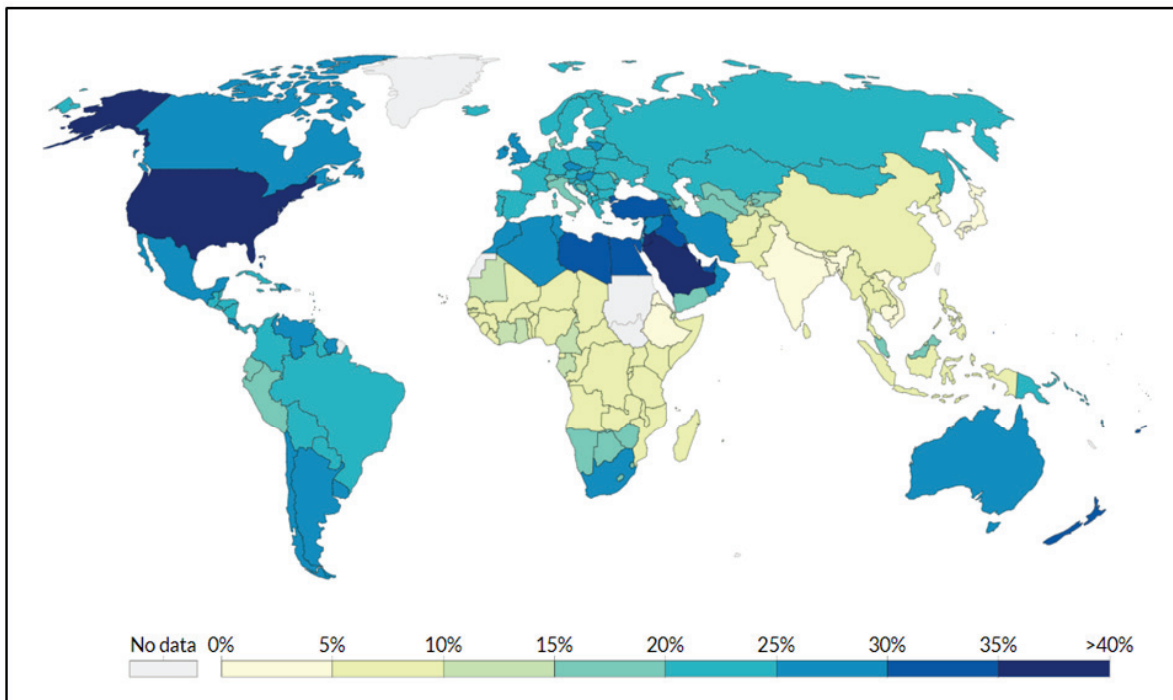


Figure 22 : Evolution de la prévalence mondiale de l'obésité entre 1996 et 2016.

D'après un rapport de l'observation mondial de la santé 2017 – Organisation mondiale de la santé

Les myokines et hépatokines - L'activité physique est également capable d'induire la thermogénèse en stimulant la sécrétion d'irisine ou encore de FGF21. L'irisine est une cytokine musculaire libérée dans le sang lors d'un exercice capable d'induire le brunissement du tissu adipeux blanc sous-cutané en augmentant l'expression d'UCP1 (561). L'exercice physique chez la souris entraîne l'augmentation de l'expression de PGC1 α dans le muscle qui stimule l'expression de la protéine FNDC5 (Fibronectin Type III Domain Containing 5), qui est clivée pour libérer l'irisine dans le sang. Le FGF21 est un facteur de croissance capable de réguler la thermogénèse et le brunissement du tissu adipeux blanc, notamment en augmentant l'expression d'UCP1 (549,562,563). Le foie est considéré comme le principal site de production de FGF21 mais ce facteur est également libéré par d'autres tissus, dont le tissu adipeux, ou le muscle lors d'une activité physique (549,562,563). Chez l'homme, l'augmentation de la sécrétion de FGF21 lors d'une exposition au froid est associée à une induction de la thermogénèse (564). Dans les adipocytes en culture, la signalisation du FGF21 implique sa fixation sur le récepteur FGF1R et sur β Klotho et l'activation de la voie des MAPK (549,563,565,566).

Afin de maintenir un poids corporel stable, l'organisme met en jeu de nombreux mécanismes qui contrôlent la balance entre les apports et les dépenses d'énergie. Or, un déséquilibre de celle-ci peut se traduire par une perte ou une prise de poids pouvant évoluer vers la cachexie ou l'obésité, respectivement.

C. L'obésité, un enjeu majeur de santé publique

I. L'Obésité et ses complications associées

1. Généralités

L'obésité est une maladie chronique qui se caractérise par une accumulation excessive de graisse et dont la prévalence augmente considérablement chaque année dans le monde et en France où elle est passée de 6.77 % en 1996 à 21.6 % en 2016 (**Figure 22**). En 2016, selon l'OMS, 39% des adultes dans le monde étaient en surpoids, et 13% étaient obèses.

L'indice de masse corporelle (IMC) est un score qui prend en compte le poids par rapport à la taille, et permet de classer l'insuffisance pondérale, le surpoids et l'obésité. Alors qu'un IMC normal se situe entre 18,5 et 24,9, une personne est considérée en surpoids à partir de 25, et obèse si l'IMC dépasse 30. De façon surprenante, la majorité de la population mondiale vit

dans des pays où le surpoids et l'obésité tuent plus de gens (au moins 2,8 millions de décès par an) que l'insuffisance pondérale. Face à l'augmentation exponentielle de la prévalence de l'obésité, l'OMS en 1997 a défini l'obésité comme une épidémie mondiale et prévoit qu'un quart de la population mondiale sera obèse d'ici 2045.

L'obésité est généralement le résultat d'un déséquilibre de la balance énergétique, avec un excès d'apport calorique associée à une augmentation de la sédentarité. Le développement de l'obésité est associé à l'apparition de complications métaboliques majeures telles le DT2, les dyslipidémies ou encore la stéatose hépatique (567,568). De plus, l'obésité représente un important facteur de risque pour l'apparition de rétinopathies, néphropathies, maladies cardiovasculaires, ou différents types de cancers (568–570).

2. Insulino-résistance et diabète de type 2

La résistance à l'insuline, qui caractérise l'état pré-diabétique, est un facteur prédictif du développement du DT2. Cependant 80 % des insulino-résistance n'évoluent pas vers une intolérance au glucose et un diabète (571). L'insulino-résistance va entraîner une diminution de l'action de l'insuline sur le captage du glucose au niveau des tissus périphériques et une augmentation de la PHG qui conduit à une augmentation de la glycémie. De plus, l'insulino-résistance participe à l'installation d'une dyslipidémie notamment en augmentant la lipolyse du tissu adipeux.

a. Mécanismes moléculaires de l'insulino-résistance

Au cours de l'obésité, l'excès de lipides conduit à la formation de dérivés lipidiques toxiques, dont le DAG, l'acide lysophosphatidique et les céramides qui contribuent au développement de la résistance à l'insuline, notamment dans le foie et les muscles (572). La lipase LPL et les protéines impliquées dans le transport des acides gras, comme CD36 et FATP1, sont des acteurs importants dans la régulation de l'entrée des lipides dans les muscles et le foie. En effet, leur délétion dans le muscle protège de l'insulino-résistance induite par un régime hyperlipidique (573,574). Par ailleurs, les muscles des patients obèses et diabétiques présentent des altérations de l'oxydation lipidique liées à des dysfonctionnements de l'activité mitochondriale qui favorisent l'accumulation de lipides ectopiques et par conséquent participe à l'installation d'une insulino-résistance (575–578).

La résistance à l'insuline est associée à des altérations de sa voie de signalisation, en particulier au niveau de la phosphorylation des protéines IRS 1 et 2 en tyrosine (579–584). Ce défaut d'activation des IRS s'explique par une accélération de leur dégradation mais également par une induction de leur phosphorylation sur les résidus sérines plutôt que tyrosines (583,585).

Plus précisément, le DAG est un puissant activateur des protéines kinase PKC θ et PKC ϵ , dans le muscle et le foie, respectivement, qui après activation, phosphorylent les IRS sur des résidus sérines (583,585,586). Ainsi, il existe une forte corrélation entre la quantité de DAG et le développement de l'insulino-résistance (587). Les céramides issues de l'estérification des sphingosines par les acyl-CoA saturés participent également au développement de l'insulino-résistance. En effet, l'inhibition de la synthèse des céramides chez la souris prévient l'insulino-résistance musculaire et hépatique induite par les acides gras saturés (588,589).

b. Conséquences de l'insulino-résistance musculaire et hépatique

Après un repas, le captage du glucose par les muscles représente environ 80 % du captage périphérique total (590,591). Dans le muscle, la résistance à l'insuline se traduit par une diminution du captage du glucose associée à des anomalies de la translocation de GLUT4 à la membrane plasmique et à une diminution de la synthèse de glycogène (592–595).

Par ailleurs, l'augmentation de la PEG chez les sujets insulino-résistants et diabétiques est généralement attribuée à une augmentation de la PHG qui est notamment due à une augmentation de la disponibilité en substrats néoglucogéniques tels que le glycérol et les acides gras (due à l'augmentation de la masse grasse et de la lipolyse adipocytaire), l'alanine, et le lactate (596–601). Ces patients présentent également une diminution de la synthèse et une augmentation de la dégradation du glycogène dans le foie en période post-prandiale et au cours du jeûne, respectivement (602–605). Néanmoins, le rôle de ces altérations du métabolisme du glycogène dans l'installation de l'hyperglycémie au cours du jeûne semble mineur, comparé à celui occupé par l'induction de la néoglucogénèse hépatique.

L'ensemble de ces troubles métaboliques sont associées à une induction de l'expression et de l'activité de la G6Pase et de la PEPCCK-c dans le foie des sujets diabétiques (602,603,606). Ces modifications délétères ont été retrouvées dans le foie, le rein et l'intestin de modèles animaux de diabète induit par la streptozotocine, par une alimentation hypercalorique, mais également dans des modèles génétiques comme les souris *ob/ob* et les rats ZDF (Zucker diabetic fatty rats) (361,364,606,607). A l'inverse, l'invalidation du gène codant pour la G6PC spécifiquement dans le foie protège du développement du diabète et de l'insulino-résistance chez la souris soumise à un régime hypercalorique, malgré le développement d'une stéatose hépatique (608).

c. Conséquences de l'insulino-résistance adipocytaire

Au niveau du tissu adipeux, l'insuline stimule l'absorption du glucose (5% du captage périphérique total) et la synthèse des triglycérides et au contraire inhibe la lipolyse (316,609). De ce fait, la résistance à l'insuline adipocytaire est associée à une diminution du captage du glucose, liée comme dans le muscle, à une altération de la translocation de GLUT4 à la membrane plasmique et à une altération de la suppression de la lipolyse. L'insulino-résistance du tissu adipeux se traduit par des modifications majeures du métabolisme lipidique et l'installation d'une dyslipidémie, qui se caractérise à la fois par une augmentation des lipides circulants et des modifications de leur répartition, avec une augmentation du nombre et de la taille des VLDL et une diminution du HDL (pour revue (316)). Les autres tissus, tels que l'intestin et le foie, participent au développement de l'hyperlipidémie. En effet, elle est associée à une diminution de la recapture des chylomicrons « remnants » par le foie et à une augmentation de la sécrétion des chylomicrons par l'intestin (330,610–612). De plus, l'absence de l'effet inhibiteur de l'insuline sur la production des VLDL hépatiques en période post-prandiale et la diminution de la clairance et du catabolisme des VLDL contribuent à leur augmentation dans le sang (pour revue (316)).

La dyslipidémie est responsable de la lipotoxicité cellulaire, notamment dans le foie, le muscle et le pancréas, et est également associée au développement de la stéatose hépatique non-alcoolique (613).

3. La stéatose hépatique non-alcoolique

La maladie hépatique non alcoolique (NAFLD : nonalcoholic fatty liver disease) est un état pathologique du foie qui représente une des complications majeures de l'obésité et de l'insulino-résistance. En effet, environ 70% des patients diabétiques développent une NAFLD (614,615). Le développement de la NAFLD commence par une accumulation ectopique de lipides dans le foie (NAFL: nonalcoholic fatty liver) qui peut évoluer, ou non, vers une inflammation et une fibrose (NASH : nonalcoholic steatohepatitis), puis vers une cirrhose et dans les cas les plus graves jusqu'au cancer hépatique. Néanmoins, un certain nombre de patients obèses/diabétiques développent des tumeurs hépatiques en l'absence d'inflammation et de fibrose hépatique (616).

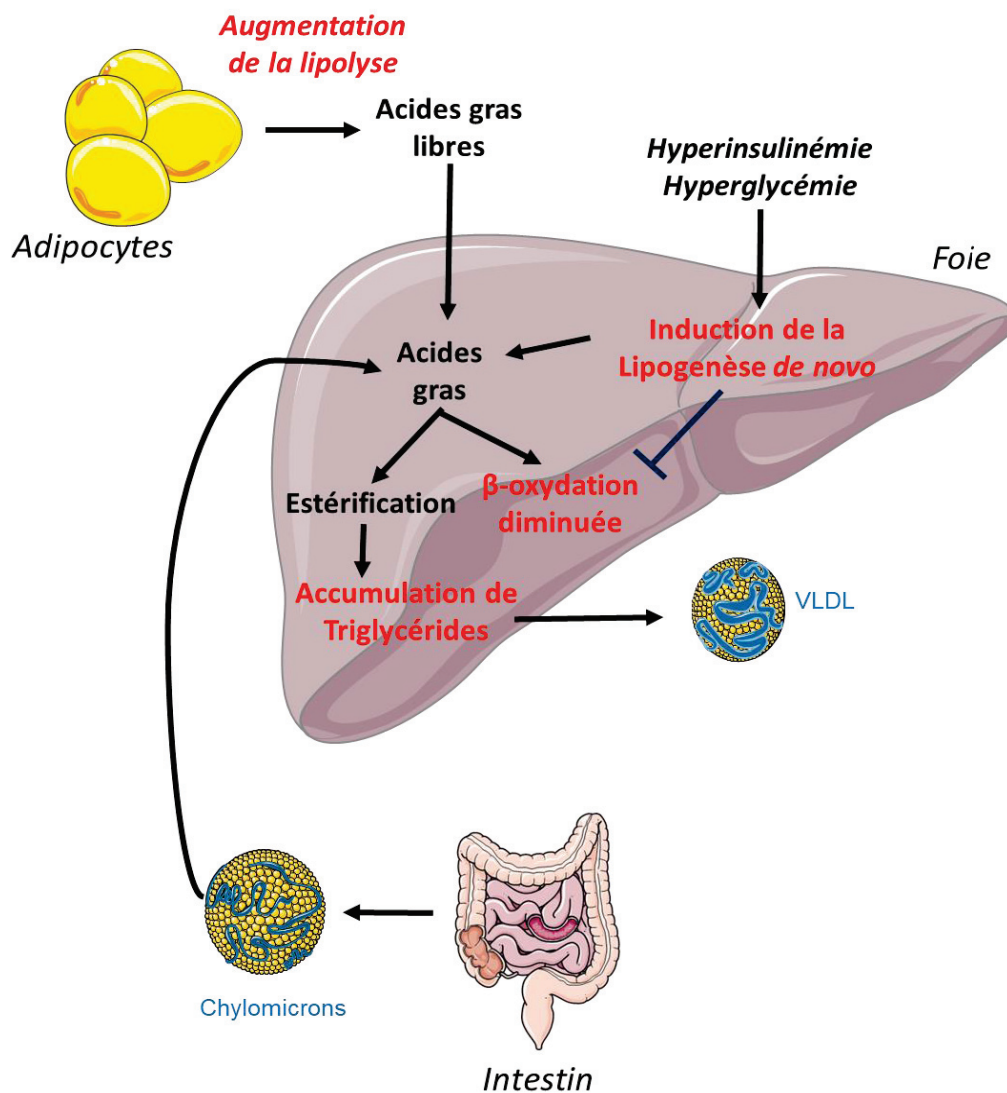


Figure 23 : Les différentes voies métaboliques impliquées dans le développement de la stéatose hépatique chez les sujets obèses et insulino-résistants

Dans l'obésité et l'insulino-résistance, l'augmentation des lipides alimentaires sous forme de chylomicrons associé à l'induction de la lipolyse dans le tissu adipeux se traduit par une augmentation des flux d'acides gras vers le foie. De plus, l'hyperglycémie et l'hyperinsulinémie induisent la lipogenèse *de novo* et diminuent la β -oxydation dans le foie. Les acides gras estérifiés peuvent être stockés sous forme de gouttelettes lipidiques dans les hépatocytes ou sécrétés dans le sang sous forme de VLDL (very low density lipoprotein) .

Adapté de Postic and Girard, 2008.

a. Développement de la stéatose hépatique

La stéatose hépatique correspond à l'accumulation ectopiques de lipides dans les hépatocytes qui résulte de différentes altérations métaboliques dont l'augmentation de l'apport des lipides alimentaires, de la lipogenèse *de novo* hépatique, ou de la lipolyse adipocytaire. De plus, la stéatose est exacerbée par le fait que le captage des acides gras dans les hépatocytes est augmenté proportionnellement à leur taux plasmatique (617). Dans le foie, ce captage implique plusieurs protéines, dont FABP, CD36 ou encore la phospholipase A2 (618–620). Par exemple, le transporteur CD36 est impliqué dans le captage des acides gras libre circulants vers les vacuoles hépatocytaires, qui en se remplissant donnent aux hépatocytes un aspect proche de celui des adipocytes (621). L'expression de ce transporteur est augmentée par la fixation de PPAR γ sur son promoteur dans le foie des souris et des sujets insulino-résistants ou atteints de NASH ou de NAFL. De plus, l'excès de lipides intrahépatiques peut également être la conséquence de la diminution de la β -oxydation hépatique ou de la synthèse et de l'export des VLDL, même si ces voies sont largement minoritaires (**Figure 23**) (298). En effet, dans le foie stéatosique des sujets obèses, 60% des lipides proviennent de la lipolyse adipocytaire, 25-30% de la lipogenèse *de novo* et seulement 10-15% de l'alimentation (617,622). Ceci souligne le rôle clé de la lipolyse adipocytaire et de la lipogenèse *de novo* dans le développement de la stéatose hépatique.

Chez les sujets obèses et diabétiques, la lipogenèse *de novo* est induite en réponse à l'hyperglycémie qui se traduit par une augmentation du flux de glucose et une accumulation de G6P dans le foie qui provoque l'activation de ChREBP (300,623). Néanmoins, de façon paradoxale, alors que le foie de ces patients est résistant aux effets de l'insuline sur la diminution de la PHG, il est toujours sensible à ses effets sur la lipogenèse *de novo*, médiés par l'activation de SREBP-1c (624–627). Ce phénomène, nommé « résistance sélective à l'insuline » conduit à l'installation d'un état pathologique où le foie produit du glucose et des lipides de façon non contrôlée. Plusieurs hypothèses ont été proposées pour l'expliquer ; la première repose sur des fonctions distinctes des IRS 1 et 2. En effet, IRS1 serait plutôt impliqué dans les effets activateurs de l'insuline sur la glucokinase et les gènes de la lipogenèse *de novo*, tandis que l'activation de IRS 2 serait associée aux effets inhibiteurs de l'insuline sur l'expression de FoxO1 et donc sur la PHG (pour revue (622)). En accord avec cette hypothèse, dans des modèles animaux d'insulino-résistance ou chez des patients obèses atteints de NAFLD mais non diabétiques, l'expression et l'activité d'IRS 2 est diminuée alors que l'expression d'IRS 1 n'est pas modifiée, ce qui permet à l'insuline d'induire SREBP-1c et par conséquent la

lipogénèse *de novo* (626,628,629). La deuxième hypothèse suggère l'implication de l'augmentation du stress du RE dans l'activation de SREBP-1c (pour revue (622)). En effet, il pourrait à la fois être responsable de l'activation du clivage de SREBP-1c et de l'induction de la résistance à l'insuline par l'activation de kinases impliquées dans la réponse au stress comme la protéine JNK (Jun N-terminal Kinase). Une dernière hypothèse propose que l'augmentation de SREBP-1c impliquerait l'activation de mTORC1 (mammalian target of rapamycin complex 1) par l'excès d'acides aminés circulants qui est nécessaire à la maturation et à la transcription de la SREBP-1c induite par l'insuline (622,630). En effet, en absence d'activation de mTORC1, l'insuline permet uniquement l'augmentation de l'expression de SREBP-1c, mais pas son activation (631).

La composition des VLDL des patients atteints de DT2 est modifiée avec une augmentation de DAG et d'acide palmitique, et une réduction de la sphingomyéline (632). Comme le palmitate est le principal acide gras synthétisé au cours de la lipogénèse *de novo*, l'augmentation de la teneur en acide palmitique des VLDL pourrait être une conséquence de l'augmentation de la lipogénèse *de novo* hépatique et contribuer à l'état pro-inflammatoire (632,633).

Finalement, l'accumulation ectopiques de lipides dans le foie, et la résistance à l'insuline sont deux mécanismes liés qui s'entretiennent l'un et l'autre, et forment un cercle vicieux conduisant à une altération progressive du fonctionnement du foie. En effet, la diminution de la stéatose hépatique dans plusieurs modèles d'animaux insulino-résistants entraîne une amélioration de la sensibilité à l'insuline (634–636). Néanmoins, il existe des cas où l'installation d'une stéatose hépatique ne conduit pas au développement d'une insulino-résistance. Pour exemple, le blocage de la sécrétion de VLDL par l'invalidation de la MTP hépatique, conduit à une stéatose sans modification de la sensibilité à l'insuline (637). De plus, il apparaît que la nature des acides gras accumulés dans le foie soit tout aussi importante, sinon plus que leur quantité. En effet, la stéatose hépatique observée chez la souris déficiente pour la GP6C ou sur-exprimant le facteur de transcription ChREBP dans le foie, n'est pas associée au développement d'un état d'insulino-résistance (608,638,639). En effet, l'acide palmitique qui joue un rôle clé dans la lipotoxicité hépatique et le développement de la NASH est présent en faible quantité dans le foie stéatosique de ces souris alors que les taux d'acide oléique, connu pour ses effets protecteurs, sont augmentés (638,639). Par ailleurs, l'accumulation de triglycérides « inertes » peut être un mécanisme de protection contre l'excès d'acides gras libres et leurs effets cytotoxiques (640). En effet, l'inhibition de la synthèse des triglycérides grâce à

un régime déficient en choline et en méthionine, protège de la stéatose hépatique, mais favorise le développement d'une fibrose et de lésions hépatiques importantes dues notamment à l'accumulation d'acides gras libres dans les hépatocytes (640).

b. Complications de la stéatose hépatique

Cliniquement, la NASH est associée à l'obésité, à l'insulino-résistance et à la dyslipidémie. D'un point de vue histologique, elle est caractérisée par un gonflement des hépatocytes lié à une forte accumulation de lipides, à l'apparition de lésions cellulaires, à une augmentation de l'apoptose et de la nécrose, ou encore à un état pro-inflammatoire. Cette inflammation se complique fréquemment vers l'installation d'une fibrose qui augmente le risque d'apparition d'une cirrhose et d'hépatocarcinomes (641).

Le développement de la NASH est associé à de nombreux facteurs, incluant la lipotoxicité, l'insulino-résistance, l'inflammation et le stress oxydatif mais les mécanismes moléculaires impliqués restent encore mal connus (642). Néanmoins, à ce jour, la lipotoxicité hépatique est considérée comme la principale cause du développement et de la progression de la NASH. La lipotoxicité induit un stress du RE, la mort cellulaire initiée par la voie JNK (Jun N-terminal Kinase) ou encore des dysfonctions mitochondriales (pour revue (619)).

La lipotoxicité hépatique est à la fois la conséquence de l'augmentation des taux de lipides stockés dans le foie, et de leur nature. Parmi les lipides les plus toxiques pour le foie, on retrouve les acides gras libres, le cholestérol libre, les lysophosphatidyl cholines, les céramides, et les acides biliaires. Parmi les acides gras libres, l'acide palmitique et l'acide oléique sont les acides gras saturés et insaturés, respectivement, les plus abondants retrouvés dans l'alimentation et dans un foie stéatosique. L'acide palmitique induit l'apoptose et une insulino-résistance en activant PPAR α et les caspases, mais également en provoquant des dysfonctions mitochondriales dépendantes de la voie JNK dans des cellules hépatiques en culture (643). D'autre part, l'acide palmitique exercerait ses effets toxiques en passant par la formation de lysophosphatidyl choline. Ce dernier, qui dérive de l'hydrolyse partielle des phosphatidylcholines par la phospholipase A2, est libéré par les cellules lorsque l'apoptose est activée par la caspase-3 (644,645). Au contraire, l'acide oléique en activant la synthèse de triglycérides dans les hépatocytes exerce plutôt un rôle protecteur contre les effets pro-apoptotiques des acides gras libres (643,646). En effet, l'inhibition de la synthèse des triglycérides provoque une augmentation de la nécrose, de l'inflammation, de la peroxydation lipidique et du stress oxydatif (640). Ces lipides sont augmentés chez les patients et les modèles

animaux atteints de NASH et leurs effets lipotoxiques mettent en jeu plusieurs mécanismes tels que la chimiotaxie des phagocytes, le stress du RE, l'apoptose par l'activation de la voie JNK, de p53 ou de GSK3 (glycogen synthase kinase 3) (644,645,647–649).

Les céramides sont membres de la famille des sphingolipides qui sont des composants des membranes cellulaires et sont impliqués dans de nombreux processus dont la signalisation de l'insuline, l'apoptose, le stress oxydant, ou encore l'inflammation (650). En effet, les céramides en interagissant avec TNF α (tumor necrosis factor alpha) induisent la libération de ROS (reactive oxygen species) par les mitochondries (651,652). Les sujets obèses atteints de NASH présentent des taux sanguins élevés de céramides qui sont fortement corrélés à l'état d'insulino-résistance hépatique et à l'augmentation de cytokines pro-inflammatoires comme IL1 et IL6 (Interleukines 1 et 6) (619,651,653). La production des céramides met en jeu deux voies : la synthèse *de novo* à partir de palmitoyl-CoA et de sérine par la serine palmitoyl-CoA transférase, et l'hydrolyse des lipides membranaires grâce à une sphingomyelinase neutre, dont l'activité est augmentée lors d'une inflammation (619,651).

L'accumulation de cholestérol libre dans le foie est une étape importante dans le développement de la NAFLD en NASH, et provient de l'augmentation de la dé-esterification, de sa synthèse et de celle des acides biliaires, mais aussi de la diminution de son export (pour revue (619)). Des taux élevés de cholestérol libre entraînent l'activation des cellules de Kupffer et des cellules stellaires hépatiques et se traduit par toute une série d'altérations qui aboutissent finalement à l'apoptose des hépatocytes (654,655).

Par ailleurs, l'hyperglycémie exerce également des effets toxiques sur les hépatocytes. En effet, l'exposition d'hépatocytes de rongeur à une forte concentration de glucose, de fructose ou de sucrose provoque une insulino-résistance (656,657). Ces effets délétères sur la sensibilité à l'insuline ont été reliés notamment au stress oxydatif, à l'inflammation ou encore au stress du RE (658). Pour exemple, le fructose et le sucrose sont associés à l'activation de la voie JNK, qui entraîne la résistance à l'insuline par phosphorylation inhibitrice d'IRS1 (659). Par ailleurs, les effets néfastes du sucrose impliquent l'augmentation de l'expression de PTP1B (proteintyrosine phosphatase 1B) qui est responsable de la déphosphorylation du récepteur à l'insuline (659).

4. Effets délétères sur le métabolisme du tissu adipeux

Le tissu adipeux est un tissu important dans le maintien de l'homéostasie énergétique et peut répondre rapidement à une privation ou un excès de nutriment par des mécanismes

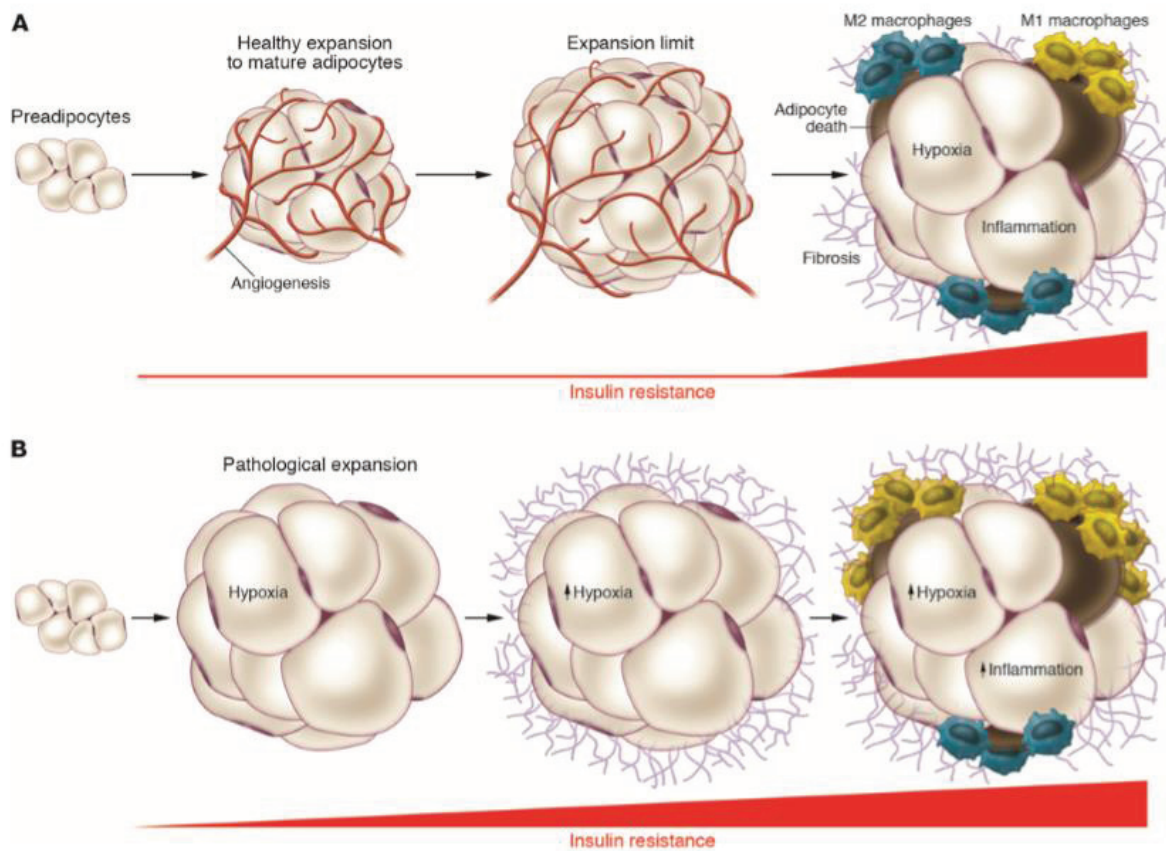


Figure 24 : Expansion physiologique (A) et pathologique (B) du tissu adipeux blanc

(A) L'expansion physiologique du tissu adipeux blanc fait intervenir l'augmentation de la taille et du nombre d'adipocytes, une augmentation de l'angiogenèse et un remodelage physiologique de la matrice extracellulaire.

(B) Au contraire, l'expansion pathologique du tissu adipeux blanc consiste en une hypertrophie massive des adipocytes existants, une angiogenèse limitée et la création de zones d'hypoxie associée à une augmentation de l'expression du facteur HIF-1 α (hypoxia inducible factor) dont l'activation entraîne le développement de la fibrose. Au cours de l'expansion pathologique, les macrophages M1 sont majoritaires et conduisent à l'installation d'une inflammation, qui est fortement associée au développement de la résistance à l'insuline.

D'après Sun et al., 2011.

d'hyperthrophie et d'hyperplasie adipocytaires. Le remodelage du tissu adipeux est un processus qui s'accélère lors du développement de l'obésité et qui implique des altérations telles que l'hypoxie, la mort cellulaire, une inflammation chronique, des modifications de la synthèse des adipokines, une surproduction de matrice extracellulaire et une diminution du remodelage angiogénique (**Figure 24**) (660). De plus, des données chez l'homme et l'animal ont démontré que l'obésité est associée à une réponse inflammatoire chronique caractérisée par une production anormale d'adipokines pro-inflammatoires induite principalement par l'infiltration de macrophages dans les tissus adipeux.

a. Expansion du tissu adipeux et infiltration macrophagique

Dans les modèles d'obésité génétique ou induite par un régime hypercalorique, l'expansion du tissu adipeux peut entraîner de nombreux troubles, incluant la mort adipocytaire, l'augmentation de la sécrétion de chimiokines pro-inflammatoires, l'hypoxie et la dérégulation des flux d'acides gras (pour revue (661)). Ces altérations favorisent le recrutement et l'activation des macrophages dans le tissu adipeux, un processus inflammatoire qui prend place précocement et précède même l'apparition de l'hyperinsulinémie associée à l'insulino-résistance périphérique (662).

Mort adipocytaire - Dans l'obésité, la mort des adipocytes due à leur hypertrophie est augmentée et laisse une gouttelette lipidique inerte, dont l'élimination fait partie intégrante du remodelage du tissu adipeux. Elle constitue un stimulus phagocytaire important qui régule l'infiltration des macrophages qui s'agrègent autour des adipocytes nécrotiques et fusionnent pour phagocyter la gouttelette lipidique résiduelle, formant ainsi une grande masse multinucléée chargée de lipides, caractéristique d'une inflammation chronique (663–665).

Régulation par les molécules chimio-attractantes - Les macrophages recrutés par le tissu adipeux en expansion libèrent des chimiokines, dont MCP1 (monocyte chemoattractant protein-1), qui entretiennent l'état inflammatoire du tissu adipeux en stimulant le recrutement d'autres cellules de l'immunité innée, dont les monocytes (pour revue (661)). Par ailleurs, un équilibre entre les populations polarisées de macrophages recrutés est nécessaire pour maintenir une fonction adipocytaire normale. En effet, une polarisation M1 ou M2 des macrophages est associée à un phénotype pro- ou anti-inflammatoire, respectivement (pour revue (661)). Par ailleurs, la leptine favoriserait l'adhésion des macrophages sur les cellules endothéliales du tissu adipeux et pourrait agir comme une molécule chimio-attractante (666,667).

Hypoxie - Dans les premiers stades de l'expansion du tissu adipeux, des petites zones d'hypoxie apparaissent consécutivement à l'augmentation de la taille des adipocytes. L'hypoxie est responsable de l'induction du phénotype pro-inflammatoire des macrophages M1 en passant par des mécanismes dépendants et indépendants de l'activation du facteur de transcription HIF-1 (Hypoxia-Inducible Factor-1). Ainsi, le recrutement des macrophages dans le tissu adipeux augmente la sécrétion de cytokines dont IL6, TNF- α , IL-1 β , PAI-1 (plasminogen activator inhibitor-1), VEGF (Vascular endothelial growth factor), MMP2 (matrix metalloproteinases 2) ou encore de la leptine (661,668). D'autre part, l'hypoxie stimule le recrutement des macrophages en induisant la mort cellulaire des adipocytes.

Dérégulation des flux d'acides gras - Chez des souris obèses et insulino-résistantes, l'augmentation du taux d'acides gras libres est connue pour engendrer le recrutement des macrophages (669). En effet, les acides gras libres en se liant au complexe TLR4 (Toll Like Receptor 4) conduisent à l'activation de la voie de signalisation intracellulaire NF- κ B (nuclear factor-kappa B) et à la production de cytokines pro-inflammatoires, responsables de l'activation du système immunitaire inné (pour revue (661)).

b. L'inflammation du tissu adipeux blanc

Dans un contexte d'obésité, l'inflammation du tissu adipeux est un acteur important dans l'état inflammatoire chronique et joue un rôle important dans les comorbidités associées, telles que les NAFLD, l'insulinorésistance, le DT2 et les maladies cardiovasculaires. De nombreux mécanismes sont impliqués dans l'initiation et l'évolution de l'état inflammatoire du tissu adipeux, dont l'altération de la fonction glycolytique, les dysfonctions mitochondriales, ou encore les modifications de la sécrétion des adipokines.

Altération de la fonction glycolytique - Face à l'hyperglycémie et l'hyperlipidémie associée à l'obésité, le tissu adipeux est capable de modifier son métabolisme en augmentant son activité glycolique pour limiter le stockage de lipides. L'hypoxie dans les adipocytes et l'hyperglycémie provoquent une augmentation massive de la glycolyse anaérobie qui entraîne la formation de lactate et de glycérol. L'acidose locale qui en résulte stimule la libération d'oxygène dans des zones restreintes du tissu adipeux et induit la production de ROS qui altèrent le métabolisme des cellules adipeuses, endothéliales et sanguines (670). Ainsi, cette utilisation du glucose qui vise à protéger le tissu adipeux de l'excès de lipides et de glucose favorise l'installation d'un état inflammatoire chronique (671).

Dysfonctions mitochondriales - L'intégrité des mitochondries est nécessaire pour la différenciation et la maturation des adipocytes, mais également pour la synthèse et la sécrétion des adipokines (672,673). De ce fait, les dysfonctions mitochondriales retrouvées dans les situations d'obésité se traduisent par des défauts de stockage des lipides et de la sécrétion d'adipokines (674,675). En effet, l'obésité entraîne une diminution du nombre de mitochondries dans les adipocytes sous-cutanés et viscéraux indépendamment de leur taille, associée à une réduction de leur activité (pour revue (676)). De plus, les adipocytes d'individus obèses ont une consommation d'oxygène plus faible en réponse à une stimulation β -adrénergique comparativement aux adipocytes de sujets minces, se traduisant par une moindre production de chaleur (677,678).

Altérations de la sécrétion des adipokines - La fonction endocrine du tissu adipeux blanc, dont la sécrétion d'adiponectine et de leptine, est dépendante de l'intégrité mitochondriale (679). L'adiponectine est une adipokine dite « bénéfique » qui joue un rôle important dans l'amélioration de la sensibilité à l'insuline et la réduction des processus inflammatoires. Elle est sécrétée par les adipocytes dans la circulation sanguine sous la forme de trois complexes d'oligomères, comprenant un trimère (~ 67 kDa), un hexamère (~ 140 kDa) et un multimère de haut poids moléculaire (HMW) (~ 300 kDa) composé d'au moins 18 monomères (680). La synthèse de l'adiponectine HMW, qui est la principale isoforme bioactive met en jeu des modifications post-traductionnelles, dont l'hydroxylation et la glycosylation de plusieurs résidus lysine (681). L'adiponectine globulaire, dont sa sécrétion est inversement proportionnelle à la quantité de masse grasse, est également biologiquement active et obtenue par protéolyse des différentes conformations de l'adiponectine (682). Dans le tissu adipeux de sujets obèses, l'altération de la fonction mitochondriale et en particulier de la biogenèse altère la synthèse et la conformation de l'adiponectine (675).

Les interactions entre la leptine et l'inflammation sont bidirectionnelles. En effet, les cytokines pro-inflammatoires augmentent la synthèse et la libération de la leptine, qui à son tour contribue à maintenir un état inflammatoire chronique dans l'obésité (683). Par ailleurs, en condition d'hypoxie, le glycogène accumulé suite à une stimulation du captage du glucose dans les adipocytes est en partie responsable de l'altération de la sécrétion d'adipokines et en particulier de l'augmentation de la sécrétion de leptine (684).

Suite à son expansion et à l'infiltration macrophagique associée, le tissu adipeux augmente, proportionnellement à sa masse, la production et la sécrétion d'adipokines

pro-inflammatoires telles que TNF α , IL6 et IL1 β qui favorisent la résistance à l'insuline, induisent la lipolyse, et altèrent la fonction et la masse mitochondriale. (pour revue (676)). Ce remodelage pathologique du tissu adipeux favorise également le développement de la fibrose.

c. La fibrose du tissu adipeux

Les adipocytes sont maintenus par un réseau dense de matrice extracellulaire, qui ne sert pas seulement de support mécanique mais qui permet également de réguler le remodelage du tissu adipeux (685,686). Au cours de l'expansion du tissu adipeux, certains composants de la matrice extracellulaire dont l'isoforme VI du collagène et plusieurs métalloprotéases sont augmentés (686,687). Ces dernières sont des endopeptidases neutres qui clivent les composants de la matrice extracellulaire afin de permettre son remodelage. Or, dans le cadre de l'obésité, le remodelage actif de la matrice extracellulaire qui permet de s'adapter à la croissance du tissu adipeux aboutit à l'installation d'une fibrose et à une diminution de sa plasticité, qui sont des caractéristiques clés d'un tissu adipeux métaboliquement dysfonctionnel. En effet, il existe des corrélations entre des niveaux élevés de collagène VI, l'hyperglycémie et l'insulinorésistance (688,689). Par ailleurs, la réduction de l'isoforme VI du collagène entraîne une diminution de la fibrose et améliore ainsi des taux de survie des adipocytes en culture et leur métabolisme (686).

d. Le blanchissement du tissu adipeux brun

Chez les sujets obèses, le tissu adipeux brun, comme le tissu adipeux blanc, subit de profondes modifications délétères. Le blanchissement implique l'expansion du tissu adipeux blanc entourant les adipocytes bruns, mais également et principalement la conversion des adipocytes bruns en cellules uniloculaires blanches ayant peu ou pas de propriétés thermogéniques (690–692). Les adipocytes bruns « blanchis » conservent une faible expression d'UCP1, perdent progressivement l'expression de marqueurs d'adipocytes bruns, dont PRDM16 et PGC1 α , et commencent à exprimer les gènes codant pour les hormones spécifiques des adipocytes blancs, comme la leptine (692–694). Dans l'obésité, l'activation processus de blanchissement se traduit par une diminution des capacités thermogéniques du TAB qui contribue au développement de l'obésité et de ses complications associées telles que l'insulinorésistance (692,695). Au contraire, l'expression ectopique d'UCP1 dans le tissu adipeux blanc protège du développement de l'obésité (696).

Les processus de blanchissement des adipocytes bruns est retrouvé dans plusieurs modèles animaux tels que des souris acclimatées à des températures chaudes, ou déficientes

pour les récepteurs β -adrénergiques, le récepteur de la leptine (souris *db/db*), ou pour la lipase ATGL. Ces études suggèrent l'implication de chacun de ces facteurs dans l'initiation du blanchissement du TAB associé à l'obésité (692). D'autre part, le blanchiment du TAB est associé à l'augmentation de la production de cytokines pro-inflammatoires, de l'infiltration des macrophages, et la mort adipocytaire. En effet, la taille réduite des adipocytes « blanchis » par rapport aux adipocytes blancs leur confère une capacité de stockage de lipides limitée et une plus grande vulnérabilité face à la mort cellulaire. L'ensemble de ces altérations contribue à entretenir l'état pro-inflammatoire chronique lié à l'obésité (692).

5. Les effets délétères de l'insulino-résistance sur les cellules β -pancréatiques

La sécrétion d'insuline est 3 à 4 fois plus élevée chez les sujets obèses et insulino-résistants par rapport aux sujets normaux (697,698). Cette hypersécrétion a pour but de compenser son manque d'efficacité, et ainsi de protéger les individus de l'apparition d'une intolérance au glucose puis d'une hyperglycémie permanente (699). De ce fait, la perte de cette fonction compensatoire joue un rôle crucial dans l'installation de l'état diabétique (571,700).

Par ailleurs, la capacité de sécrétion des cellules pancréatiques est altérée chez les sujets diabétiques. En effet, ils présentent une perte du pic précoce de sécrétion d'insuline en réponse au glucose qui joue un rôle clé dans l'inhibition de la PHG par l'insuline (701,702). D'autre part, les patients diabétiques présentent une augmentation des concentrations plasmatiques de glucagon au cours du jeûne, et des défauts d'inhibition de sa sécrétion par la prise d'un repas. Ces anomalies sont consécutives à l'altération de la fonction β pancréatique (703,704). De plus, l'hyperglucagonémie jouerait un rôle important dans le maintien de l'hyperglycémie au cours du jeûne de sujets diabétiques de type 2 en induisant la PEG (704). Enfin, les patients diabétiques présentent également des anomalies de maturation de l'insuline qui se caractérise par une forte accumulation de la pro-insuline, qui est proportionnelle à l'hyperglycémie (705).

Dans les stades précoces du développement du DT2, l'hypersécrétion d'insuline résulte d'une augmentation de la masse des cellules β dans le pancréas endocrine (706). En effet, ces cellules tentent de compenser la résistance à l'insuline périphérique et l'hyperglycémie en sécrétant plus d'insuline. Néanmoins, les fortes concentrations de glucose et de lipides circulants, en provoquant des dysfonctionnements des cellules β , entraînent une perte progressive de leur masse par apoptose, qui se traduit par une diminution de la sécrétion d'insuline et conduit à l'intolérance au glucose (571,700). En effet, l'analyse post-mortem du

pancréas de patients diabétiques a révélé qu'ils ont une masse de cellules β est réduite de 40 à 60% par rapport aux sujets sains (707).

L'exposition prolongée des cellules β à de fortes concentrations de glucose conduit à des perturbations de la sécrétion d'insuline en impliquant différents mécanismes, dont l'apoptose, le stress oxydant et la dysfonction mitochondriale, le stress du RE, l'inflammation, la perturbation de l'homéostasie calcique ou encore l'autophagie (708–711). En effet, les marqueurs du stress du RE sont augmentés dans des îlots de patient DT2 (712). De plus, la glucotoxicité augmente également le stress oxydant en favorisant une production excessive de ROS, associée à une augmentation de l'apoptose (713). En plus, des effets néfastes d'une hyperglycémie, les fluctuations de la glycémie, comme celle retrouvées chez des patients pré-diabétiques, peuvent induire des altérations morphologiques des mitochondries dont une augmentation de leur taille et des altérations des crêtes mitochondriales (714,715). D'autre part, en réponse à l'accumulation de calcium ou de lipides, les mitochondries peuvent également libérer du cytochrome c dans le cytoplasme, qui est un activateur de l'apoptose (716).

Par ailleurs, les diabétiques présentent une augmentation de glucose mais également d'acides gras circulants. En effet, l'hyperglycémie favorise l'oxydation du glucose dans le pancréas qui entraîne la production de malonyl-CoA, qui bloque l'oxydation des acyl-CoA en inhibant leur transport par CPT1 dans la mitochondrie. Les lipides, et leurs dérivés, altèrent la fonction des cellules β qui peut conduire à la mort cellulaire (*voir paragraphe C-I-3b*) (717–719). Ces composés en excès exercent des effets toxiques sur les cellules β tels qu'une diminution de la sécrétion d'insuline en réponse au glucose, une altération de l'expression du gène de l'insuline, et une augmentation de la mort cellulaire (pour revue (720)). De plus, les acides gras libres participent également à l'installation d'une inflammation dans le pancréas, qui contribue à l'altération de la fonction et à la mort des cellules β (721).

Les adipokines sécrétées par le tissu adipeux régulent le fonctionnement des cellules β pancréatiques (pour revue (722)). La leptine exerce un puissant effet inhibiteur sur la synthèse d'insuline en diminuant l'expression du gène codant pour la pré-proinsuline et sur sa sécrétion (723). D'autre part, la diminution des taux d'adiponectine circulants associés à l'obésité provoque une disparition de ses effets bénéfiques, notamment sur la libération d'insuline en réponse au glucose et sur la prolifération des cellules β (724–728). De plus, l'adiponectine possède une activité céramidase, qui lui confère des effets protecteurs contre l'apoptose des cellules β induite par les lipides (729–731). Enfin, l'accumulation des dépôts d'amyloïdes au

sein des ilots β pancréatiques, qui sont observés dans 90 % des cas de diabète participent également au dysfonctionnement et à l'apoptose des cellules β (732).

Ainsi, dans les premières étapes du développement du diabète de type 2, les cellules β tentent de compenser la résistance périphérique à l'insuline en augmentant leur masse et leur capacité sécrétrice. Néanmoins, l'intégrité de ces cellules est altérée par l'excès de glucose et de lipides circulants menant à terme à une insuffisance pancréatique.

II. Les effets bénéfiques associés à la néoglucogenèse intestinale

L'intestin est l'un des trois organes capable de produire du glucose à partir de composés non glucidiques, tels que la glutamine (358). A l'état post-absorptif, la production de glucose par l'intestin ne représente qu'environ 5% de la PEG totale ; néanmoins sa contribution augmente significativement jusqu'à atteindre environ 20 % au cours d'un jeûne prolongé (24-48h) (**Figure 14**), ou encore en période post-absorptive lors d'un régime riche en protéines (279,350,358,360,733). L'induction de la NGI est impliquée dans les effets métaboliques bénéfiques obtenus lors de régimes enrichis en protéines ou en fibres et après une chirurgie bariatrique de type Roux-en-Y (pour revue (279)). De plus, la perfusion de glucose directement dans la veine porte, à des taux mimant l'induction du signal glucose portal par la NGI, améliore le métabolisme en diminuant à la fois la prise alimentaire et la glycémie (734).

1. Mécanismes impliqués dans les effets bénéfiques de la néoglucogenèse intestinale

a. Détection et initiation du signal glucose portal

La veine porte hépatique conduit le sang veineux provenant du tractus gastro-intestinal, du pancréas et de la rate vers le foie. De par sa localisation, elle est exposée à l'ensemble des signaux issus de l'alimentation, qui sont transmis au cerveau par l'intermédiaire de voies nerveuses afférentes vagale et spinale (159).

Dans des conditions d'induction de la NGI, le glucose produit est libéré dans la veine porte et initie un signal nerveux, le « signal glucose portal ». L'initiation de ce signal dépend de la détection du glucose par le cotransporteur glucose/sodium 3 (SGLT3). Plus précisément, la fixation d'une molécule de glucose sur SGLT3, provoque successivement l'entrée de deux ions sodium, l'activation des canaux calciques voltages dépendants et l'entrée de calcium qui permet la libération de sérotonine (5-HT) responsable de la stimulation des afférences vagales

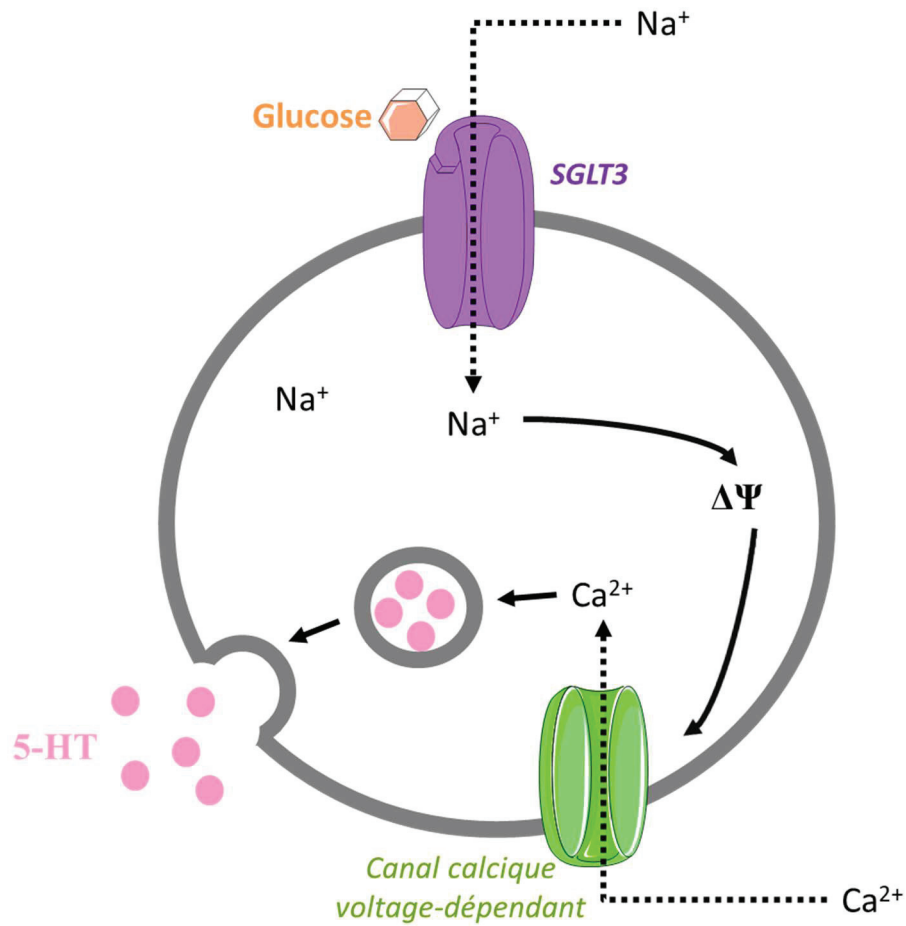


Figure 25 : Détection du glucose portal par SGLT3

La fixation d'une molécule de glucose sur SGLT3, provoque successivement 1/ l'entrée de deux ions sodium, 2/ l'activation des canaux calciques voltage dépendant, 3/ l'entrée de calcium qui permet la sécrétion de sérotonine.

Abréviations: $\Delta\Psi$ (variation du potentiel de membrane), SGLT3 (sodium/glucose cotransporter 3), Na⁺ (ion sodium), 5-HT (sérotonine), Ca²⁺ (ion calcium)

Adapté de Freeman et al., 2006.

grâce à l'activation de leur récepteurs 5-HT3 (**Figure 25**) (735). SGLT3 joue un rôle majeur dans la détection du glucose produit par l'intestin puisque l'ajout de phlorizine, un inhibiteur des SGLT, à une perfusion de glucose portale annule l'effet de ce dernier sur l'induction de la satiété (736).

Bien que la voie vagale soit la principale impliquée dans la transmission des signaux viscéraux afférents, nous avons montré qu'une ablation chirurgicale du nerf vague n'altérerait pas la transmission du signal glucose portal (736). A l'inverse, la dénervation de la veine porte par un traitement à la capsaïcine (qui active les récepteurs aux vanilloïdes de type 1 (TRPV1) qui sont principalement exprimés par les nerfs spinaux splanchniques) ou l'ablation du ganglion mésentérique splanchnique qui est relié à la moelle épinière, conduisent à une perte de la transmission du signal glucose portal (pour revue (279)). Ces résultats suggèrent fortement que le signal glucose portal serait relayé par les fibres afférentes de la voie spinale jusqu'au cerveau où il active des régions impliquées dans la régulation de l'homéostasie énergétique et glucidique, mais aussi du système de la récompense (279,736,737).

b. Mécanismes centraux impliqués dans les effets bénéfiques du signal glucose portal

L'activation du signal glucose portal conduit à l'augmentation de l'expression du marqueur d'activation neuronal C-FOS dans les principales régions hypothalamiques impliquées dans le contrôle de l'homéostasie énergétique, dont le noyau arqué, le DMN, le VMN, le PVN et le LH (279,733). En accord avec les résultats suggérant la transmission du signal glucose portal par la voie spinale, le glucose portal augmente l'expression de C-FOS dans le PBN (qui reçoit les afférences spinales), mais pas dans le NTS et l'*area postrema* (qui reçoivent les afférences vagales) (159,279,737).

Une étude récente du laboratoire a permis de préciser les mécanismes centraux impliqués dans les effets bénéfiques de la NGI, notamment sur la prise alimentaire (734). Nous avons montré qu'une perfusion de glucose directement dans la veine porte visant à mimer une induction de la NGI provoque une diminution de la prise alimentaire associée à une augmentation de la phosphorylation de STAT3 dans l'hypothalamus et plus précisément dans les neurones à POMC du noyau arqué chez la souris. Par ailleurs, l'administration intrapéritonéale d'un inhibiteur de la voie JAK2/STAT3 (AG490) juste avant le début de la perfusion de glucose dans la veine porte, annule ses effets anorexigènes, et confirme ainsi le rôle de STAT3 (734).

De façon intéressante, la perfusion de glucose portal contrecarre le comportement hyperphagique des souris *ob/ob*, en diminuant leur prise alimentaire de 20%, tout en induisant la phosphorylation de STAT3, indépendamment de la présence de la leptine. De plus, les effets bénéfiques du glucose portal et la phosphorylation de STAT3 sont absents chez les souris

invalidées pour le CGRP (souris *CGRP^{-/-}*) qui est un neuropeptide inhibiteur puissant de la prise alimentaire (738). De façon intéressante, le PBN est une cible du glucose portal et est composé de neurones qui expriment le CGRP (*voir paragraphe A-I-3b*) (738). Ainsi l'injection de CGRP au niveau central directement dans le 3^{ème} ventricule chez la souris induit la phosphorylation de STAT3 dans l'hypothalamus, de même que le traitement de cellules hypothalamique en culture en présence du neuropeptide.

D'après nos études, la NGI exerce ses effets métaboliques bénéfiques via : 1/ la phosphorylation de STAT3 dans l'hypothalamus et notamment au niveau des neurones POMC du noyau arqué, indépendamment de la présence de la leptine, et 2/ le neuropeptide CGRP (734).

2. Effets bénéfiques associés à l'induction de la néoglucogenèse intestinale

Le laboratoire a démontré au cours de ces dernières années que les effets bénéfiques des régimes riches en protéines ou en fibres exerçaient leurs effets en induisant la néoglucogenèse intestinale (pour revue (279)).

a. Les régimes riches en protéines

L'effet « coupe-faim » des régimes riches en protéines est connu depuis des décennies ; néanmoins les mécanismes impliqués n'avaient jamais été identifiés. En 2005, le laboratoire a montré le rôle clé de la NGI dans la médiation de ces effets (733). Lors de cette étude réalisée chez le rat en période post-absorptive, nous avons mis en évidence qu'une alimentation riche en protéines entraîne une diminution de la prise alimentaire, associée à une forte induction de l'expression des gènes clés de la PEG comme ceux codant pour la glutaminase, la G6PC et la PEPCK-c (733). De façon intéressante, ces effets sont absents chez des souris invalidées pour le gène *G6pc*, spécifiquement dans l'intestin et de ce fait déficiente pour la NGI (souris *I.G6pc^{-/-}*) (739). Par ailleurs, nous avons également montré que la NGI joue un rôle clé dans l'amélioration de la sensibilité hépatique à l'insuline dans le cadre des régimes riches en

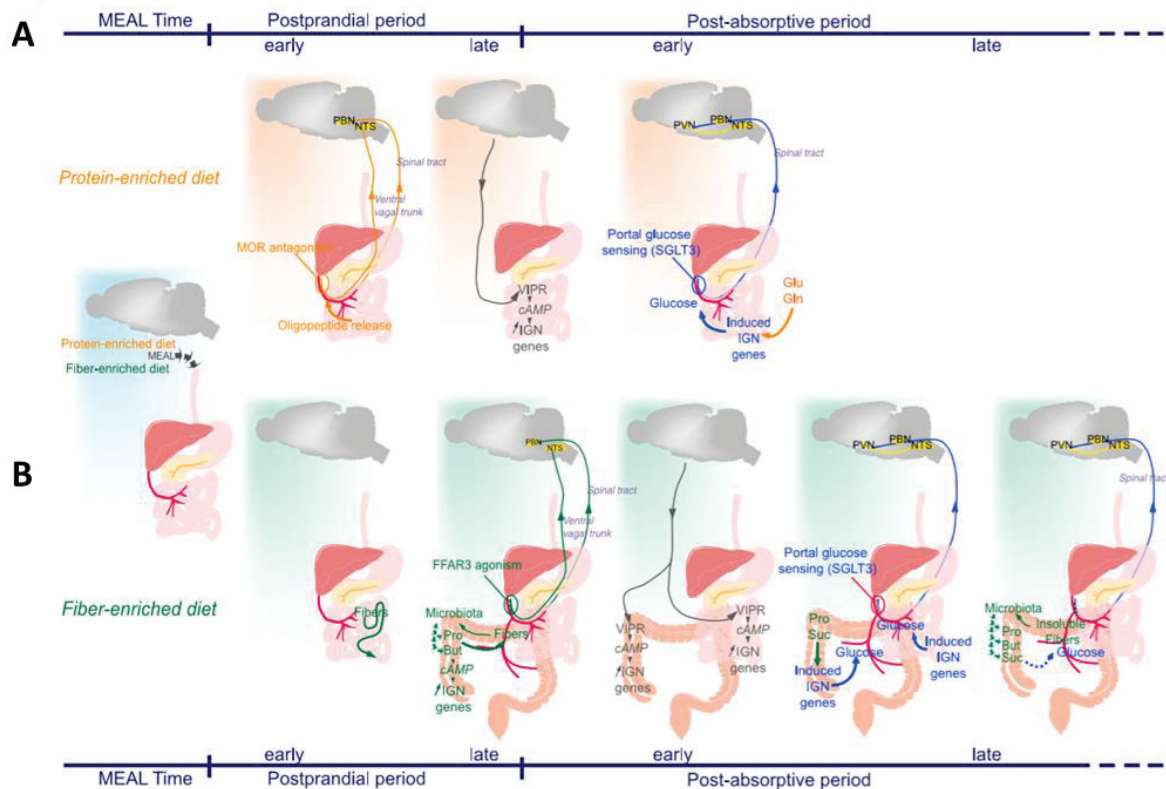


Figure 26 : Implication de la néoglucogenèse intestinale dans les effets bénéfiques des régimes riches en protéines (A) et en fibres (B).

(A) En période postprandiale, les peptides issus de la dégradation des protéines alimentaires agissent comme des antagonistes des récepteurs μ -opioïde (MOR). Cela se traduit par la transmission d'un message nerveux au cerveau qui active en retour la libération du peptide intestinal vasoactif (VIP) au niveau de l'intestin. La fixation de ce peptide sur son récepteur (VIPR) active l'adénylate cyclase et la production d'AMPc, connu pour induire l'expression des gènes impliqués dans la néoglucogenèse intestinale (NGI). En période post-absorptive, le glutamate (Glu) et la glutamine (Gln), provenant de la digestion des protéines alimentaires ou de la protéolyse musculaire, sont utilisés comme substrat de la NGI. Le glucose produit est détecté par le senseur du glucose SGLT3 (sodium/glucose cotransporteur 3), et informe les noyaux hypothalamiques impliqués dans la régulation de l'homéostasie glucidique et énergétique.

(B) A la fin de la période postprandiale et au début de la période post-absorptive, les fibres solubles qui ne sont pas métabolisées par les enzymes digestives des mammifères, sont fermentées par le microbiote au niveau de l'intestin distal en acides gras à courte chaîne, comme le propionate (Pro) et le butyrate (But). Le butyrate induit l'expression des gènes de la NGI via l'augmentation de la production d'AMPc. Le propionate, quant à lui, se fixe sur les récepteurs FFAR3 (Free Fatty Acid Receptor 3) et induit l'expression des gènes de la NGI (dans l'intestin proximal et distal) via la signalisation VIP. De plus, le succinate et le propionate sont des substrats de la NGI. Enfin, les fibres insolubles peuvent également être fermentées, mais plus tardivement.

D'après Soty et al., 2017

protéines chez le rat (740). Pendant la période post-prandiale, les oligopeptides issus de la digestion incomplète des protéines alimentaires libérés dans la veine porte bloquent les récepteurs μ -opioïdes (MOR) localisés sur les fibres nerveuses péri-portales et conduit à la transmission d'un signal nerveux par les afférences vagales et spinales (**Figure 26**) (741). En réponse, le cerveau via un signal nerveux stimule la libération du neuromédiateur VIP (vasoactive intestinal peptide), qui en se fixant sur son récepteur active l'adénylate cyclase et augmente la production d'AMPc, impliqué dans l'induction de l'expression des gènes de la néoglucogenèse dans les entérocytes (pour revue (279)). Pendant la période post-absorptive, l'induction des enzymes de la NGI prend progressivement place. De plus, la glutamine et le glutamate issus de la dégradation des protéines alimentaires sont utilisés en tant que substrats pour la production de glucose par l'intestin (733,741). De façon intéressante, les cibles hypothalamiques activées par les régimes riches en protéines sont comparables à celles activées par la perfusion de glucose directement dans la veine porte, mimant la NGI (737).

b. Les régimes riches en fibres

Alors que les effets bénéfiques des fibres alimentaires, notamment sur la sensibilité à l'insuline et la tolérance au glucose à la fois chez les sujets sains et les sujets obèses diabétiques, étaient connus depuis longtemps, notre laboratoire a mis en évidence le rôle clé de la NGI (742–745). En effet, l'enrichissement en fibres d'un régime délétère riche en gras et en sucre protège les souris et rats de la prise de poids, diminue la masse grasse et améliore la tolérance au glucose et la sensibilité à l'insuline, en augmentant l'expression des gènes de la NGI. De façon marquante, ces effets bénéfiques ne prennent pas place chez les souris *I.G6pc^{-/-}* (746).

La fermentation des fibres par le microbiote intestinal fournit des acides gras à courte chaîne, comme le butyrate et le propionate, mais aussi une grande quantité de succinate, qui sont capables d'induire la NGI par plusieurs mécanismes complémentaires (**Figure 26**) (279,746,747). Le butyrate active directement l'expression des gènes de la NGI dans les entérocytes en augmentant la concentration d'ATP, qui va activer l'adénylate cyclase par un effet substrat. La production d'AMPc entraîne ensuite l'induction de l'expression des gènes clés de la PEG (387,746,747). D'autre part, la fixation du propionate sur les récepteurs aux acides gras libres FFAR3 (free fatty acid receptor 3), exprimés par les fibres nerveuses péri-portales, initie un circuit nerveux qui aboutit à la libération locale de VIP. La fixation de ce peptide sur ses récepteurs augmente le taux d'AMPc, qui est responsable de l'activation des gènes de la NGI (748). D'autre part, le propionate, au même titre que le succinate, est utilisé comme substrat pour la production de glucose par l'intestin (746,747).

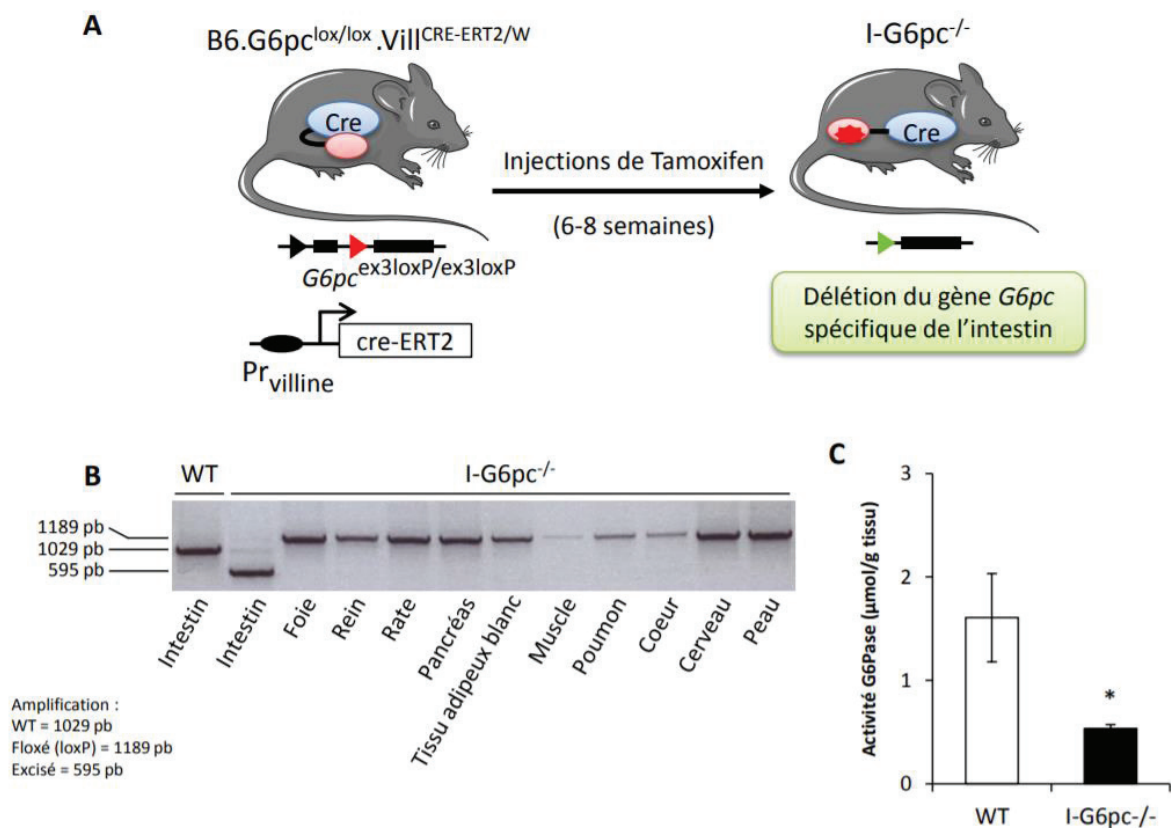


Figure 27 : Modèle murin d'inactivation de la néoglucogenèse intestinale

(A) Schéma de la génération des souris I.G6pc^{-/-} grâce au système Cre/loxP. L'exon 3 du gène *G6pc* est encadré par deux séquences loxP. L'expression de la recombinase *Cre-ERT2* est placée sous le contrôle du promoteur de la villine. L'inactivation du gène *G6pc* est obtenue par l'administration de tamoxifène (un antagoniste des récepteurs aux œstrogènes). Plus précisément, l'activation de la protéine de fusion Cre-ERT2, préalablement retenue dans le cytoplasme, par le tamoxifène, entraîne sa migration dans le noyau et provoque le clivage de l'exon 3 du gène *G6pc* au niveau des sites loxP.

(B) Analyse par PCR (cinq semaines après l'injection de tamoxifène) permettant de vérifier l'excision totale de l'exon 3 du gène *G6pc* (fragment de 595 pb chez les souris I-G6pc^{-/-}) spécifiquement dans l'intestin,

(C) Une activité enzymatique de la G6Pase intestinale résiduelle et non spécifique est observée dans l'intestin des souris IG6pc^{-/-}.

Abréviations: Pr (promoteur), WT (wild-type), pb (paire de bases), * (p < 0,05 test t de Student)

D'après Sinet, 2016

Ainsi, les fibres alimentaires sont capables à la fois d'induire les gènes de la NGI dès la phase post-prandiale, mais aussi d'exercer des effets bénéfiques à plus long terme grâce à la digestion retardée et distale des fibres insolubles par le microbiote intestinale (279,749).

3. Les effets délétères associés à l'invalidation de la néoglucogenèse intestinale

Afin de mieux comprendre les effets bénéfiques de la NGI sur le métabolisme, le laboratoire a créé un modèle murin d'invalidation inductible du gène *G6pc*, spécifiquement dans l'intestin.

a. Le modèle murin

Le modèle d'invalidation de la NGI (souris I.G6pc^{-/-}) repose sur une stratégie CRE-lox inductible, à l'âge adulte, par l'injection de tamoxifène (**Figure 27**) (739). Plus précisément, des sites loxP sont introduits dans les introns de part et d'autre de l'exon 3 du gène codant pour la sous-unité catalytique de la G6Pase. L'expression de la recombinaison CRE-ERT2 est placée sous le contrôle du promoteur de la villine, spécifiquement exprimé dans l'intestin. Cette protéine de fusion entre la recombinaison CRE et le domaine de fixation au ligand du récepteur aux œstrogènes ERT2 est capable d'être activée par le tamoxifène. En effet, l'injection de tamoxifène chez des souris à l'âge adulte (6 à 8 semaines) induit un changement de conformation de la recombinaison Cre-ERT2 et sa translocation dans le noyau où elle va reconnaître spécifiquement les séquences loxP et induire l'excision de la séquence nucléotidique qu'ils encadrent.

Lors de la caractérisation de ce modèle, l'excision de l'exon 3 *G6pc* a été confirmée dans l'intestin, même si il est possible de mesurer une activité phosphatase intestinale résiduelle et non spécifique (**Figure 27**) (739).

b. L'absence de néoglucogenèse intestinale favorise l'installation d'un état prédiabétique

En régime standard, les souris I.G6pc^{-/-} présentent des altérations métaboliques caractéristiques d'un état pré-diabétique telles qu'une légère hyperglycémie, une hyper-insulinémie au cours du jeûne et des défauts de la fonction pancréatique. En effet, les îlots pancréatiques isolés de souris I.G6pc^{-/-} présentent une augmentation de la sécrétion d'insuline basale, et une altération de la sécrétion d'insuline en réponse au glucose (750). Ces souris développent également une altération de la tolérance au glucose et de la sensibilité à l'insuline

avec un défaut de l'inhibition de la PHG par l'insuline (750). De plus, l'absence de NGI accélère l'apparition des altérations métaboliques associées au diabète dans un contexte délétère tel qu'un régime riche en gras et en sucre (750).

De façon intéressante, l'absence de NGI suffit à induire des défauts du fonctionnement hypothalamique et notamment une résistance à la leptine dans l'hypothalamus (750). En effet, ces souris présentent une moindre diminution de la prise alimentaire suite à l'administration périphérique de leptine et un défaut d'activation de la voie de signalisation de cette hormone au niveau hypothalamique. De façon marquante, la perfusion de glucose directement dans la veine porte, visant à restaurer le signal glucose portal, corrige les défauts métaboliques et la résistance à la leptine chez les souris *I.G6pc^{-/-}*.

Ainsi, l'ensemble de ces résultats suggère que la NGI, via l'induction du signal glucose portal associée, est une fonction essentielle dans le maintien de l'homéostasie glucidique et énergétique.

HYPOTHESES DE TRAVAIL
ET DEMARCHE EXPERIMENTALE

L'obésité, définie comme une épidémie par l'OMS depuis 1997, voit sa prévalence croître chaque année et devrait toucher un quart de la population mondiale d'ici 2045. Cette maladie chronique qui se caractérise par une augmentation excessive de la masse grasse, apparaît à la suite d'un déséquilibre de la balance énergétique, avec une augmentation des apports caloriques et une diminution de la dépense d'énergie. L'obésité est une maladie qui altère considérablement la qualité de vie et représente la 4^{ème} cause mondiale de mortalité (751). Elle est associée au développement de nombreuses complications métaboliques, dont le diabète de type 2, la stéatose hépatique, la dyslipidémie, et prédispose les patients à l'apparition de différents troubles, dont les maladies cardiovasculaires, les néphropathies, les rétinopathies, ou encore le développement de tumeurs (567–570). Cette pathologie modifie le métabolisme des individus et touche de nombreux organes. Ainsi, la mise en évidence de nouvelles cibles thérapeutiques est un enjeu majeur de santé publique, à l'échelle mondiale.

Dans ce contexte, le laboratoire a mis en évidence une nouvelle fonction métabolique bénéfique, la NGI, qui pourrait constituer une cible thérapeutique importante dans la lutte contre l'obésité et ses pathologies associées (279,361,733,746). Le laboratoire a montré que l'induction de la NGI est notamment responsable des effets métaboliques bénéfiques des régimes enrichis en protéines ou en fibres, et également de ceux qui prennent place après une chirurgie de l'obésité de type bypass (733,741,746,752). En effet, nous avons montré que contrairement aux effets délétères attribués à l'induction de la PHG, tels que le développement de l'insulino-résistance et du DT2, l'induction de la NGI est quant-à-elle associée à des effets bénéfiques tels qu'une diminution de la prise alimentaire, du poids et de la production hépatique de glucose qui est associée à une amélioration du contrôle glycémique et de la sensibilité à l'insuline (pour revue (279)). De façon intéressante, ces effets bénéfiques ne prennent pas place dans un modèle murin d'inactivation de la NGI (souris I.G6pc^{-/-}) (739,746). Lors de la caractérisation du phénotype de ces souris nourries avec un régime standard nous avons mis en évidence qu'elles présentent toutes les caractéristiques métaboliques d'un état pré-diabétique (750). Plus précisément, les souris I.G6pc^{-/-} présentent une légère hyperglycémie et une hyperinsulinémie au cours du jeûne, une altération de la tolérance au glucose et à la sensibilité à l'insuline, notamment au niveau hépatique, et des défauts de la sécrétion d'insuline (750). De plus, l'installation de ces défauts est accélérée lorsque ces souris sont nourries avec un régime HF-HS (750). Ainsi, ces résultats démontrent que l'absence de la NGI est suffisante pour induire des effets métaboliques délétères.

Afin de mieux comprendre le rôle de la NGI, en soit, en absence de toute manipulation nutritionnelle, nous avons créé une lignée de souris transgénique qui sur-exprime constitutivement la sous-unité catalytique de la G6Pase, spécifiquement dans l'intestin (Souris I.G6pc^{overexp}).

Sur la base des travaux précédents du laboratoire, mon étude vise à préciser les effets de l'absence ou de l'induction de la NGI sur le métabolisme glucidique et énergétique en comparant les modèles d'inactivation et d'induction de la NGI, nourris avec un régime standard et HF-HS pendant 5 mois, respectivement.

Selon la même démarche réalisée avec les souris I.G6pc^{-/-} avant mon arrivée au laboratoire, j'ai réalisé la caractérisation du phénotype de cette nouvelle lignée de souris I.G6pc^{overexp} (750). Au cours de cette première étape, j'ai cherché à déterminer si en miroir de son absence, l'induction de la NGI pouvait retarder l'apparition du diabète induit par un régime hypercalorique en améliorant le contrôle glycémique.

Ensuite, j'ai approfondi l'étude de l'impact de la NGI dans la régulation de l'homéostasie énergétique. Plus précisément, mon travail a consisté à déterminer son rôle dans le développement de l'obésité et de ses complications métaboliques associées au niveau de deux tissus clés, le foie et le tissu adipeux.

La stéatose hépatique est une des complications majeures de l'obésité qui est étroitement liée à l'état d'insulino-résistance. Ces défauts peuvent apparaître séquentiellement ou simultanément en fonction des patients. Sur la base de ces données, j'ai cherché à déterminer si la résistance à l'insuline observée chez les souris I.G6pc^{-/-} était associée à l'installation d'une stéatose hépatique et si au contraire l'induction de la NGI pouvait être protectrice. Les résultats obtenus dans ce cadre de cette étude sont présentés sous forme d'un article en anglais publié dans la revue Gut (753).

D'autre part, au cours du développement de l'obésité, le tissu adipeux subit des modifications métaboliques délétères qui peuvent avoir des répercussions négatives sur le fonctionnement d'autres tissus, dont le foie. Ainsi, j'ai exploré le rôle de la NGI dans l'apparition de ces altérations en évaluant plusieurs paramètres dans le tissu adipeux blanc et brun, tels que le stockage des lipides, la lipolyse, la thermogenèse et la sécrétion d'adipokines pro-inflammatoires et l'adiponectine. Les résultats obtenus dans ce cadre de cette étude sont

présentés sous forme d'un article en anglais que nous soumettrons prochainement pour publication.

Mon étude pourrait apporter la preuve de concept que la NGI peut être utilisée comme une cible thérapeutique pour prévenir et/ou corriger les troubles métaboliques dans l'obésité et le T2D. Cela pourrait ouvrir la voie à de nouvelles approches de traitement et/ou de prévention des maladies métaboliques.

RESULTATS

A. Rôle de la NGI dans le développement de l'obésité, du diabète et de la stéatose hépatique

Un déséquilibre de la balance énergétique caractérisé par une diminution de la dépense énergétique au profit d'une augmentation de la quantité de calories ingérées conduit classiquement au développement de l'obésité qui se caractérise par une augmentation excessive de la masse grasse. Cette maladie chronique est définie comme une épidémie par l'OMS depuis 1997 et voit sa prévalence augmenter chaque année. De plus, l'obésité est associée à un risque accru de développer d'autres pathologies telles que le DT2 ou encore la stéatose hépatique (567–570). Dans ce contexte, le laboratoire a mis en évidence les effets métaboliques bénéfiques associés à l'induction de la NGI, une fonction qui pourrait représenter une cible thérapeutique intéressante dans la lutte contre le développement de l'obésité et de ses pathologies associées (279,733,741,746,752).

L'objectif de cette étude était de déterminer le rôle de la NGI, en tant que telle, dans le développement de l'obésité et de deux de ses complications majeures que sont le DT2 et la stéatose hépatique. Afin de répondre à cette problématique, nous avons créé un modèle murin de surexpression constitutive de la glucose-6 phosphatase (G6Pase), l'enzyme clé de la production endogène de glucose, spécifiquement dans l'intestin (souris I.G6pc^{overexp}). Puis, nous avons caractérisé le phénotype de ces souris soumises à un régime délétère riche en graisses et en sucres (HF-HS) pendant 5 mois. D'autre part, nous avons étudié les effets métaboliques d'une absence de la NGI dans un modèle de délétion inductible de la G6Pase intestinale (souris I.G6pc^{-/-}) soumis à un régime standard.

Dans cette étude, nous avons montré que les souris I.G6pc^{overexp} prennent moins de poids que les souris témoins nourries en régime HF-HS malgré une prise alimentaire identique. Contrairement à l'absence de la NGI qui conduit à l'apparition des caractéristiques métaboliques du pré-diabète, l'induction de la NGI retarde l'apparition du diabète induit par un régime hypercalorique en améliorant la sensibilité à l'insuline et la tolérance au glucose (750). Ainsi, dans notre modèle, l'induction de la NGI protège les souris du développement de l'obésité et du DT2, mais également de la stéatose hépatique induite par un régime délétère. En effet, les souris I.G6pc^{overexp} présentent une diminution du contenu lipidique dans le foie associée à une réduction du captage des lipides et de la lipogenèse *de novo*. Au contraire, malgré un régime alimentaire standard, les souris I.G6pc^{-/-} montrent une augmentation du contenu en lipides hépatique associée à une stimulation du captage et de la lipogenèse *de novo*.

L'augmentation du nombre de fibres nerveuses exprimant la tyrosine hydroxylase dans le foie des souris I.G6pc^{overexp} suggère que la NGI pourrait exercer ses effets bénéfiques sur le métabolisme hépatique par l'intermédiaire d'une stimulation sympathique (754,755).

La stéatose hépatique étant souvent accompagnée de l'apparition d'un état inflammatoire et fibrotique, nous avons étudié le rôle de la NGI dans la progression de la NAFLD (pour revue (756)). Ainsi, nous avons mis en évidence que l'induction de la NGI est associée à une diminution de l'expression des gènes impliqués dans l'inflammation et la fibrose et en miroir que l'absence de NGI entraîne une augmentation de l'expression de ces marqueurs dans le foie.

En conclusion, la NGI joue un rôle protecteur important dans le développement de l'obésité et de deux de ses complications associées que sont le DT2 et la stéatose hépatique. Alors que les études précédentes du laboratoire, basées sur l'étude du rôle de la NGI induite par certaines manipulations nutritionnelles, montraient ses effets bénéfiques sur le maintien du poids corporel et le contrôle glycémique, cette étude permet d'élargir l'impact positif de la NGI, en tant que telle, sur le métabolisme lipidique hépatique (279,733,741,746,752). Les résultats de cette étude ont récemment été publiés dans la revue « Gut » (753).

ORIGINAL RESEARCH

Intestinal gluconeogenesis prevents obesity-linked liver steatosis and non-alcoholic fatty liver disease

Justine Vily-Petit,^{1,2} Maud Soty-Roca,^{1,2} Marine Silva,^{1,2} Margaux Raffin,^{1,2}
Amandine Gautier-Stein,^{1,2} Fabienne Rajas,^{1,2} Gilles Mithieux ^{1,2}

► Additional material is published online only. To view please visit the journal online (<http://dx.doi.org/10.1136/gutjnl-2019-319745>).

¹U1213 Nutrition, Diabetes and the Brain, Institut national de la santé et de la recherche médicale, Lyon, France
²U1213 Nutrition, Diabetes and the Brain, Université Lyon 1 Faculté de Médecine Lyon-Est, Lyon, France

Correspondence to

Dr Gilles Mithieux, U1213, Institut national de la santé et de la recherche médicale, Lyon 69372, France; gilles.mithieux@inserm.fr

Received 28 August 2019
Revised 14 February 2020
Accepted 28 February 2020

ABSTRACT

Objective Hepatic steatosis accompanying obesity is a major health concern, since it may initiate non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) and associated complications like cirrhosis or cancer. Intestinal gluconeogenesis (IGN) is a recently described function that contributes to the metabolic benefits of specific macronutrients as protein or soluble fibre, *via* the initiation of a gut-brain nervous signal triggering brain-dependent regulations of peripheral metabolism. Here, we investigate the effects of IGN on liver metabolism, independently of its induction by the aforementioned macronutrients.

Design To study the specific effects of IGN on hepatic metabolism, we used two transgenic mouse lines: one is knocked down for and the other overexpresses glucose-6-phosphatase, the key enzyme of endogenous glucose production, specifically in the intestine.

Results We report that mice with a genetic overexpression of IGN are notably protected from the development of hepatic steatosis and the initiation of NAFLD on a hypercaloric diet. The protection relates to a diminution of *de novo* lipogenesis and lipid import, associated with benefits at the level of inflammation and fibrosis and linked to autonomous nervous system. Conversely, mice with genetic suppression of IGN spontaneously exhibit increased hepatic triglyceride storage associated with activated lipogenesis pathway, in the context of standard starch-enriched diet. The latter is corrected by portal glucose infusion mimicking IGN.

Conclusion We conclude that IGN *per se* has the capacity of preventing hepatic steatosis and its eventual evolution toward NAFLD.

INTRODUCTION

The last decades have seen an alarming increase worldwide in the prevalence of obesity, which is now qualified of epidemic by the WHO.¹ This metabolic state is associated with many complications including, type 2 diabetes (T2D) and non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD).^{2,3} Moreover, it is an important risk factor for many serious health problems as retinopathy, nephropathy, neuropathy, cardiovascular diseases and various cancer types.^{2,4,5}

The different metabolic complications of obesity or T2D can occur sequentially or simultaneously depending on the patient. During obesity development, food excess can lead to ectopic fat storage in the liver, which causes a defect in hepatic insulin sensitivity that can lead to the development of T2D.⁶ In parallel, even in the insulin resistance

Significance of this study

What is already known on this subject?

- The accumulation of lipid in the liver is a major complication of obesity, since it can lead to serious health problems as hepatic cirrhosis or even liver cancer.
- A recently described function, intestinal gluconeogenesis (IGN), positively regulates glucose and energy homeostasis and exerts anti-diabetes and anti-obesity effects.
- Induced IGN minors body weight gain, reduces hepatic glucose production and improves insulin sensitivity and overall glucose control in the context of nutrition-based manipulations as protein-enriched or fibre-enriched diets or in response to gastric bypass surgery.
- These nutrition-induced metabolic benefits are substantially blunted in mice with an intestine-specific knockout of gluconeogenesis.

What are the new findings?

- We assess here the proper effect of IGN, that is, independently of any nutritional manipulation, in metabolic control and more specifically on hepatic steatosis, a question not previously addressed.
- Increased IGN improves glucose control and prevents the set up of hyperglycaemia under high-fat/high-sucrose (HF-HS) diet.
- Increased IGN markedly moderates hepatic steatosis and its eventual evolution toward non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) under HF-HS diet.
- IGN preventive actions are associated with increased innervation of the liver by tyrosine hydroxylase-expressing neurons.
- Conversely, the suppression of IGN promotes the accumulation of lipid in the liver even in the context of standard starch diet.

state featuring T2D, the stimulation of lipogenesis remains preserved in the liver, which permits the maintaining of insulin-dependent lipid storage.⁷ Therefore, the set-up of T2D can also promote lipid accumulation in the liver.³

On the ground of hepatic steatosis, a continuum of liver abnormalities, the so-called NAFLD, may take place. The liver can remain fatty without disturbed cellular function or progressively evolve



© Author(s) (or their employer(s)) 2020. No commercial re-use. See rights and permissions. Published by BMJ.

To cite: Vily-Petit J, Soty-Roca M, Silva M, *et al.* *Gut* Epub ahead of print: [please include Day Month Year]. doi:10.1136/gutjnl-2019-319745

Significance of this study

How might it impact on clinical practice in the foreseeable future?

- ▶ In humans, the positive metabolic outcomes of gastric bypass surgery have been associated with both increased IGN and correction of hepatic steatosis and NAFLD features.
- ▶ That IGN controls hepatic lipid metabolism pave the way to novel therapeutic approaches (prevention or correction) based on IGN (*via* its manipulation by nutrients or drugs) against this serious metabolic consequence of obesity that is hepatic steatosis and NAFLD.

by various mechanisms from lipid accumulation to non-alcoholic steatohepatitis (NASH), a state in which steatosis may then combine with inflammation and/or fibrosis. In some cases, further worsening can lead to cirrhosis and even liver cancer (for review see reference 8). Furthermore, it is more and more frequent to observe the development of liver cancers in the context of steatosis without fibrosis or cirrhosis.^{9–11} So, there is currently a huge interest to decipher the mechanisms underlying the development of hepatic steatosis and NAFLD and to identify any means to prevent it.

In this context, it is noteworthy that a recently described function, intestinal gluconeogenesis (IGN), positively interferes with the control of glucose and energy homeostasis to exert anti-diabetes and anti-obesity effects. Glucose released in the portal vein is sensed by a glucose receptor present in the neural system (sodium-glucose co-transporter 3, SGLT3), which initiates a nervous signal to the hypothalamus.^{12–14} The induction of IGN minors body weight gain, reduces hepatic glucose production and improves insulin sensitivity and overall glucose control.^{14–17} This was previously observed in response to various nutritional manipulations such as on protein-enriched or fiber-enriched diets, or after gastric bypass surgery of obesity.^{15–20} While the nutrient-induced benefits were substantially blunted in mice with an intestine-specific knockout of the glucose-6 phosphatase (G6Pase) catalytic subunit (G6PC), this did not allow us to unequivocally evaluate the role of IGN *per se* in these benefits.^{18,21} To assess the proper effect of IGN, that is, independently of nutritional manipulation, in metabolic control has been a major preoccupation in our ongoing works.

In particular, the eventual interference of IGN with the development of hepatic steatosis and eventually NAFLD induced by a deleterious diet remained an outstanding question, not addressed in our previous works. Therefore, we combined here studies using mice with an intestine-targeted knockout of IGN and mice with an intestine-targeted overexpression of IGN to document this important question.

METHODS

Animals and diets

We used two murine models related to IGN: a knockout model (I.G6pc^{-/-} mice), previously described,²² and a novel model of activated IGN (I.G6pc^{overexp} mice), based on the overexpression of G6PC, that is, the catalytic subunit of G6Pase, the crucial enzyme of gluconeogenesis, specifically in the intestine (see below). Wild-type C57Bl6/J (WT, Charles River Laboratories, France) mice were housed in parallel and used as control mice. All the mice were housed in the animal facility of Lyon 1 University ('Animalerie Lyon Est Conventiionnelle and Specific Pathogen Free') under controlled temperature (22°C) conditions,

with a 12 hours light/dark cycle, and *ad libitum* access to water and food. I.G6pc^{-/-} mice were fed a standard chow diet and I.G6pc^{overexp} mice were fed a high-fat/high-sucrose diet (HF-HS) (see online supplementary methods for diet composition).

All procedures were performed in accordance with the principles and guidelines established by the European Convention for the protection of Laboratory Animals. The regional animal care committee (CEEAA-55, University Lyon I, France) approved all the experiments herein.

Glucose/insulin tolerance tests

Glucose tolerance test (GTT) and insulin tolerance test (ITT) were performed, respectively, in 16 hour-fasted and 6 hour-fasted in I.G6pc^{overexp} and WT mice after 3 months on HF-HS diet. After intraperitoneal injection of glucose (0.75 g/kg bw (body weight)) or insulin (0.75 U/kg bw), blood glucose was monitored for 120 or 150 min using a glucometer from blood samples collected from the tail vein.

Portal glucose infusion

A catheter was inserted into the portal vein of I.G6pc^{-/-} mice under isoflurane anaesthesia (2%). After 7 days, a 0.9% saline or 20% glucose was infused at 40 µmol/kg/min for 24 hours in conscious mice having free access to water and food. Then, they were killed, and the livers were collected and frozen by freeze-clamping at the temperature of liquid nitrogen and stored at -80°C (see online supplementary methods for more information).

Plasma parameters

Blood was withdrawn from the submandibular vein and collected in ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA) and conserved at -20°C. Plasma triglycerides (TG), cholesterol and non-esterified fatty acids (NEFA) concentrations were determined with colorimetric kits. Plasma insulin and glucagon concentrations were quantified using Mouse ELISA kits.

Histological and immunofluorescence analysis

For livers histological analyses, formalin-fixed and paraffin-embedded tissues were cut in 4 µm thick sections and stained with haematoxylin and eosin staining or Masson's Trichrome staining. The sections were examined under an inverted microscope.

For livers tyrosine hydroxylase (TH) labelling, mice were perfused transcardially with ice-cold 4% paraformaldehyde, and the livers were removed in cryopreservation solution. Then, livers were cut into 40 µm thick section, using a cryostat. Immunostaining with TH primary antibody and Alexa 546 goat anti-rabbit IgG conjugated secondary antibodies was performed. Cell nuclei were stained with Hoechst. Confocal images of randomly selected portal areas of the liver (three to five per liver) were acquired on a confocal laser scanning microscope. For each image, we quantified TH labelling area in relation to the total area (see online supplementary methods for more information).

Glycogen assay

Hepatic glycogen was extracted by the Keppler and Decker method, as previously described.²³ Briefly, glycogen was hydrolysed, and the glucose released was measured by colorimetric assay (see online supplementary methods for more information).

Triglyceride assay

Liver triglycerides were extracted using Folch extraction procedure, as previously described.²⁴ Triglycerides were measured

with a colorimetric kit (see online supplementary methods for more information).

Western blot analysis

Cell extracts from livers were lysed, and aliquots of 30 µg proteins were separated by sodium dodecyl sulfate (SDS) polyacrylamide gel electrophoresis and then transferred to polyvinylidene difluoride (PVDF) Immobilon membranes. After saturation, the membranes were probed with primary antibodies and then with goat secondary anti-rabbit IgG linked to peroxidase. The intensity of the spots was determined by densitometry (see online supplementary methods for more information).

Gene expression analysis

Cell extracts from livers were lysed and total RNAs were isolated according to the Trizol protocol. A reverse transcription and real-time qPCRs were performed using sequence-specific primers (see online supplementary methods for more information).

Glucose-6-phosphatase activity analysis

The intestine, liver and kidney were sampled as previously described.²⁵ G6Pase activity was assayed in homogenates in the presence of a saturating glucose-6-phosphate concentration^{25 26} (see online supplementary methods for more information).

Statistical analysis

All data are presented as mean±SEM. Two-group comparisons were analysed using unpaired t-test, and multiple comparisons were analysed using two-way analysis of variance followed by a Bonferroni post-hoc test. Values were considered significant at * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$. Statistical details and exact value of 'n' can be found in the figure legends. Statistical analyses were performed with GraphPad Prism 6 software.

RESULTS

The induction of intestinal gluconeogenesis prevents the development of obesity and the deterioration of glucose control in mice fed a high-fat/high-sucrose diet

To assess whether IGN per se could prevent the development of obesity and its associated complications, that is, independently of its activation on specific nutritional manipulations (see above), we generated a murine model of intestine-targeted G6Pase overexpression, based on the insertion of the complementary DNA (cDNA) of its catalytic subunit (*G6pc*) in the *Rosa26* locus. The latter is capable of exhibiting strong transcriptional activity, but is blocked here by a stop cassette of the *Rosa26* transcription initiation flanked with lox sequences (figure 1A). The excision of lox sequences to remove the stop cassette was made possible by crossing these mice with mice expressing the CRE recombinase under the control of the Villin promoter, allowing us to generate mice overexpressing *G6pc* in the intestine (I.G6pc^{overexp}). These mice were backcrossed on a C57Bl6/J genetic background. Western blot analysis revealed that the G6PC protein was four-fold-overexpressed in the intestine (proximal part of the jejunum), while no change was observed in the liver and kidneys (figure 1B). Moreover, the enzymatic activity of G6Pase was approximately three-fold-increased in the intestine, while it was unchanged in the liver and kidneys (figure 1C). This demonstrated the specificity of the overexpression of *G6pc* in the intestine in this new murine model.

Then, I.G6pc^{overexp} and WT mice were fed a HF-HS diet for 12 weeks. It is noteworthy that, despite food intake was comparable in I.G6pc^{overexp} and WT mice, the increase in body weight

was markedly attenuated in I.G6pc^{overexp} compared with WT mice (figure 1D,E). Furthermore, mice overexpressing G6Pase in the intestine showed a better glucose tolerance (figure 2A,C). This might be explained by an improvement in insulin tolerance in I.G6pc^{overexp} compared with WT mice (figure 2B,D). Consistently, the plasma insulin concentration of I.G6pc^{overexp} mice 6 hours after food removal was lower than that of WT mice (figure 2E), which was associated with a greater basal phosphorylation level of AKT in the mice (figure 2F). These data were in agreement with a higher insulin sensitivity of I.G6pc^{overexp} compared with WT mice. It is of note that plasma glucagon concentration was not modified in I.G6pc^{overexp} compared with WT mice (figure 2E). Finally, we measured blood glucose after overnight fasting along the 3 months preceding the glucose and insulin tolerance tests. Overnight-fasted plasma glucose was progressively increased in both WT and I.G6pc^{overexp} during the two first months on HF-HS feeding (figure 2G). It is noteworthy that I.G6pc^{overexp} showed a clear moderation of the development of fasting hyperglycaemia compared with WT mice after 3 months under HF-HS diet (figure 2G). Together, these results suggest that an activation of IGN per se protects mice from the development of obesity and the deterioration of glucose control promoted by a HF-HS diet.

Intestinal gluconeogenesis prevents the development of hepatic steatosis promoted by a HF-HS diet

Then, we assessed whether IGN could interfere with the development of hepatic steatosis on prolonged deleterious feeding. After 5 months under HF-HS diet, compared with WT mice, I.G6pc^{overexp} mice exhibited a lower liver weight associated with a two-fold-decrease in hepatic triglyceride content, in absence of a change in hepatic glycogen content (figure 3A). No change was observed in plasma lipid and lipoprotein parameters (see online supplementary figure 1). To decipher the mechanisms leading to the attenuation of liver steatosis in I.G6pc^{overexp} mice, we studied de novo lipogenesis and β-oxidation pathways. The diminution in hepatic steatosis in I.G6pc^{overexp} mice was associated with a decrease in the expression of several genes involved in lipogenesis, including: *Fasn* (fatty acid synthase), *Acaca* (acetyl-CoA carboxylase 1) and the transcription factor *Srebp1c* (sterol regulatory element-binding protein) (figure 3B). In addition I.G6pc^{overexp} mice showed a significant decrease in expression of *Cd36* (cluster of differentiation 36) in liver (figure 3C), suggesting a decrease in hepatic lipid uptake in addition to the decrease in lipogenesis. In keeping with the decreased hepatic triglyceride content, the histological analysis of the livers showed a dramatic diminution in the amount of lipid droplets in the liver of I.G6pc^{overexp} compared with WT mice (figure 3D). Unexpectedly, the messengerRNA (mRNA) expression level of carnitine-palmitoyltransferase-1, a key enzyme in intra-mitochondrial fatty acyl-CoA transport, and some proteins regulating fatty acid oxidation, or directly involved in this pathway, was also decreased in the liver of I.G6pc^{overexp} mice compared with WT mice (figure 3E). We previously reported that IGN mobilises key peripheral functions involved in energy homeostasis via the mean of the autonomous nervous system after a hypothalamic relay.²⁷ We thus visualised liver TH-expressing neurons to evaluate the involvement of a neural pathway in the hepatic lipid-related events observed here. It is noteworthy that the number of TH-expressing neurons was increased 2.7 times in the liver of I.G6pc^{overexp} mice (figure 3F).

To sum up, the activation of IGN is associated with the development of local sympathetic innervation and prevents hepatic lipid accumulation promoted by a hypercaloric diet.

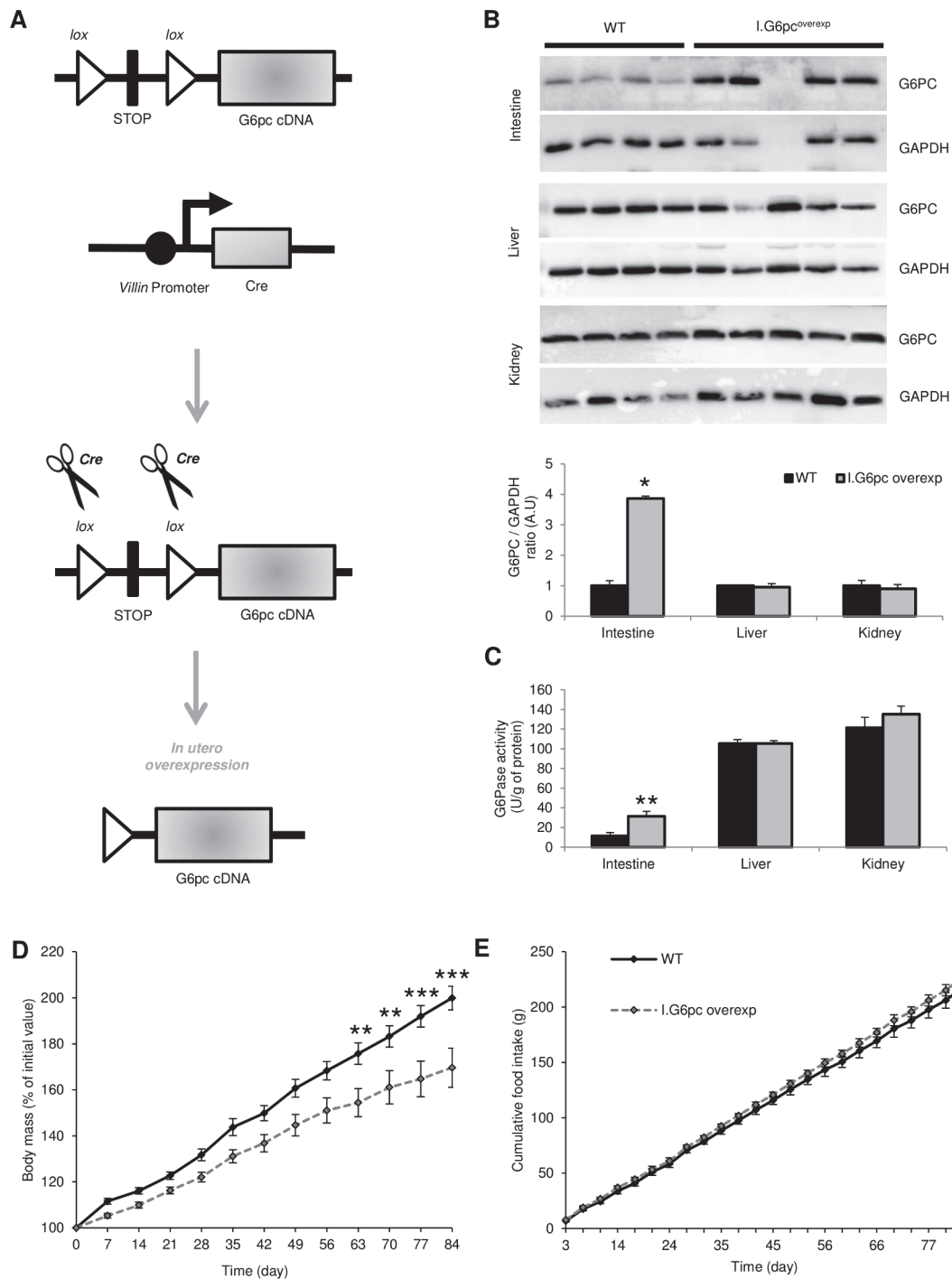


Figure 1 Murine model of constitutive induction of intestinal gluconeogenesis. (A) Schematic representation of obtaining mice overexpressing catalytic subunit of glucose-6-phosphatase (G6PC) specifically intestine according to CRE-Lox strategy. (B) Representative western blot analysis of catalytic subunit of G6PC expression in the three gluconeogenesis organs: the liver, kidney and intestine. The graph shows the quantification of protein expression in I.G6pc^{overexp} and WT mice (mean±SEM n=4–5). (C) Glucose-6-phosphatase (G6Pase) activity in the three gluconeogenic organs: the liver, kidney and intestine. The graph shows the G6Pase activity relative to protein concentration (mean±SEM n=4–5). (D) Weight gain expressed as a percentage of the initial weight (means±SEM, n=12–13). (E) Food intake (means±SEM, n=12–13). (B–C) Student’s t-test was performed as a statistical analysis (D–E) two-way analysis of variance followed by a Bonferroni post-hoc test was performed as a statistical analysis. *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001 versus WT. cDNA, complementary DNA; WT, wild type.

Intestinal gluconeogenesis prevents the development of non-alcoholic fatty liver disease

In the context of obesity, NAFLD may develop and progress towards the installation of a pro-inflammatory state and then a pro-fibrotic state eventually preceding cirrhosis and liver cancer.

We assessed whether the induction of IGN could be able to modulate the first stages of NAFLD progression to NASH in the context of a HF-HS diet.

It is noteworthy that I.G6pc^{overexp} mice showed a reduction in gene expression of several pro-inflammatory markers as

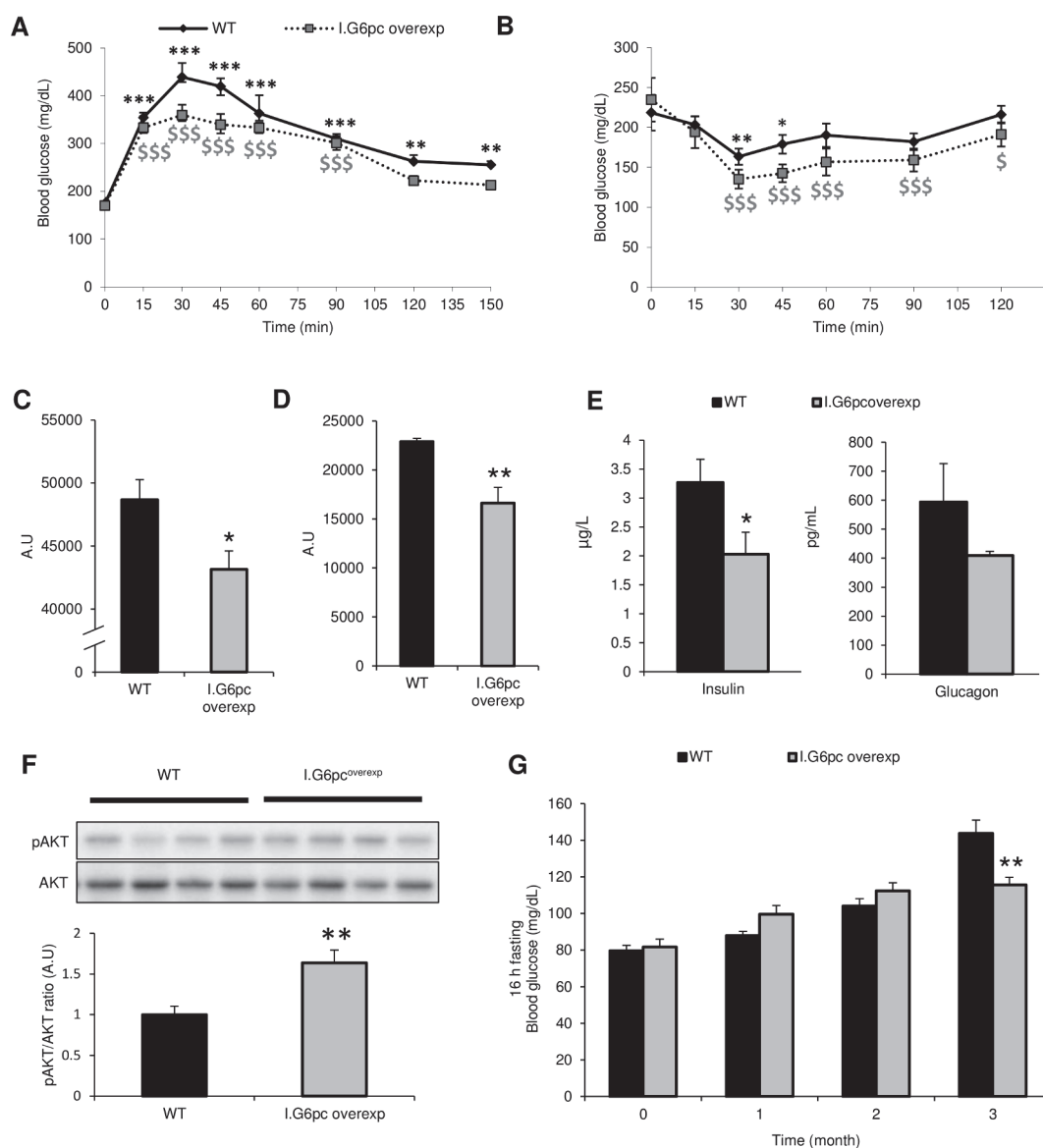


Figure 2 Activation of intestinal gluconeogenesis prevents development of diabetes on a high-fat/high-sucrose diet (A). Glucose tolerance test (means \pm SEM, n=4) in I.G6pc^{overexp} and WT mice (B) Insulin sensitivity test (means \pm SEM, n=7). (C) Area under the curve of glucose tolerance test (panel C). The results are expressed in arbitrary units (means \pm SEM, n=4). (D) Area under the curve of insulin tolerance test (panel D). The data are expressed as in panel E (means \pm SEM, n=7). (E) Plasma insulin and glucagon levels after 6 hour-fasting (means \pm SEM, n=4–6). (F) Phosphorylation state of AKT studied at 6 hours of fasting in the liver. The graph shows the quantification of protein expression (means \pm SEM, n=5–6). (G) Plasma glucose concentration after 16 hour-fasting throughout HF-HS diet (means \pm SEM, n=10–11). (A–B) We compared each point using two-way analysis of variance followed by a Bonferroni post-hoc test as a statistical analysis, with * represents WT mice and \$ represents I.G6pc^{overexp} mice. (C–G) Student's t-test was performed as a statistical analysis. *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001 versus WT mice. WT, wild type.

monocyte chemoattractant protein 1 (Mcp1), *tumour necrosis factor (Tnfa)* and *interleukin 6 (Il6)* compared with WT mice (figure 4A). However, the protein expression of these three pro-inflammatory markers remains unchanged (see online supplementary figure 2). In addition, the induction of IGN had an effect on pro-fibrosis processes induced by HF-HS diet. Indeed, a decrease in the expression of genes encoding for key fibrotic markers, like *vimentin* and *alpha-smooth muscle actin (Acta2)*, was highlighted in the liver of I.G6pc^{overexp} mice compared with WT mice (figure 4B). Consistently, collagen fibre staining revealed the presence of fibrosis around the blood vessels that spread into the hepatic parenchyma of WT mice, whereas this was not viewable in the liver of I.G6pc^{overexp} mice (figure 4C). Finally, a decrease in the expression of collagen-type-1- α 1

(Col1a1) and collagen-type-3- α 1 (Col3a1) isoforms confirmed the beneficial effects of IGN on fibrosis processes that are promoted on HF-HS diet (figure 4D).

Taken together, these results may suggest that IGN may exert preventive effects against the eventual development of NASH induced by HF-HS diet.

Activation of intestinal gluconeogenesis modulates hepatic metabolism in the context of a standard diet

We then wished to know whether IGN could exert metabolic benefits only on a challenge with a hypercaloric diet or could also modulate hepatic metabolism in a standard nutritional condition. To this aim, 16 weeks old I.G6pc^{overexp} and WT mice

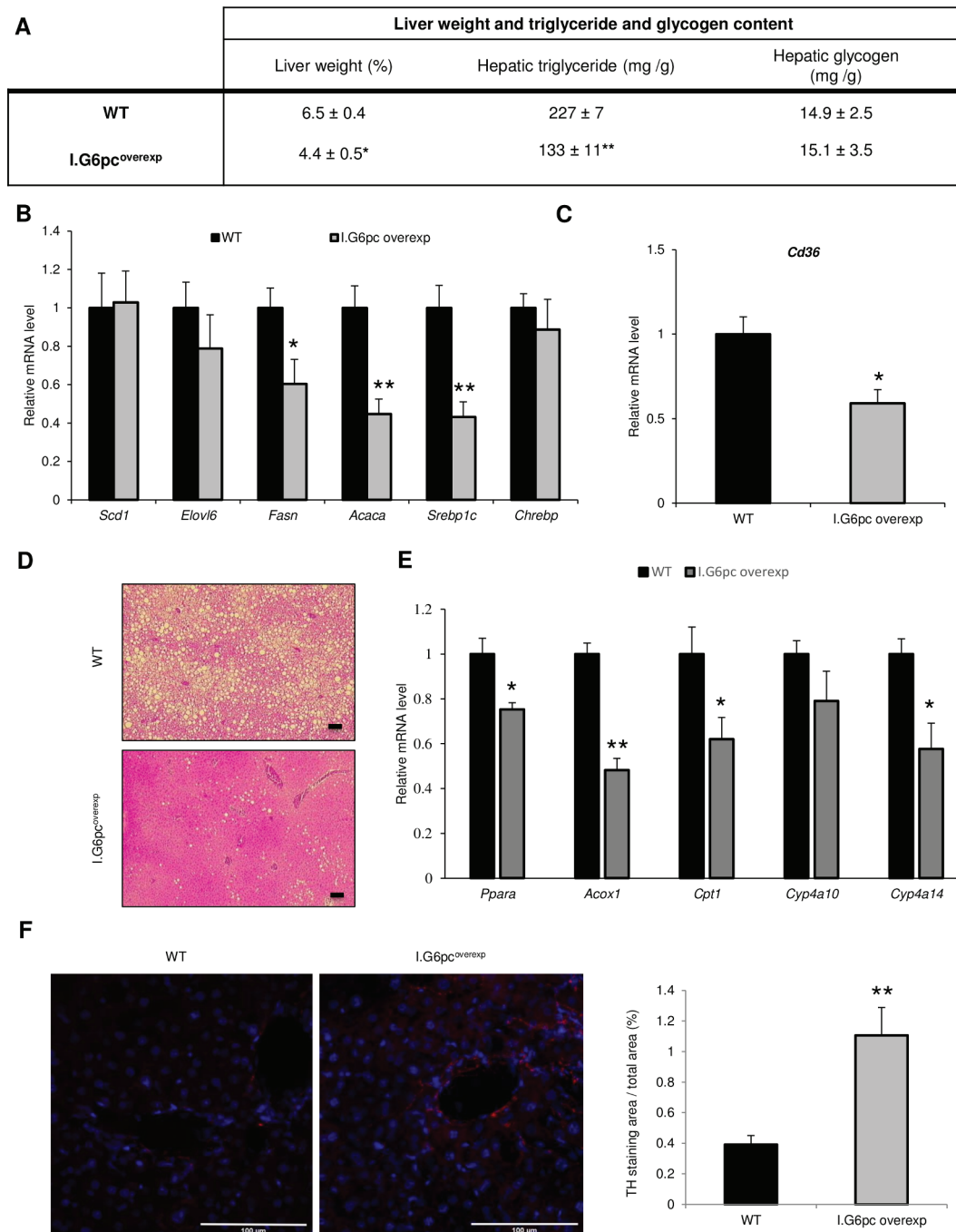


Figure 3 Activated intestinal gluconeogenesis prevents the development of non-alcoholic fatty liver disease on a high fat-high sucrose diet (A). Liver weight, triglyceride and glycogen content, and lipid plasma parameters of I.G6pc^{overexp} and WT mice. Liver triglyceride and glycogen content are expressed relative to liver weight (means±SEM, n=6). (B) mRNA levels of proteins involved in fatty acid synthesis (means±SEM, n=5–9). (C) mRNA levels of *Cd36* (means±SEM, n=5). (D) Haematoxylin and eosin staining of liver histological sections. Scale bar represents 100 µm. (E) mRNA levels of proteins involved in β-oxidation (means±SEM, n=8–12). (F) Representative pictures of tyrosine hydroxylase staining (in red) of liver histological sections and quantification (n=3–4; three to five pictures per mice). (A–C, E–F) Data are expressed relative to WT mice. Student's t-test was performed as a statistical analysis. *p<0.05; **p<0.01; versus WT. mRNA, messenger RNA; WT, wild type.

fed a standard diet were compared in relation with food intake, body weight gain and some metabolic parameters related to hepatic steatosis development. It is noteworthy that I.G6pc^{overexp} mice gained less weight than WT mice, despite comparable food intake (see online supplementary figure 3A,B). This was not associated with a change in hepatic triglyceride or glycogen content (see online supplementary figure 3C). However, a significant decrease in plasma triglyceride concentration was noted in

I.G6pc^{overexp} compared with WT mice, without modification of the cholesterol and non-esterified fatty acids levels (see online supplementary figure 3C).

Then, we studied the expression of genes implicated in hepatic lipogenesis and β-oxidation. As in I.G6pc^{overexp} mice fed a HF-HS diet, we highlighted that the induction of IGN decreased the expression of the main genes involved in lipogenesis and β-oxidation pathways in the context of standard diet compared with

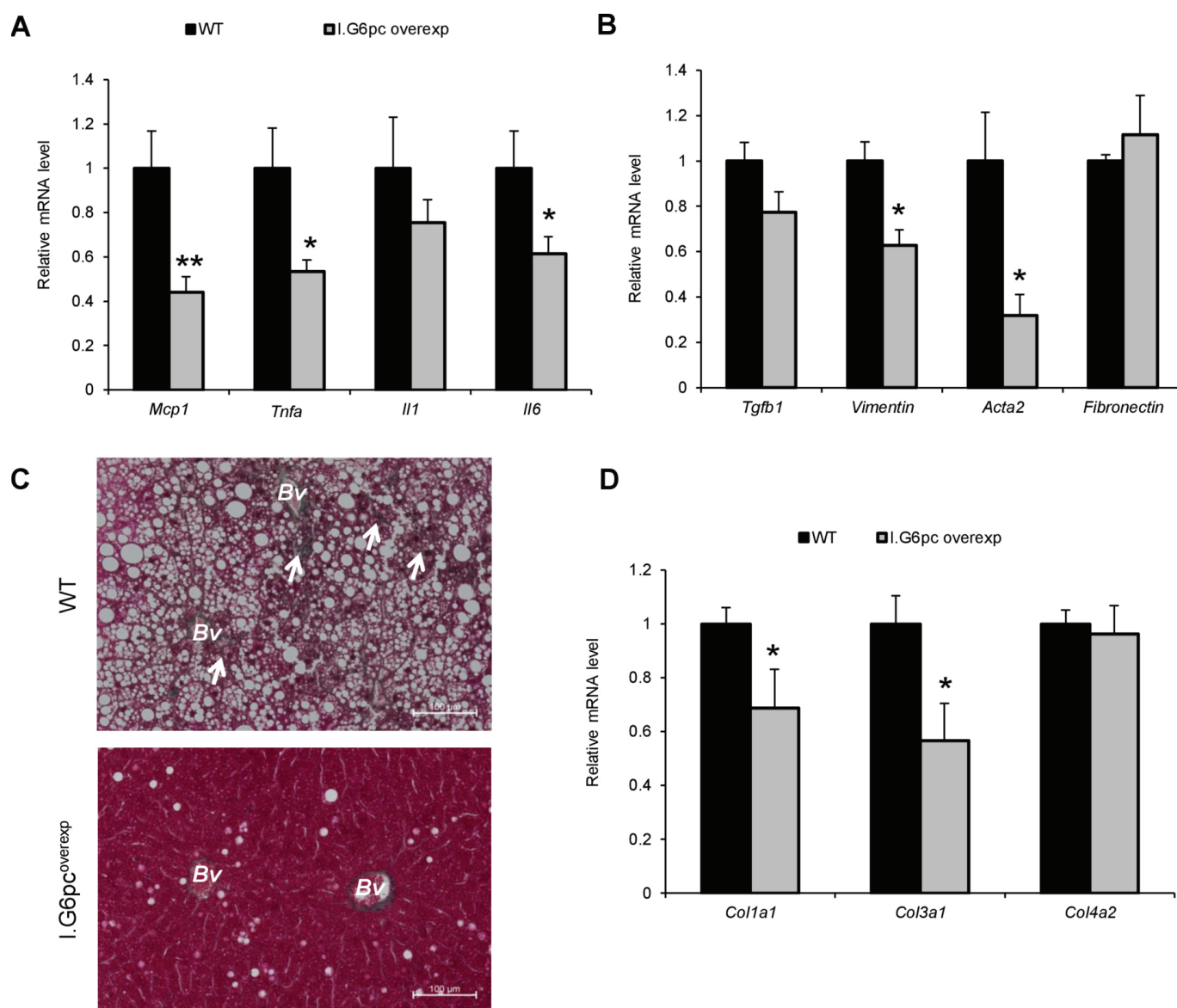


Figure 4 Intestinal gluconeogenesis protects against non-alcoholic fatty liver disease progress toward inflammation and fibrosis. (A) mRNA levels of proteins involved in pro-inflammatory processes in I.G6pc^{overexp} and WT mice (means±SEM, n=7–8). (B) Gene expression of proteins involved in pro-fibrotic processes (means±SEM, n=4–5). (C) Masson trichrome staining of liver histological sections. The arrows show the labelled collagen fibres, indicating the presence of liver fibrosis (n=3–4). Bv: blood vessels. (D) mRNA levels of collagen isoforms (means±SEM, n=8–12). (A–B, D) Data are expressed relative to WT mice. Student's t-test was performed as a statistical analysis. *p<0.05; **p<0.01 versus WT. mRNA, messenger RNA; WT, wild type.

WT mice (see online supplementary figure 3D,E). This was also associated with a decrease in some inflammation and fibrosis markers, as *Tnfa*, *interleukin 1 (Il-1)* and *fibronectin* (see online supplementary figure 3F,G).

These data suggest that IGN is able to modulate the hepatic parameters of NAFLD and NASH even in the absence of a nutritional challenge.

The deficiency of intestinal gluconeogenesis is sufficient to promote initiation of hepatic steatosis under standard diet conditions

In previous studies, we showed that the absence of IGN has negative impacts on glucose metabolism under standard feeding conditions.²⁷ Indeed, we showed that I.G6pc^{-/-} mice exhibit the metabolic disorders featuring a pre-diabetic state, even though they do not develop obesity. In this study, we wished to know

whether the absence of IGN could result per se in the initiation of NAFLD in absence of any nutritional challenge by a HF-HS diet.

Interestingly, 13 weeks old I.G6pc^{-/-} mice fed a standard diet exhibited a substantially higher hepatic triglyceride content (about +70%) than WT mice at the same age, despite no change in liver weight and glycogen content (figure 5A). In line with the liver data, the plasma triglyceride level was increased in I.G6pc^{-/-} mice, without modification of the cholesterol and NEFA levels (figure 5A). Furthermore, the increase in hepatic TG storage in I.G6pc^{-/-} mice was associated with an increase in mRNA levels of key genes involved in fatty acid synthesis, such as *stearoyl-CoA desaturase 1 (Scd1)*, *elongation of long-chain fatty acids family member 6 (Elovl6)*, *Fasn* and *Srebp1c* (figure 5B). The lipogenesis activation was confirmed by the increase in FAS protein expression in the liver of I.G6pc^{-/-} mice (figure 5C)

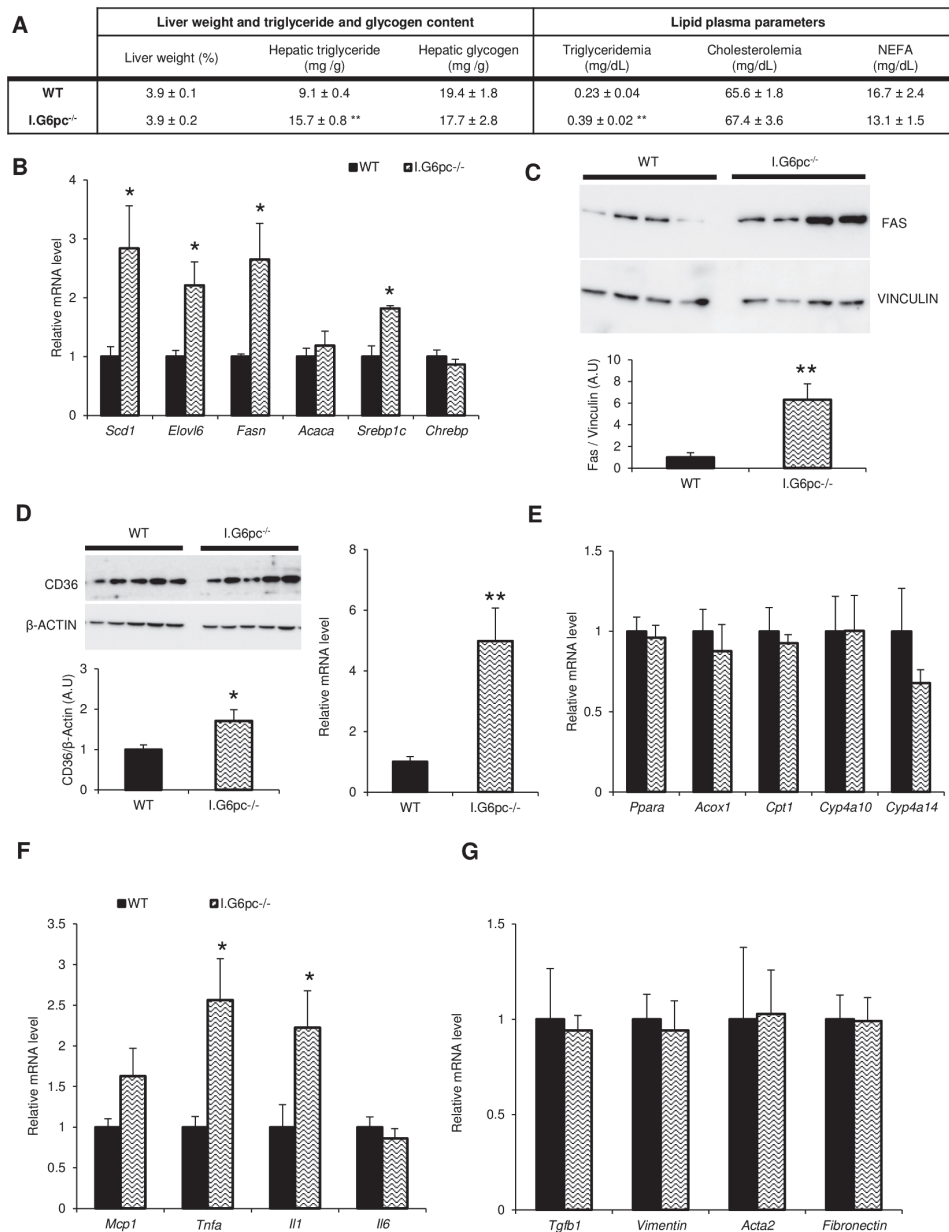


Figure 5 Deficiency of intestinal gluconeogenesis induces non-alcoholic fatty liver disease that progresses toward inflammation and fibrosis. (A) Liver weight, triglyceride and glycogen content, and lipids plasma parameters of I.G6pc^{-/-} and WT mice. Liver triglyceride and glycogen content are expressed relative to liver weight (means±SEM, n=8). (B) Gene expression of proteins involved in fatty acid synthesis (means±SEM, n=5). (C) Fatty acid synthase protein expression level (means±SEM, n=6). (D) Gene and protein expression of CD36. The graphs show the quantification of CD36 expression (means±SEM, n=5–6). (E) Gene expression of proteins involved in β-oxidation (means±SEM, n=5). (F) Gene expression of proteins involved in pro-inflammatory processes (means±SEM, n=5). (G) Gene expression of proteins involved in pro-fibrotic processes (means±SEM, n=4–5). (A–F) Data are expressed relative to WT mice. Student’s t-test was performed as a statistical analysis. *p<0.05; **p<0.01 versus WT. mRNA, messenger RNA; NEFA, non-esterified fatty acids; WT, wild type.

compared with WT mice. In addition, I.G6pc^{-/-} mice showed a significant increase in *Cd36* gene and protein expression in the liver (figure 5D), suggesting an increase in lipid uptake besides the increase in the lipogenesis pathway. However, the expression of genes encoding some key proteins regulating fatty acid oxidation or directly involved in this pathway were not altered in the liver of I.G6pc^{-/-} compared with WT mice (figure 5E).

All these results suggest that the absence of IGN is sufficient to induce the initiation of hepatic steatosis by increasing fatty acid uptake and synthesis in mice fed a standard diet. To ascertain whether the alteration of hepatic lipid metabolism in I.G6pc^{-/-} mice was caused by the absence of IGN and glucose release in the

portal vein or not, we rescued the function by infusing glucose into the portal vein at a rate mimicking IGN and measured the mRNA expression of genes encoding proteins involved in fatty acid synthesis. After 24 hours of glucose infusion in the portal vein, there was a marked reduction in the hepatic expression of *Elovl6* and *Fasn* genes compared with saline infusion (see online supplementary figure 4). This highlighted the causal relationship between IGN and hepatic lipogenesis.

Finally, we studied whether the disturbances in hepatic lipid metabolism induced by the deficiency of IGN could be associated with the initiation of NAFLD or NASH in a context of standard feeding. In agreement with this hypothesis, IGN deficiency led to

an increase in the expression of pro-inflammatory markers, such as *Tnfa* and *Il-1* (figure 5F). However, it must be noted that the expression of major liver fibrosis markers was not modified by the absence of IGN at 13 weeks of age (figure 5G).

Therefore, these data suggest that the deficiency of IGN is sufficient to induce a hepatic proinflammatory state.

DISCUSSION

The metabolic benefits associated with IGN were previously suggested from nutritional manipulations.^{17 20 21} The benefits associated with protein-enriched or fiber-enriched diets, indeed, were suppressed in I.G6pc^{-/-} mice.^{17 21 22} Whereas these previous studies strongly suggest an inhibitory action of IGN on hepatic glucose production,¹⁴ they did not raise the question of the impact of IGN on other intrahepatic mechanisms generally associated with metabolic control, such as the crucial question of steatosis and related hepatic deregulations. We used two mouse models of deficient-IGN and increased-IGN to address this question here. This approach allowed us to evaluate the proper role of IGN, independently of any exogenous influence of relevant macronutrients. It is noteworthy that intestinal G6Pase activity was increased by about three times in I.G6pc^{overexp} mice, which is comparable to the induction promoted by protein-enriched or fiber-enriched diets.^{17 18 20 22}

We report that, in addition to a global improvement of glucose control providing a protection against the set up of hyperglycaemia, the increase in IGN suppresses by about 50% the hepatic lipid storage promoted by a HF-HS diet. The general decrease in gene expression of the main regulatory proteins involved in lipogenesis and of lipid import could represent the underlying mechanisms of such an improvement. Interestingly, the regulation of lipogenesis in the liver of I.G6pc^{overexp} and I.G6pc^{-/-} mice is associated with modulation of *Srebp1c* expression (decreased in I.G6pc^{overexp} and increased in I.G6pc^{-/-} mice) and not of *ChREBP* expression (carbohydrate-responsive element-binding protein). Hepatic lipogenesis is controlled by insulin (via SREBP1c) and by glucose (via ChREBP) (for a review see reference 28). This suggests that the effect of IGN could involve a specific inhibitory action via SREBP1c of the insulin effect on the lipogenic pathway, and not a regulatory action on the glucose effect via ChREBP.

It is of note that a decrease in the lipid oxidation pathway was also observed, which could appear inconsistent with a decreased steatosis. However, this could be an adaptation to the decreased lipid content, which has been already reported in situations of decreased hepatic lipid accumulation caused independently of an activation of lipid oxidation.^{29 30} Interestingly, the expression of several markers of inflammation and of fibrosis were decreased in I.G6pc^{overexp} mice fed a HF-HS diet, suggesting that the benefits arising from increased IGN might be extended to the complete chain of possible deleterious events accompanying HF-HS-initiated NAFLD. It is noteworthy that the benefit conferred by IGN on fibrosis takes place at the level of collagen protein deposits (figure 4C). On the contrary, the protein expression of the proinflammatory markers studied was unchanged. This suggests that the benefits of IGN could depend on processes downstream of proinflammatory factors. It is noteworthy that these IGN preventive actions were associated with the increased innervation of the liver by TH-expressing neurons. This is in agreement with the previous reports of the key role of the sympathetic nervous system in the control of hepatic lipogenesis.^{31 32} Further investigations to specify the mechanism of this IGN-derived brain to liver neural signalling deserve

consideration, for example, from mice with selective peripheral inactivation of the sympathetic nervous system.³³ Altogether, these data are in agreement with the previous indications that gut-brain-periphery nervous circuits may underlay the beneficial effects of IGN in energy homeostasis and glucose control.^{14 27}

It is noteworthy that a diminution of body weight, liver weight and hepatic lipid storage takes also place in I.G6pc^{overexp} mice fed a normal starch-based diet, that is, independently of a nutritional challenge by a HF-HS diet, although the effects were smaller. This was accompanied by molecular events comparable to those taking place under a HF-HS diet. This strongly suggests that IGN and its nervous-relayed hepatic effects could also positively modulate the metabolic pathways involved in hepatic TG storage or NAFLD independently of deleterious nutritional habits.

In agreement with the data obtained from I.G6pc^{overexp} mice, I.G6pc^{-/-} mice appeared prone to develop hepatic TG storage (although weakly) and the molecular events underlying NAFLD, including the activation of de novo lipogenesis, lipid transport and inflammation. That infusing glucose in the portal vein for 24 hours to mimic IGN corrected the markers of lipogenesis strongly suggests the causal role of this function in the modulation of NAFLD-related parameters. Interestingly, the suppression of basal IGN did not appear sufficient to initiate an increase in the expression of the markers of fibrosis. It must be noted that the experiments herein were performed in rather young animals (13 weeks old). This age could not be sufficient to the initiation of fibrosis. Alternatively, this could also suggest that only an increased IGN is susceptible to modulate the fibrosis pathway, or that the modulation of fibrosis by basal IGN could not be evidenced in a situation where fibrosis is not initiated. It is of note that, when they were fed a HF-HS diet, I.G6pc^{-/-} mice developed hepatic steatosis and the molecular events featuring NAFLD. However, this was qualitatively and quantitatively similar to what was taking place in WT mice (Vily-Petit, Soty and Mithieux, unpublished results). One could speculate that the absence of IGN might accelerate the development of steatosis and NAFLD at the beginning of the nutritional challenge and that a plateau might be reached, comparable in both mice genotypes. A matching observation was previously done relating to the development of hyperglycaemia induced by a HF-HS diet. It was more rapid in I.G6pc^{-/-} than in WT mice, while a comparable plateau was reached.²⁷ Alternatively, basal IGN may be blunted under conditions of HF diet, due to disturbances at the level of the pyruvate pool.^{14 34 35} Therefore, the situation might be comparable in WT and I.G6pc^{-/-} mice on HF-HS diet in terms of intestinal gluconeogenic flux (lowered), which might explain the similarity of the effects produced. It is noteworthy that when IGN is activated, as in I.G6pc^{overexp} mice, it is able to counterbalance the eventual impairments at the level of the pyruvate pool.

In conclusion, we show here that, harmoniously fitting within the previously reported processes of its beneficial action in energy homeostasis, IGN is capable through a gut-brain-liver neural circuit of exerting a specific modulation of the set-up of hepatic steatosis and associated molecular events concurring to the development of NAFLD. Moreover, this modulation takes place independently of any supplementation with exogenous beneficial macronutrients, such as protein or fibre, which could exert an action independent of IGN. Obesity-linked liver steatosis represents the early stage preceding the development of NAFLD, which may eventually lead to NASH, cirrhosis and even liver cancer.⁸ However, liver cancers may also arise in the context of steatosis independently of concomitant fibrosis and cirrhosis, while the mechanisms by which this takes place are less

known.^{9–11} In humans, intestinal gluconeogenesis is induced in specific situations as during the anhepatic phase of liver transplantation and after gastric bypass surgery.^{14 36–38} Interestingly, positive metabolic outcomes of gastric bypass surgery in humans have been associated with both increased IGN¹⁹ and with major correction of hepatic steatosis and NAFLD features.^{39 40} Therefore, the data here pave the way to therapeutic approaches of prevention or correction based on IGN against this serious metabolic consequence of obesity that is NAFLD.

Acknowledgements We would like to thank the members of Animalerie Lyon Est Conventiennelle et SPF (ALECS, Université Lyon 1, SFR Santé Lyon Est) for animal housing and care, and the members of the CIQLE platform (Université Lyon 1, SFR Santé Lyon Est) for histological experiments (Université Lyon 1). We are grateful to Antoine Martinez for helpful advising in relation with overexpression technics at the beginning of this work. This work was supported by research grants from the Agence Nationale de la Recherche (ANR-17-CE14-0020-01), the Fondation pour la Recherche Médicale (Equipe FRM DEB20160334898) and the company Servier.

Contributors JV-P and MS-R conceived and carried out the experiments, and wrote the paper. MS and MR contributed to the experimental studies. AG-S and FR interpreted the data and edited the manuscript. GM supervised the study and wrote the manuscript.

Funding This work was supported by research grants from the Agence Nationale de la Recherche (ANR-17-CE14-0020-01), the Fondation pour la Recherche Médicale (Equipe FRM DEB20160334898) and the company Servier.

Competing interests None declared.

Patient and public involvement Patients and/or the public were not involved in the design, or conduct, or reporting or dissemination plans of this research.

Patient consent for publication Not required.

Provenance and peer review Not commissioned; externally peer reviewed.

Data availability statement Data are available upon reasonable request. Unpublished results mentioned in the text may be communicated on request.

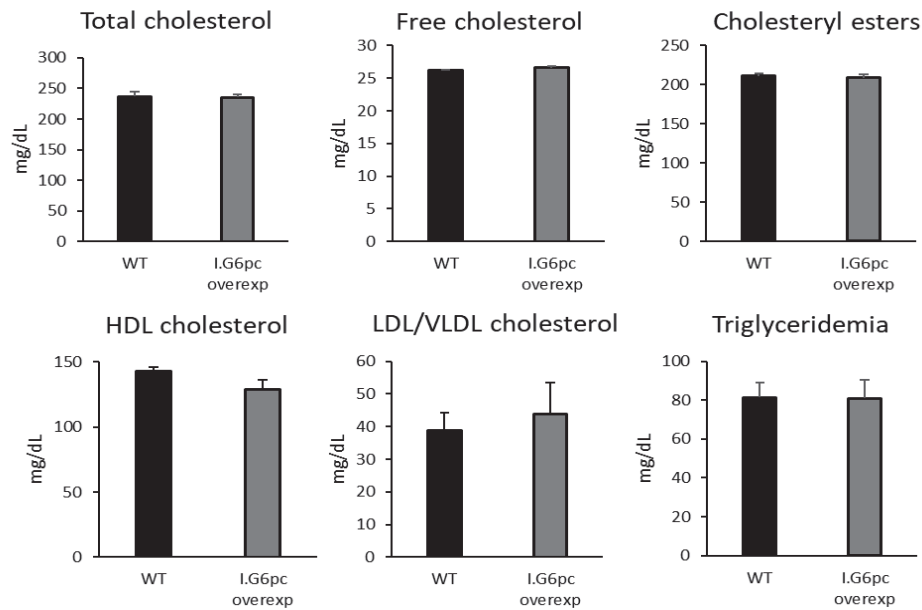
ORCID iD

Gilles Mithieux <http://orcid.org/0000-0003-3579-8529>

REFERENCES

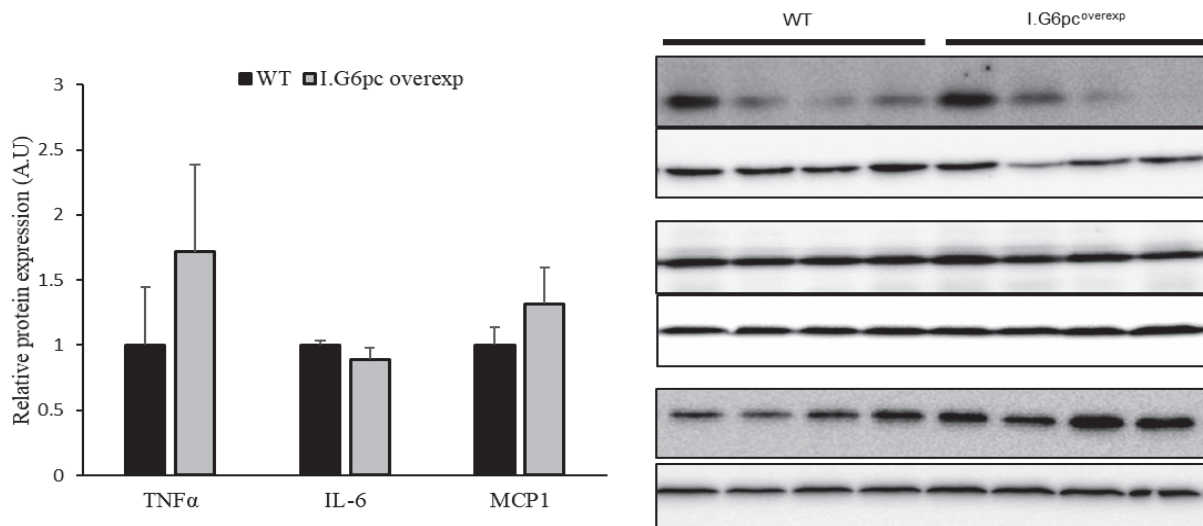
- WHO. Noncommunicable diseases country profiles 2018 [Internet]. WHO [cited 21 Oct 2019]. Available: <http://www.who.int/nmh/publications/ncd-profiles-2018/en/>
- Reeves HL, Zaki MYW, Day CP. Hepatocellular carcinoma in obesity, type 2 diabetes, and NAFLD. *Dig Dis Sci* 2016;61:1234–45.
- Dharmalingam M, Yamasandhi PG. Nonalcoholic fatty liver disease and type 2 diabetes mellitus. *Indian J Endocrinol Metab* 2018;22:421–8.
- Cade WT. Diabetes-Related microvascular and macrovascular diseases in the physical therapy setting. *Phys Ther* 2008;88:1322–35.
- Bianchini F, Kaaks R, Vainio H. Overweight, obesity, and cancer risk. *Lancet Oncol* 2002;3:565–74.
- Matsuzaka T, Shimano H. Molecular mechanisms involved in hepatic steatosis and insulin resistance. *J Diabetes Investig* 2011;2:170–5.
- Brown MS, Goldstein JL. Selective versus total insulin resistance: a pathogenic paradox. *Cell Metab* 2008;7:95–6.
- Browning JD, Horton JD. Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury. *J Clin Invest* 2004;114:147–52.
- Gjorgjieva M, Calderaro J, Monteillet L, et al. Dietary exacerbation of metabolic stress leads to accelerated hepatic carcinogenesis in glycogen storage disease type Ia. *J Hepatol* 2018;69:1074–87.
- Nault J-C, Couchy G, Balabaud C, et al. Molecular Classification of Hepatocellular Adenoma Associates With Risk Factors, Bleeding, and Malignant Transformation. *Gastroenterology* 2017;152:880–94.
- Stoot JHMB, Coelen RJS, De Jong MC, et al. Malignant transformation of hepatocellular adenomas into hepatocellular carcinomas: a systematic review including more than 1600 adenoma cases. *HPB* 2010;12:509–22.
- Delaere F, Duchamp A, Mounien L, et al. The role of sodium-coupled glucose co-transporter 3 in the satiety effect of portal glucose sensing. *Mol Metab* 2013;2:47–53.
- Delaere F, Akaoka H, De Vadder F, et al. Portal glucose influences the sensory, cortical and reward systems in rats. *Eur J Neurosci* 2013;38:3476–86.
- Soty M, Gautier-Stein A, Rajas F, et al. Gut-Brain glucose signaling in energy homeostasis. *Cell Metab* 2017;25:1231–42.
- Sun D, Wang K, Yan Z, et al. Duodenal-jejunal bypass surgery up-regulates the expression of the hepatic insulin signaling proteins and the key regulatory enzymes of intestinal gluconeogenesis in diabetic Goto-Kakizaki rats. *Obes Surg* 2013;23:1734–42.
- Troy S, Soty M, Ribeiro L, et al. Intestinal gluconeogenesis is a key factor for early metabolic changes after gastric bypass but not after gastric lap-band in mice. *Cell Metab* 2008;8:201–11.
- De Vadder F, Kovatcheva-Datchary P, Goncalves D, et al. Microbiota-generated metabolites promote metabolic benefits via gut-brain neural circuits. *Cell* 2014;156:84–96.
- Duraffour C, De Vadder F, Goncalves D, et al. Mu-Opioid receptors and dietary protein stimulate a gut-brain neural circuitry limiting food intake. *Cell* 2012;150:377–88.
- Gutierrez-Repiso C, Garcia-Serrano S, Moreno-Ruiz FJ, et al. Jejunal gluconeogenesis associated with insulin resistance level and its evolution after Roux-en-Y gastric bypass. *Surg Obes Relat Dis* 2017;13:623–30.
- Mithieux G, Misery P, Magnan C, et al. Portal sensing of intestinal gluconeogenesis is a mechanistic link in the diminution of food intake induced by diet protein. *Cell Metab* 2005;2:321–9.
- De Vadder F, Kovatcheva-Datchary P, Zitoun C, et al. Microbiota-produced succinate improves glucose homeostasis via intestinal gluconeogenesis. *Cell Metab* 2016;24:151–7.
- Penhoat A, Mutel E, Amigo-Correig M, et al. Protein-induced satiety is abolished in the absence of intestinal gluconeogenesis. *Physiol Behav* 2011;105:89–93.
- Mithieux G, Guignot L, Bordet J-C, et al. Intrahepatic mechanisms underlying the effect of metformin in decreasing basal glucose production in rats fed a high-fat diet. *Diabetes* 2002;51:139–43.
- Monteillet L, Gjorgjieva M, Silva M, et al. Intracellular lipids are an independent cause of liver injury and chronic kidney disease in non alcoholic fatty liver disease-like context. *Mol Metab* 2018;16:100–15.
- Mithieux G, Bady I, Gautier A, et al. Induction of control genes in intestinal gluconeogenesis is sequential during fasting and maximal in diabetes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2004;286:E370–5.
- Rajas F, Bruni N, Montano S, et al. The glucose-6 phosphatase gene is expressed in human and rat small intestine: regulation of expression in fasted and diabetic rats. *Gastroenterology* 1999;117:132–9.
- Soty M, Penhoat A, Amigo-Correig M, et al. A gut-brain neural circuit controlled by intestinal gluconeogenesis is crucial in metabolic health. *Mol Metab* 2015;4:106–17.
- Postic C, Girard J. Contribution of de novo fatty acid synthesis to hepatic steatosis and insulin resistance: lessons from genetically engineered mice. *J Clin Invest* 2008;118:829–38.
- Kliwer SA, Forman BM, Blumberg B, et al. Differential expression and activation of a family of murine peroxisome proliferator-activated receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91:7355–9.
- Varga T, Czimmerer Z, Nagy L. PPARs are a unique set of fatty acid regulated transcription factors controlling both lipid metabolism and inflammation. *Biochim Biophys Acta* 2011;1812:1007–22.
- Nogueiras R, López M, Diéguez C. Regulation of lipid metabolism by energy availability: a role for the central nervous system. *Obes Rev* 2010;11:185–201.
- Lee SB, Kim HG, Lee JS, et al. Intermittent restraint-induced sympathetic activation attenuates hepatic steatosis and inflammation in a high-fat diet-fed mouse model. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2019;317:G811–23.
- Pereira MMA, Mahú I, Seixas E, et al. A brain-sparing diphtheria toxin for chemical genetic ablation of peripheral cell lineages. *Nat Commun* 2017;03:14967.
- Mithieux G, Rajas F, Zitoun C. Glucose utilization is suppressed in the gut of insulin-resistant high fat-fed rats and is restored by metformin. *Biochem Pharmacol* 2006;72:1757–62.
- Watford M. Glutamine metabolism in rat small intestine: synthesis of three-carbon products in isolated enterocytes. *Biochim Biophys Acta* 1994;1200:73–8.
- Battezzati A, Caumo A, Martino F, et al. Nonhepatic glucose production in humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2004;286:E129–35.
- Hayes MT, Foo J, Besic V, et al. Is intestinal gluconeogenesis a key factor in the early changes in glucose homeostasis following gastric bypass? *Obes Surg* 2011;21:759–62.
- Mithieux G. Comment about intestinal gluconeogenesis after gastric bypass in human in relation with the paper by Hayes et al. *Obes Surg* 2011. *Obes Surg* 2012;22:1920–2.
- Caiazzo R, Lassailly G, Leteurtre E, 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;260:893–8. discussion 898–899.
- Lassailly G, Caiazzo R, Buob D, et al. Bariatric surgery reduces features of nonalcoholic steatohepatitis in morbidly obese patients. *Gastroenterology* 2015;149:379–88.

SUPPLEMENTAL FIGURES



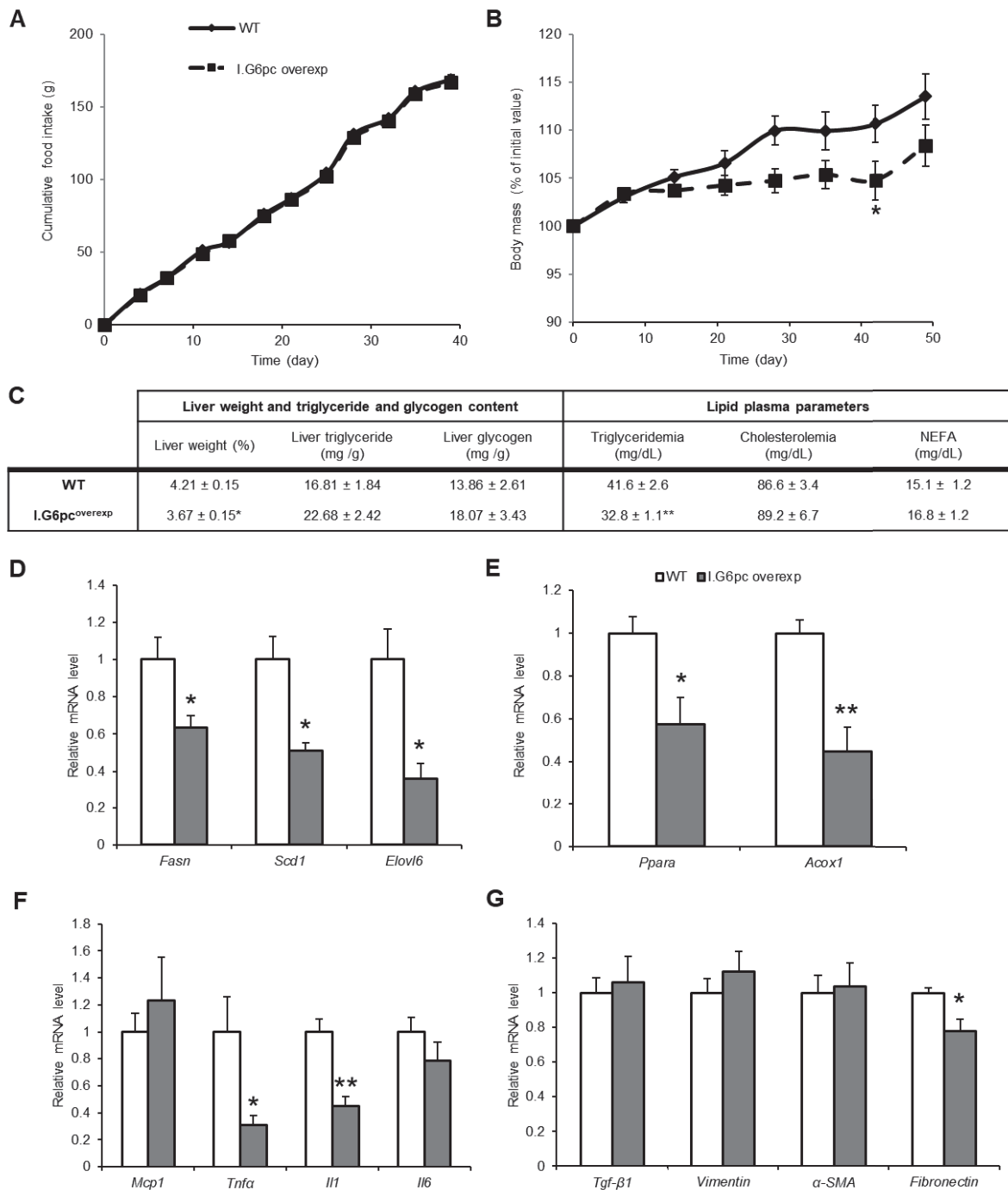
Supplemental figure 1: plasma lipid parameters in I.G6pc^{overexp} mice compared to WT mice fed HF-HS diet

Data are expressed in mg/dL (means \pm SEM, n=6-8). Student's t-test was performed as a statistical analysis.



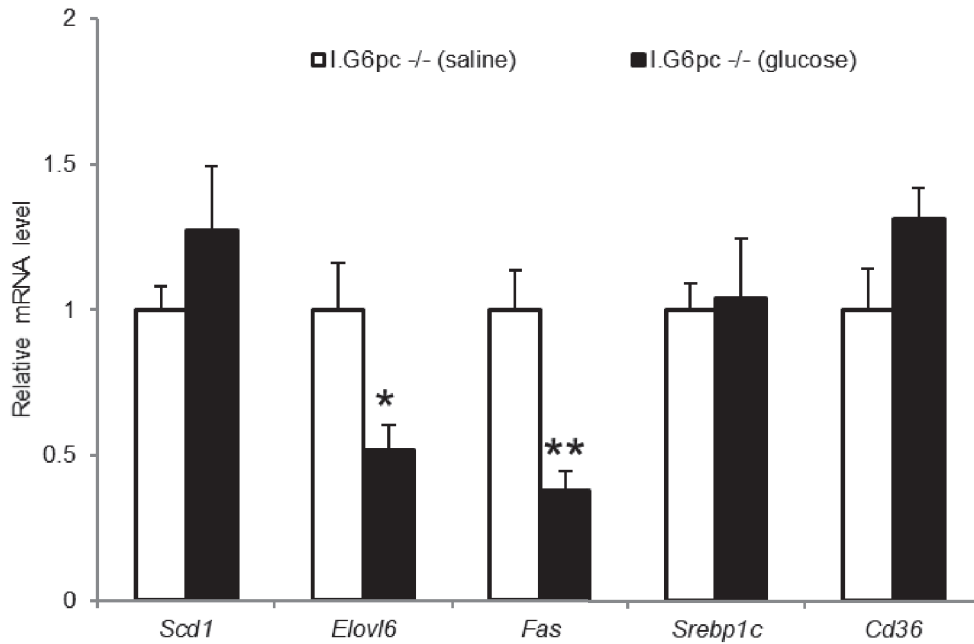
Supplemental figure 2: IGN does not influence pro-inflammatory protein expression

Representative western blot analysis of TNF α , IL-6 and MCP1 expression. The graph shows the quantification of protein expression relative to WT mice (mean \pm SEM, n= 5-6). Student's t-test was performed as a statistical analysis.



Supplemental figure 3: Benefits of intestinal gluconeogenesis in energy homeostasis and non-alcoholic fatty liver disease markers on standard starch-based diet.

(A) Food intake (means ± SEM, n= 5). (B) Weight gain expressed as a percentage of the initial weight (means ± SEM, n= 5). (C) Liver weight, triglycerides and glycogen content, and lipids plasma parameters. Liver triglycerides and glycogen content are expressed relative to liver weight (means ± SEM, n= 9). (D) Liver gene expression of proteins involved in fatty acid synthesis (means ± SEM, n= 4-5). (E) Liver gene expression of proteins involved in β-oxidation (means ± SEM, n= 4-5). (F) Liver gene expression of proteins involved in pro-inflammatory processes (means ± SEM, n=4-5). (G) Liver gene expression of proteins involved in pro-fibrotic processes (means ± SEM, n=4-5). (A-B) 2-way ANOVA followed by a Bonferroni post-hoc test was performed as a statistical analysis. (C-G) Student's t-test was performed as a statistical analysis. *p < 0.05; **p < 0.01 versus WT.



Supplemental figure 4 : Decrease in lipogenesis genes expression in the liver of I-G6pc^{-/-} mice induced by portal glucose infusion.

Gene expression of proteins involved in lipogenesis in the liver of I.G6pc^{-/-} mice receiving saline or glucose portal infusion. Data are expressed relative to I.G6pc^{-/-} mice infused by saline (means ± SEM, n=5). Student's t-test was performed as a statistical analysis. *p < 0.05; **p<0.01.

SUPPLEMENTAL METHODS

Composition of diets:

HF-HS diet, consisting of 36.1% fat, 35% carbohydrates (50% maltodextrine + 50% sucrose) and 19.8% proteins, was produced by the Unité de Préparation des Aliments Expérimentaux (INRA, UE0300, Jouy-en-Josas, France).

Standard diet (SAFE A04, Augis, France), consisting of 3.1% fat, 60.4% carbohydrates (including 43.5% starch content) and 16.1% proteins.

Portal glucose infusion

I.G6pc^{-/-} mice neck and abdomen were shaved and disinfected. After incision (2 cm) of the peritoneum, a catheter was inserted into the portal vein and sealed by a drop of biological glue, under isoflurane anesthesia (2%). During and after surgery, mice were placed on heating mats (37°C) until their complete wake up. Pain was prevented by prior administration of buprenorphine (0.05 mg/kg) and Ketofen (5 mg/kg), which will be continued for 3 days. Mice

were let to recover for 7 days in single cages with a daily monitoring. Each day, mice were weighed and observed. In particular, the presence of feces and the scar were carefully examined.

Twenty-four hours before infusion, mice were placed into infusion cage for acclimatization. Then, a 0.9% saline or 20% glucose (Laboratoire Virbac) was infused at 40 $\mu\text{mol/kg/min}$ for 24 h. Mice then received Dolethal[®] (Vetoquinol) injection directly via the catheter (allowing us to control its correct position into the vein). Then, they were killed by cervical dislocation. Livers were collected and frozen by freeze-clamping at the temperature of liquid nitrogen and stored at -80°C .

Histological and Immunofluorescence analysis

For livers histological analyses, formalin-fixed and paraffin-embedded tissues were cut in 4 μm thick sections and stained with hematoxylin and eosin (HE) staining. The sections were examined under an inverted microscope (Nikon Eclipse TS2R).

For livers tyrosine hydroxylase (TH) labelling, brain death of mice was induced with Dolethal[®] (Vetoquinol) then mice were perfused transcardially with ice-cold 0.9% saline for 5 min and ice-cold 4% paraformaldehyde (PFA) for 15min. Livers were removed, post-fixed in the same fixative o/n, and stored in 4% PFA/30% Sucrose/0.25% NaN_3 for 48h at 4°C . The specimens were frozen in -40°C isopentane (C_5H_{12}). Then, livers were cut into 40 μm thick section, using a cryostat. After rinsing with PBS Triton X-100 (0.3%), sections were incubated in blocking solution (PBS-Triton X-100, 5% BSA). Thereafter, the sections were incubated for 48 h (4°C) with TH antibody (Millipore) diluted to 1:250 in blocking solution. Immunostaining was visualized by using Alexa 546 goat anti-rabbit IgG conjugated secondary antibodies (1:500 in blocking solution; 1 h at room temperature; Invitrogen). Cell nuclei were stained with Hoechst (Invitrogen, 1:1000). Sections were mounted with ProLong Anti Fade (Invitrogen). Hoechst was excited with a 405nm laser and Alexa-546 with a 546nm laser. Confocal images of randomly selected portal areas of the liver (3-5 per liver) were acquired on a confocal laser scanning microscope (Leica TCS SP5-X) with a 40x objective at 1024 x 1024 pixel resolution. Then, nerve fibers immunostaining was analysed and quantified in Z-stacks (step size = 1 μm) of confocal images using FiJi by ImageJ software. For each image, we quantified TH labelling area (provided by 546 nm-laser) in relation to the total area.

Glycogen assay

A piece of 100 mg of frozen liver was added to 8 volumes of perchloric acid 6% and crushed with Fast Prep[®] (MP Biomedicals). After a centrifugation (10,000g; 15 min; 4°C), the

supernatant was neutralized with 3.2 mM K₂CO₃ and pH was adjusted between 6.5 and 8.5. This solution was centrifuged (10,000g for 5 min at 4°C), and the supernatant was removed to indirectly determine glycogen content by using the Keppler and Decker method, as previously described (1). Glycogen was partially hydrolyzed by boiling for 20min in NaOH 0.15M and then digested into glucose by α -amylglucosidase for 1h at 45°C. Glucose released was measured after the addition of 0.7U of hexokinase and glucose-6-phosphate dehydrogenase in the presence of NADP⁺. NADPH production was detected at 340nm.

Triglyceride assay

Liver triglycerides were extracted using Folch extraction procedure, as previously described (2). This procedure consist in the addition of a chloroform/methanol 2/1 solution to 100 mg of frozen liver (1.7mL for 100mg of tissue), and then a crushing with Fast Prep[®]. The solution was centrifuged twice (2,000g; 10 min; 4°C), and 2mL of NaCl was added to the supernatant previously removed. Two phases were created, and the inferior organic phase that contains triglycerides was kept. After chloroform evaporation, triglycerides were diluted in 100 μ L of propanol and measured with a colorimetric kit (DiaSys, Holzheim, Germany).

Western blot analysis

Cell extracts from livers were lysed in standard lysis buffer (20 mM Tris-HCl, pH 8, 138 mM NaCl, 1% NP40, 2.7mM KCl, 1 mM MgCl₂, 5% glycerol, 5 mM EDTA, 1mM Na₃VO₄, 20mM NaF, 1 mM DTT, 1% protease inhibitors), and homogenized using FastPrep[®]. Proteins were assayed in triplicate with Pierce[™] BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientifique).

Aliquots of 30 μ g of proteins, denatured in buffer (20% glycerol, 10% β -mercaptoethanol; 10% SDS, 62.5mM Tris) were analysed from 4%, 9% or 12% -SDS polyacrylamide gel electrophoresis and transferred to PVDF Immobilon membranes (Biorad). After 1h-saturation in TBS/0.2% Tween/5% BSA or 2% milk (RT), the membranes were probed (overnight at 4°C) with rabbit antibodies diluted in TBS/0.2% Tween/5% BSA or 2% milk, against different proteins of interest, which names, references and dilutions are specified in the table below. Then, membranes were rinsed three-times in TBS/0.2% Tween for 10min and incubated for 1h with goat secondary anti-rabbit IgG linked to peroxidase (dilution 1:5 000, Biorad) in TBS/0.2% Tween/5% BSA or 2% milk. Membranes were rinsed again and exposed to Clarity[™] Western ECL Substrate (Biorad). The intensity of the spots was determined by densitometry with ChemiDoc Software (Biorad) and analysed using the Image Lab[™] software (Biorad). Western blots were trimmed on the sides to show 4 – 5 representative samples of each experimental condition.

Gene expression analysis

A piece of 100 mg of frozen liver was homogenized using FastPrep® and total RNAs were isolated according to the Trizol protocol (Invitrogen Life Technologies). Reverse transcription was done on 1 µg of mRNA using the Qiagen QuantiTect Reverse Transcription kit. Real-time qPCRs were performed using sequence-specific primers supplied by Eurogentec (See the table below) with SsoAdvanced™ Universal SYBR® Green Supermix in a CFX Connect™ Real-Time System (Biorad).

The expression of mRNAs was normalized to the L32 expression thanks to the 2-ΔΔCt method. The expression of target mRNAs from the I.G6pc^{-/-} and I.G6pc^{overexp} livers was expressed in relation to their respective WT controls.

Glucose-6-phosphatase activity analysis

The intestine, liver, and kidney were sampled as previously described (3). Frozen tissues were homogenized using Fast Prep® in 10 mM HEPES and 0.25 M sucrose, pH 7.4 (9 vol/g tissue). G6Pase activity was assayed in homogenates for 10 min at 30°C at pH 7.3 in the presence of a saturating glucose-6-phosphate concentration (20 mM) (3,4).

Organisms:

Name	Citation	Supplier	Strain	Sex	Age	Overall n
WT	(8)	Charles River Laboratory	C57BL6/J	Male	13 weeks (fed standard diet) or 7 months (fed HF-HS diet)	33
I.G6pc ^{overexp}		Animalerie Lyon Est Conventiionnelle et SPF	B6.rosa26 ^{G6pcLoxSTO} ^P -B6.vill ^{Cre/w}	Male	13 weeks (fed standard diet) or 7 months (fed HF-HS diet)	25
I.G6pc ^{-/-}	(8)	Animalerie Lyon Est Conventiionnelle et SPF	B6.G6pclox/lox.ViIlCreERT2	Male	13 weeks (fed standard diet)	8

Antibodies used :

Name	Citation	Supplier	Cat no.	Clone no.
Rabbit Polyclonal anti G6PC (1/2000)	(5)	N/A	N/A	N/A
Rabbit polyclonal anti $\alpha\beta$ -tubulin (1/1000)	(6)	Cell signalling	2148	N/A
Rabbit Monoclonal anti tumor necrosis factor α (TNF α) (1/250)	(7)	Cell signalling	11948	D2D4
Rabbit polyclonal (1/200)	(7)	Cell signalling	2029	N/A
Rabbit Polyclonal anti Phospho-Akt (Ser473)	(8)	Cell signaling	9271	N/A
Rabbit Polyclonal anti Akt	(8)	Cell signaling	9272	N/A
Rabbit Polyclonal anti FAS (1/1000)	(9)	Cell signaling	3189	N/A
Rabbit Polyclonal anti Vinculin (1/2000)	(10)	Cell signaling	4650	N/A
Rabbit Polyclonal anti CD36 (1/1000)	(11)	Abcam	ab124515	N/A
Rabbit Monoclonal anti β -Actin (1/2000)	(12)	Cell signalling	4970	13E5
Rabbit monoclonal anti-GAPDH (1/2000)	(13)	Cell Signaling	5174	D16H11
Rabbit Polyclonal anti Tyrosine hydroxylase (1/250)	(8)	Millipore	AB152	N/A
Goat Polyclonal Alexa 546 anti-rabbit IgG (1/500)	(8)	Invitrogen	A11010	N/A
Immun-Star goat anti-rabbit (GAR)-HRP conjugate (1/5000)	(14)	Biorad	170-5046	N/A
Mouse insulin ELISA kit	(8)	Mercodia	10-1247-01	
Mouse glucagon ELISA kit	(8)	Mercodia	10-1271-01	

Sequence based reagents:

Name	Sequence	Supplier
Acetyl-CoA carboxylase1, ACC (Acaca) forward	TGGCAGACCACTATGTTCCA	Eurogentec
Acetyl-CoA carboxylase1, ACC (Acaca) reverse	GAGCAGTTCCTGGGAGTTTCG	Eurogentec
Acyl-CoA Oxidase 1 (Acox1) forward	TGCCAAATTCCTCATCTTC	Eurogentec
Acyl-CoA Oxidase 1 (Acox1) reverse	CTTGATGGTAGTCCGGAGA	Eurogentec
Carbohydrate-responsive element-binding protein, CHREBP (Chrebp), total forward	GAAGCCACCCTATAGCTCCC	Eurogentec
Carbohydrate-responsive element-binding protein, CHREBP (Chrebp), total reverse	CTGGGGACCTAAACAGGAGC	Eurogentec
Carnitine-palmitoyltransferase-1 (Cpt1) forward	CCAAACGTCCTGCCTAAGCT	Eurogentec
Carnitine-palmitoyltransferase-1 (Cpt1) reverse	TAGTTGCCACCATGACTTG	Eurogentec
Cluster of differentiation 36 (Cd36) forward	GATGACGTGGCAAAGAACAG	Eurogentec
Cluster of differentiation 36 (Cd36) reverse	TCCTCGGGTCTGAGTTAT	Eurogentec
Collagen type 1 alpha 1 (Col1a1) forward	GCTCCTCTTAGGGGCCACT	Eurogentec
Collagen type 1 alpha 1 (Col1a1) reverse	CCACGTCTCACCATTGGGG	Eurogentec
Collagen type 3 alpha 1 (Col3a1) forward	CTGTAACATGGAAACTGGGGAAA	Eurogentec
Collagen type 3 alpha 1 (Col3a1) reverse	CCATAGCTGAACTGAAAACCACC	Eurogentec
Collagen type 4 alpha 2 (Col4a2) forward	GACCGAGTGCGGTTCAAAG	Eurogentec
Collagen type 4 alpha 2 (Col4a2) reverse	CGCAGGGCACATCCAACCTT	Eurogentec
Cytochrome P450 (Cyp4a10) forward	TCCAGCAGTCCCATCACCT	Eurogentec
Cytochrome P450 (Cyp4a10) reverse	TTGCTTCCCCAGAACCATCT	Eurogentec
Cytochrome P450 (Cyp4a14) forward	TCAGTCTATTTCTGCTGTTC	Eurogentec
Cytochrome P450 (Cyp4a14) reverse	GAGCTCCTTGCTCTTCAGATGGT	Eurogentec

Fatty acid elongase 6 (Elovl6) forward	ACAATGGACCTGTCAGCAAA	Eurogentec
Fatty acid elongase 6 (Elovl6) reverse	GTACCAGTGCAGGAAGATCAGT	Eurogentec
Fatty acid synthase, FAS (Fasn) forward	TTCCAAGACGAAAATGATGC	Eurogentec
Fatty acid synthase, FAS (Fasn) reverse	AATTGTGGGATCAGGAGAGC	Eurogentec
Fibronectin forward	TGGCTGCCTTCAACTTCTCCT	Eurogentec
Fibronectin reverse	TGTTTGATCTGGACTGGCAGTTT	Eurogentec
Interleukine 1 beta (Il-1) forward	GCCAACAAGTGGTATTCTCCA	Eurogentec
Interleukine 1 beta (Il-1) reverse	TGCCGTCTTTCATCACACAG	Eurogentec
Interleukine 6 (Il-6) forward	GTGGCTAAGGACCAAGACCA	Eurogentec
Interleukine 6 (Il-6) reverse	TAACGCACTAGGTTTGCCGA	Eurogentec
L32 ribosomal protein (L32) forward	CAAGGAGCTGGAGGTGCTGC	Eurogentec
L32 ribosomal protein (L32) reverse	CTGCTCTTTCTACAATGGC	Eurogentec
Monocyte chemoattractant protein 1 (Mcp1) forward	TTAAAAACCTGGATCGGAACCAA	Eurogentec
Monocyte chemoattractant protein 1 (Mcp1) reverse	GCATTAGCTTCAGATTTACGGGT	Eurogentec
Peroxisome proliferator-activated receptor alpha PPAR α (Ppara) forward	AGTTCACGCATGTGAAGGCTG	Eurogentec
Peroxisome proliferator-activated receptor alpha PPAR α (Ppara) reverse	TTCCGGTTCTTCTTCTGAATC	Eurogentec
Stearoyl-CoA desaturase 1 (Scd1) forward	TGGGTTGGCTGCTTG TG	Eurogentec
Stearoyl-CoA desaturase 1 (Scd1) reverse	GCGTGGGCAGGATGAAG	Eurogentec
Sterol regularory element binding protein 1c, SREBP1C (Srebp1c) forward	GCAGCCACCATCTAGCCTG	Eurogentec
Sterol regularory element binding protein 1c, SREBP1C (Srebp1c) reverse	CAGCAGTGAGTCTGCCTTGAT	Eurogentec
Transforming growth factor b1 (Tgfb1) forward	CAACAATTCCTGGCGTTACCTTGG	Eurogentec
Transforming growth factor b1 (Tgfb1) reverse	GAAAGCCCTGTATTCCGTCTCCTT	Eurogentec
Tumor necrosis factor alpha (Tnfa) forward	AGGCTGCCCCGACTACGT	Eurogentec

Tumor necrosis factor alpha (Tnfa) reverse	GACTTTCTCCTGGTATGAGATAGCAAA	Eurogentec
Vimentin forward	CGGCTGCGAGAGAAATTGC	Eurogentec
Vimentin reverse	CCACTTTCCGTTCAAGGTCAAG	Eurogentec
α 2 -Smooth muscle actin (Acta2) forward	GTCCCAGACATCAGGGAGTAA	Eurogentec
α 2 -Smooth muscle actin (Acta2) reverse	TCGGATACTTCAGCGTCAGGA	Eurogentec

Biological samples :

Description	Source	Identifier
Insulin – Prozinc 40UI/mL	Boehringer Ingelheim	

Software :

Software name	Manufacturer	Version
ChemiDoc Software	Biorad	Version 1.2.0.12
Image Lab	Biorad	Version 5.2.1 ; RRID: SCR_014210
ImageJ	http://imagej.nih.gov/ij	Version 1.47 ; RRID: SCR_003070
Fiji	http://fiji.sc/	Version 1.51n ; RRID:SCR_002285
Multiskan Go	Thermo scientific	Version 1.00.40
Skannit software	Thermo scientific	Version 3.2
Biorad CFX Manager	Biorad	Version 3.1
NIS-Elements	Nikon	Version F4.60.00 64bit
Prism	GraphPad	6.05

Other :

Description	Supplier	Identifier
Pierce™ BCA Protein Assay Kit	Thermo Scientific	Cat# 23225
Clarity™ Western ECL Substrate	Biorad	Cat# 170-5061
ProLong™ Glod antifade reagent	Invitrogen	Cat# P36934

Triglycerides FS	Diasys	Cat# 157109910021
Cholesterol FS	Diasys	Cat# 113009910021
NEFA FS	Diasys	Cat# 157819910935
QuantiTect Reverse Transcription Kit	Qiagen	Cat# 205314
SSO advanced universal SYBR Green Supermix	Biorad	Cat# 172-5274
TRIzol™ Reagent	Invitrogen	Cat# 15596026
Standard diet	SAFE Laboratory	A04
High-Fat/High Sucrose diet	INRA Jouy-en-Josas, France	N/A
Hoechst 33342	Invitrogen	Cat# H3570
HDL and LDL/VLDL Cholesterol Assay Kit	Abcam	Cat# ab65390

Bibliography of supplemental methods

1. Mithieux G, Guignot L, Bordet J-C, et al. Intrahepatic mechanisms underlying the effect of metformin in decreasing basal glucose production in rats fed a high-fat diet. *Diabetes*. 2002 Jan;51(1):139–43.
2. Monteillet L, Gjorgjieva M, Silva M, et al. Intracellular lipids are an independent cause of liver injury and chronic kidney disease in non alcoholic fatty liver disease-like context. *Mol Metab*. 2018 Aug 1;16:100–15.
3. Mithieux G, Bady I, Gautier A, et al. Induction of control genes in intestinal gluconeogenesis is sequential during fasting and maximal in diabetes. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2004 Mar;286(3):E370-375.
4. Rajas F, Bruni N, Montano S, et al. The glucose-6 phosphatase gene is expressed in human and rat small intestine: Regulation of expression in fasted and diabetic rats. *Gastroenterology*. 1999 Jul;117(1):132–9.
5. Rajas F, Jourdan-Pineau H, Stefanutti A, et al. Immunocytochemical localization of glucose 6-phosphatase and cytosolic phosphoenolpyruvate carboxykinase in gluconeogenic tissues reveals unsuspected metabolic zonation. *Histochem Cell Biol*. 2007 May;127(5):555–65.
6. Wang Y, Bernhardt AJ, Nacson J, et al. BRCA1 intronic Alu elements drive gene rearrangements and PARP inhibitor resistance. *Nat Commun*. 2019 Dec 11;10(1):5661.
7. Zheng L, Wu J, Mo J, et al. Polydatin Inhibits Adipose Tissue Inflammation and Ameliorates Lipid Metabolism in High-Fat-Fed Mice. *BioMed Res Int*. 2019;2019:7196535.
8. Soty M, Penhoat A, Amigo-Correig M, et al. A gut–brain neural circuit controlled by intestinal gluconeogenesis is crucial in metabolic health. *Mol Metab*. 2014 Dec 26;4(2):106–17.
9. Rohrbach TD, Asgharpour A, Maczys MA, et al. FTY720/Fingolimod Decreases Hepatic Steatosis and Expression of Fatty Acid Synthase in Diet-Induced Non-Alcoholic Fatty Liver Disease in Mice. *J Lipid Res*. 2019 May 20;jlr.M093799.
10. García-Tuñón I, Alonso-Pérez V, Vuelta E, et al. Splice donor site sgRNAs enhance CRISPR/Cas9-mediated knockout efficiency. *PLoS One*. 2019;14(5):e0216674.
11. Aryal B, Rotllan N, Araldi E, et al. ANGPTL4 deficiency in haematopoietic cells promotes monocyte expansion and atherosclerosis progression. *Nat Commun*. 2016 Jul 27;7.
12. Du M, Sun Z, Lu Y, et al. Osthole inhibits proliferation and induces apoptosis in BV-2 microglia cells in kainic acid-induced epilepsy via modulating PI3K/Akt/mTOR signalling way. *Pharm Biol*. 2019 Dec;57(1):238–44.
13. Dong H, Cui B, Hao X. MicroRNA-22 alleviates inflammation in ischemic stroke via p38 MAPK pathways. *Mol Med Rep*. 2019 Jul;20(1):735–44.
14. Gjorgjieva M, Calderaro J, Monteillet L, et al. Dietary exacerbation of metabolic stress leads to accelerated hepatic carcinogenesis in glycogen storage disease type Ia. *J Hepatol*. 2018 Nov 1;69(5):1074–87.

B. Rôle de la néoglucogenèse intestinale sur le métabolisme du tissu adipeux

Le tissu adipeux qui joue un rôle clé dans le stockage de l'énergie, est amené à modifier son métabolisme au cours de l'obésité afin de faire face à un influx important de lipides lié notamment à l'augmentation des apports caloriques. Ces adaptations vont conduire à un stockage de lipides accru dans les différents dépôts adipocytaires, associé à l'installation d'un état pro-inflammatoire et pro-fibrotique. De plus, ces altérations du métabolisme du tissu adipeux sont étroitement liées au développement d'une résistance locale et périphérique à l'insuline (757,758).

D'autre part, le tissu adipeux et principalement le TAB joue un rôle important dans la dépense énergétique par l'intermédiaire de la thermogenèse (503,510,523–526). Ce poste de dépense d'énergie est important dans le maintien de la balance énergétique et sa contribution diminue au cours de l'obésité (525,526). Ainsi, augmenter la thermogenèse dans le tissu adipeux représente un moyen thérapeutique intéressant pour lutter contre l'obésité et ses pathologies associées (510–512,540,541). Le tissu adipeux exerce également une fonction endocrine impliquée dans le contrôle du métabolisme de nombreux autres tissus. Or, au cours de l'obésité, le profil de sécrétion de ces adipokines est modifié, avec une augmentation et une diminution des adipokines délétères et bénéfiques, respectivement (680,759–761).

L'objectif de cette étude est d'étudier les effets d'une induction et d'une absence de la NGI sur le métabolisme du tissu adipeux dans un contexte alimentaire délétère (HF-HS pendant 5 mois) et standard, respectivement. Nous avons vu précédemment que la NGI joue un rôle important dans le contrôle du poids corporel et nous précisons dans cette étude que c'est en modulant la quantité de masse grasse (753). En effet, l'induction et l'absence de NGI entraîne une diminution et une augmentation de la masse grasse chez les souris $I.G6pc^{overexp}$ et $I.G6pc^{-/-}$, respectivement.

De façon intéressante, nous démontrons également que l'induction de la NGI protège des modifications délétères du tissu adipeux observées dans l'obésité. En effet, dans ce contexte, les adipocytes bruns sont également recrutés pour le stockage d'énergie sous forme de lipides, ce qui se traduit par un blanchissement du tissu adipeux brun et une perte de ses capacités thermogéniques (525,526). Or, dans cette étude, nous montrons que l'induction de la NGI est capable de prévenir le blanchissement du TAB induit par un régime HF-HS, et

également d'activer le brunissement du tissu adipeux blanc épидидymaire. En effet, les souris I.G6pc^{overexp} présentent une induction de l'expression des marqueurs de thermogénèse dans ces deux dépôts de tissus adipeux. De façon cohérente avec ces résultats, nous montrons à la fois une augmentation de la température rectale et du dégagement de chaleur par le TAB interscapulaire des souris I.G6pc^{overexp} par rapport aux souris contrôles. De plus, l'induction de la NGI entraîne à la fois une augmentation de la dépense énergétique totale et de l'activité locomotrice en phase diurne. L'ensemble de ces effets positifs sur le métabolisme du tissu adipeux se traduit par une meilleure résistance au froid des souris I.G6pc^{overexp}. Au contraire, malgré un contexte alimentaire standard, l'absence de la NGI entraîne une diminution de l'expression des marqueurs de thermogénèse dans les tissus adipeux brun et blanc épидидymaire sans que les températures rectale et interscapulaire ne soient modifiées.

D'autre part, nous montrons que l'induction de la NGI prévient les altérations du profil de sécrétion des adipokines induites par une alimentation délétère HF-HS (680,759–761). En effet, le tissu adipeux blanc épидидymaire des souris I.G6pc^{overexp} montrent une diminution de la synthèse des adipokines pro-inflammatoires et une augmentation de l'adiponectine de haut poids moléculaire (HMW), connue pour ses effets métaboliques bénéfiques (724–728). Au contraire, l'absence de la NGI se traduit par une augmentation des adipokines pro-inflammatoires et une réduction de la synthèse de l'adiponectine de HMW.

Le tissu adipeux notamment par l'intermédiaire des adipokines joue un rôle clé dans le contrôle du métabolisme d'autres tissus, dont le pancréas ou le foie. Ainsi, les effets bénéfiques exercés par la NGI sur le métabolisme adipocytaire pourraient être impliqués dans l'amélioration du contrôle glycémique et dans la protection contre le développement de la stéatose hépatique observées chez les souris I.G6pc^{overexp} (753).

Enfin, nous montrons une augmentation et une diminution de l'expression du gène codant pour le récepteur β 3-adrénérique dans le tissu adipeux blanc épидидymaire des souris I.G6pc^{overexp} et I.G6pc^{-/-}, respectivement. Nous proposons que la NGI serait capable de moduler le métabolisme des différents dépôts de tissus adipeux en modulant l'activité du système nerveux sympathique par l'intermédiaire d'un relais central.

Les résultats de cette étude font l'objet d'un article rédigé en anglais qui n'est pas encore soumis pour publication.

Intestinal Gluconeogenesis Prevents Obesity-Linked deleterious changes in brown and white adipose tissues

Justine Vily-Petit^{1,2,3}, Maud Soty-Roca^{1,2,3}, Marine Silva^{1,2,3}, Clara Bron^{1,2,3}, Margaux Raffin^{1,2,3}, Rubén Nogueiras^{4,5}, Damien Roussel^{2,3,6}, Amandine Gautier-Stein^{1,2,3}, Fabienne Rajas^{1,2,3}, Gilles Mithieux^{1,2,3}

¹ Institut de la Santé et de la Recherche Médicale, U1213, Lyon, France

² Université Claude Bernard Lyon1, Villeurbanne, France

³ Université de Lyon, Lyon, France

⁴ Department of Physiology, School of Medicine-CIMUS, University of Santiago de Compostela-Instituto de Investigación Sanitaria, Santiago de Compostela, A Coruña, Spain

⁵ CIBER Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición (CIBERObn), Santiago de Compostela, Spain

⁶ Centre National de la Recherche Scientifique, UMR 5023 – LEHNA, Villeurbanne, France

Address for correspondence:

Gilles Mithieux

Inserm 1213

Université Lyon I Laennec

7-11, rue Guillaume Paradin

69372 Lyon cedex 8

France

Lead contact: Gilles Mithieux (gilles.mithieux@inserm.fr)

Tel: + 33 478 77 87 88

Keywords: intestinal gluconeogenesis; gut-brain neural communication; obesity, thermogenesis, adipose tissue

ABSTRACT

Obesity is a chronic disease characterized by a significant increase in adiposity. Thus, adipose tissue appears as the first tissue to undergo deleterious changes and the alteration of its metabolism may have negative repercussions on other tissues involved in the regulation of energy homeostasis. Intestinal gluconeogenesis (IGN) is a recently described function that contributes to the metabolic benefits of specific macronutrients as proteins or soluble fibers, *via* the initiation of a gut-brain nervous signal that controls the metabolism of peripheral tissue. In this study we investigate the specific effects of IGN on adipose tissue metabolism, without modification of the nutritional context.

We used two transgenic mouse models of suppression or overexpression of G6PC, the catalytic subunit of glucose-6 phosphatase (G6Pase), the key enzyme of endogenous glucose production, specifically in the intestine.

In a deleterious nutritional context (high fat-high-sucrose diet), we report here that mice with a genetic overexpression of IGN showed a lower adiposity and better thermogenic capacities than wild-type mice, by promoting the browning of white adipose tissue and preventing the whitening of brown adipose tissue. Interestingly, this confers upon mice overexpressing IGN a better resistance to cold. Conversely, mice with genetic suppression of IGN spontaneously exhibit an increase in adiposity under a standard diet, associated with a decrease in markers of thermogenesis in both brown and white adipose tissues.

We conclude that an induction of IGN, *per se*, is sufficient to prevent the expansion and the alteration of adipose tissue metabolism occurring during the development of obesity.

INTRODUCTION

Faced to the exponential increase in the prevalence of obesity, the World Health Organization defined this disease as a global epidemic in 1997 and predicts that a quarter of the world's population will be obese by 2045. Surprisingly, the majority of the world's population lives in countries where overweight and obesity kill more people (at least 2.8 million deaths per year) than underweight. Obesity is generally a result of a disequilibrium in the energy balance, with an excess of caloric intake associated with an increase in sedentary lifestyles. The development of obesity is associated with the appearance of major metabolic complications such as type 2 diabetes (T2D), dyslipidemia or hepatic steatosis (1,2). Moreover, obesity is an important risk factor for many serious health problems as retinopathy, nephropathy, neuropathy, cardiovascular diseases and various cancer types (2–4).

Adipose tissue is an important tissue in maintaining energy homeostasis and has distinct morphological and histological characteristics. In mammals, white adipose tissue (WAT) is mainly dedicated to lipid storage while brown adipose tissue (BAT) is specialized in heat production. Both BAT and WAT can respond quickly to nutrient deprivation or excess through mechanisms of adipocyte hypertrophy and hyperplasia. Adipose tissue remodeling is a process, which is accelerated during the development of obesity. It involves alterations such as deregulation of fatty acid flux, mitochondrial dysfunctions, changes in adipokine synthesis, leading to insulin resistance, chronic inflammation, fibrosis and cell death (5–8). Insulin resistance in adipose tissue results in major changes in lipid metabolism and the development of dyslipidemia (9). In the early stages of obesity development, WAT is a preferential storage site for excessive circulating lipids and is the first but not the only one that undergoes deleterious changes during the development of obesity. Indeed, BAT is also recruited for lipid storage, and gradually loses its thermogenic capacity. This defect contributes to the aggravation of obesity and its associated complications such as insulin resistance (10,11).

In this context, it is noteworthy that a recently described function, intestinal gluconeogenesis (IGN), positively interferes with the control of glucose and energy homeostasis to exert anti-diabetic and anti-obesity effects. Glucose released in the portal vein is sensed by a glucose receptor present in the neural system (sodium-glucose co-transporter 3, SGLT3), which initiates a nervous signal to the hypothalamus (12–14). The induction of IGN prevents body weight gain, reducing fat mass expansion and increasing energy expenditure and improves glycaemic control decreasing hepatic glucose production and improving insulin

sensitivity (14–17). These metabolic benefits were previously observed in response to various nutritional manipulations such as upon protein- or fiber-enriched diets, or after gastric bypass surgery (15–20). Nevertheless, the determination of IGN beneficial functions *per se*, independently of any changes in the nutritional context, is a major concern of our recent work. For this purpose, we created a mouse model of constitutive overexpression of glucose-6-phosphatase (G6Pase), specifically in the intestine. Using this model, we demonstrated that the induction of IGN protects against the development of obesity and some of its associated complications induced by a hypercaloric diet. More precisely, IGN induction in a deleterious dietary context delays the onset of type 2 diabetes and protects against the development of steatosis, inflammation and fibrosis of the liver (21). In agreement with the data obtained from I.G6pc^{overexp} mice, mice invalidated for IGN (I.G6pc^{-/-} mice) appeared prone to develop hepatic steatosis.

In this work, we aim at understanding the role of IGN in the regulation of adipose tissue metabolism. Therefore, we studied 1/ whether the induction of IGN could protect adipose tissue metabolism in a deleterious context (high fat-high sucrose (HF-HS) diet for 5 months); 2/ whether the lack of IGN could be sufficient to alter adipose metabolism in the context of a normal chow diet.

METHODS

Animals and diets

We used two transgenic mouse models of suppression (I.G6pc^{-/-} mice, previously described (22)) or overexpression (I.G6pc^{overexp} mice; (21)) of IGN by targeting *G6pc*, the catalytic subunit of G6Pase that is the last enzyme operating before glucose release. Wild-type C57Bl6/J (WT, Charles River Laboratories, France) mice were used as control mice. All the mice were housed in the animal facility of Lyon 1 University (“Animalerie Lyon Est Conventiionnelle and Specific Pathogen Free”) under controlled temperature (22°C) conditions, with a 12-h light/dark cycle, and *ad libitum* access to water and food. I.G6pc^{-/-} mice received standard chow diet and I.G6pc^{overexp} mice received HF-HS diet.

HF-HS diet, consisting of 36.1% fat, 35% carbohydrates (50% maltodextrine + 50% sucrose) and 19.8% proteins, was produced by the Unité de Préparation des Aliments Expérimentaux

(INRA, UE0300, Jouy-en-Josas, France). Standard diet (SAFE A04, Augis, France) consisted of 3.1% fat, 60.4% carbohydrates (including 43.5% starch content) and 16.1% proteins.

All procedures were performed in accordance with the principles and guidelines established by the European Convention for the protection of Laboratory Animals. The regional animal care committee (CEEA-55, University Lyon I, France) approved all the experiments herein.

Histological and immunostaining analysis

For histological analyses of adipose tissues, formalin-fixed and paraffin-embedded tissues were cut in 4 µm thick sections and stained with hematoxylin and eosin (HE) staining, Masson's Trichrome staining, or immunostaining. For immunostaining, slices were incubated overnight at 4°C with primary antibodies produced in rabbits directed towards PRDM16 (PR domain containing 16) and UCP1 (Uncoupling Protein 1) (see additional methods). The slices were then incubated for 30 minutes at room temperature with a secondary antibody coupled to HRP (Horseradish peroxidase) and revealed using a 3,3'-diaminobenzidine (DAB) solution. The nuclei were labelled with haematoxylin. The slides were observed under an inverted microscope (Nikon Eclipse TS2R).

Electronic Microscopy

A piece (1mm³) of epididymal white adipose tissue (eWAT) and BAT was finely cut and added to a solution of glutaraldehyde 4% and cacodylate buffer 0.2M (CIQLE platform, Université Lyon 1, SFR Santé Lyon Est). Sections were observed with a transmission electron microscope JEOL 1400JEM (Tokyo, Japan) operating at 80kV equipped with a camera Orius 1000 gatan and Digital Micrograph (CIQLE platform, Université Lyon 1, SFR Santé Lyon Est). The number and the surface area of mitochondria were determined relative to the cytoplasm area (excluding the lipid droplet) using imageJ software. The results were obtained from the quantification of 10 images per sample (n=4).

Energy expenditure, locomotor activity, and nuclear magnetic resonance (MRI) analysis

Energy expenditure (EE) and locomotor activity (LA) were analyzed using a calorimetric system (*LabMaster; TSE Systems*) as previously described (23–26). This system is a

temperature-controlled (24 °C) open-circuit instrument that determines O₂ consumption and CO₂ production. Mice were placed for adaptation for 1 week before starting the measurements.

The measurement of body composition was evaluated using nuclear magnetic resonance imaging (Whole Body Composition Analyzer; EchoMRI; Houston, TX), as previously described (23,24). Measurements have been done on 6-7 animals per group.

Temperature measurements

Body temperature was recorded with a rectal probe connected to a digital thermometer (BAT-12 Microprobe-Thermometer; Physitemp, Clifton, NJ). Skin temperature surrounding BAT was measured with an infrared camera (B335 Thermal Imaging Camera; FLIR; West Malling, Kent, UK) (23,24) and analyzed with a specific software package (FLIR-Tools-Software; FLIR). Measurements have been done on 6-7 animals per group and two pictures were analyzed for each animal.

Cold exposure

I.G6pc^{overexp} and WT mice (n=5 per group) were fasted for 5 hours, then re-fed and exposed to a cold temperature of 6°C for 4 hours. Rectal temperature and food intake were then measured.

Gene expression analysis

Pieces of 150 mg of frozen eWAT or 20 mg of frozen BAT were homogenized using FastPrep[®] in Trizol reagent and total RNAs were isolated according to the manufacturer protocol (Invitrogen Life Technologies). Reverse transcription was done on 1µg of mRNA using the Qiagen QuantiTect Reverse Transcription kit. Real-time qPCRs were performed using sequence-specific primers supplied by Eurogentec (See additional methods) with SsoAdvanced[™] Universal SYBR[®] Green Supermix in a CFX Connect[™] Real-Time System (Biorad).

The expression of mRNAs was normalized to the L32 and cyclophilin expression for eWAT and BAT, respectively. The expression of target mRNAs was calculated using the 2- $\Delta\Delta$ Ct method expressed relative to WT controls.

Western blot analysis

Cell extracts from eWAT were lysed in standard lysis buffer (20 mM Tris-HCl, pH 8, 138 mM NaCl, 1% NP40, 2.7mM KCl, 1 mM MgCl₂, 5% glycerol, 5 mM EDTA, 1mM Na₃VO₄, 20mM

NaF, 1 mM DTT, 1% protease inhibitors), and homogenized using FastPrep[®]. Proteins were assayed in triplicate with Pierce[™] BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific).

Denaturing conditions : Aliquots of 30 µg of proteins, denatured in buffer (20% glycerol, 10% β-mercaptoethanol, 10% SDS, 62.5mM Tris) were analysed from 4%, 9% or 12% -SDS polyacrylamide gel electrophoresis and transferred to PVDF Immobilon membranes (Biorad). After 1h-saturation in TBS/0.2% Tween/2% milk (RT), the membranes were probed (overnight at 4°C) with rabbit or mouse antibodies diluted in TBS/0.2% Tween/2% milk, against different proteins of interest, which names, references and dilutions are specified in the additional methods. Then, membranes were rinsed three-times in TBS/0.2% Tween for 10min and incubated for 1h with goat secondary anti-rabbit or anti-mouse IgG linked to peroxidase (dilution 1:5,000; Biorad) in TBS/0.2% Tween/2% milk. Membranes were rinsed again and exposed to Clarity[™] Western ECL Substrate (Biorad). The intensity of the spots was determined by densitometry with ChemiDoc Software (Biorad) and analysed using the Image Lab[™] software (Biorad). Western blots were trimmed on the sides to show 3-4 representative samples of each experimental condition.

Native condition: To analyse the different conformations of adiponectin, aliquots of 30µg of protein were prepared in native Tris glycine sample buffer and analysed from NuPAGE 3-8% Tris-Acetate polyacrylamide gel electrophoresis in a tris-glycine native running buffer (Thermo Fisher Scientific). After 2-hours of migration at 130 V, proteins were transferred to PVDF Immobilon membranes (Biorad). After 1h-saturation in TBS/0.2% Tween/2% milk (RT), the membranes were probed (overnight at 4°C) with rabbit antibodies diluted in TBS/0.2% Tween/2% milk. Then, membranes were rinsed three-times in TBS/0.2% Tween for 10min and incubated for 1h with goat secondary anti-rabbit IgG linked to peroxidase (dilution 1:5 000, Biorad) in TBS/0.2% Tween/2% milk. Membranes were rinsed again and exposed to Clarity[™] Western ECL Substrate (Biorad). The intensity of the spots was determined by densitometry with ChemiDoc Software (Biorad) and analysed using the Image Lab[™] software (Biorad). The results were expressed as a ratio between the HMW and MMW forms of adiponectin (High molecular weight / Medium molecular weight).

Measure of mitochondria respiratory capacity

A piece of 20 mg of frozen BAT was homogenized with Dounce in a solution composed of 250mM Sucrose, 1mM EGTA, 20mM Tris-base, 1% BSA, pH 7.3. Mitochondrion-enriched homogenate was obtained by successive centrifugations (2x(1000g; 10min), 2x(10 000g; 10

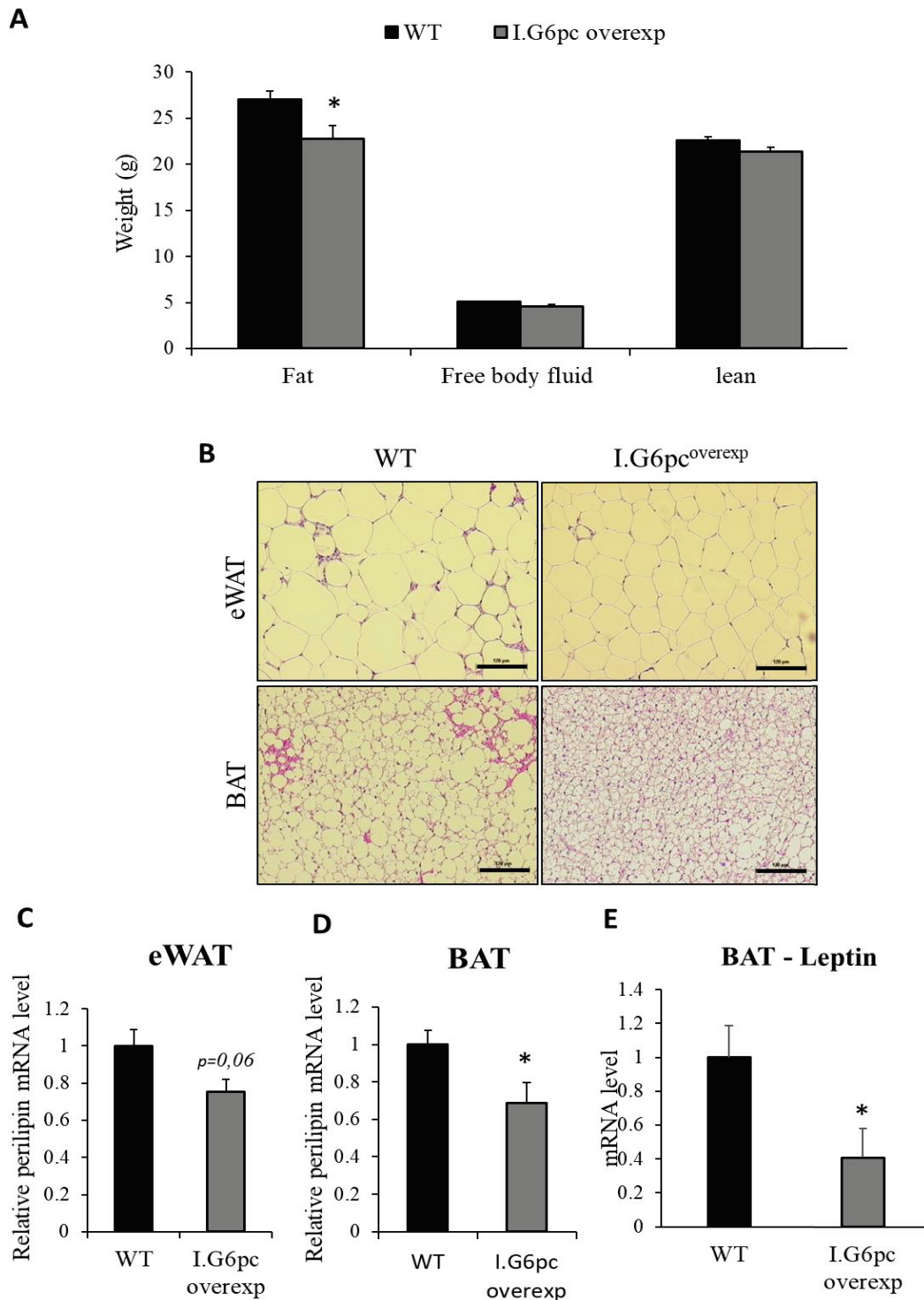


Figure 1: Induction of intestinal gluconeogenesis decreases fat mass expansion induced by high fat-high sucrose diet

(A) Body composition of I.G6pc^{overexp} and WT mice (means ± SEM, n= 6-7) (B) Hematoxylin and eosin staining of eWAT and BAT histological sections. Scale bar represents 120 μm. (C-D) Relative mRNA levels of *Perilipin* in the eWAT (C) and BAT (D) (means ± SEM, n= 5). (E) Relative mRNA levels of *Leptin* in the BAT (means ± SEM, n= 5-6). (A-E) Student's t-test was performed as a statistical analysis. *p < 0.05 versus WT mice.

min)). The measure was performed on 1mg/mL of protein in 200 μ L of solution composed of 120 mM KCl, 5mM KH₂PO₄, 1mM EGTA, 2mM MgCl₂, 3mM Hepes, 0.3% BSA, pH 7.4, using digital oxygen measurement controllers (Rank Brothers Ltd). Oxygen consumption was measured following the addition of different substrates: Pyruvate/Malate (5mM / 2,5mM), ADP (1mM), Succinate (5mM), Oligomycin (2,5 μ g/mL), p-trifluoromethoxy-carbonyl-cyanide-phenyl hydrazone (FCCP ; 5 μ M).

Statistical analysis

All data are presented as mean \pm SEM (standard error of the mean). Two-group comparisons were analysed using unpaired *t test*. Values were considered significant at * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$. Statistical details and exact value of “n” can be found in the figure legends. Statistical analyses were performed with GraphPad Prism 6 software.

RESULTS

Intestinal gluconeogenesis induction prevents the excessive development of fat mass in mice fed a high fat-high sucrose diet

To assess whether IGN *per se* could prevent the obesity-related excessive fat mass accumulation, i.e. independently of its activation upon specific nutritional manipulations, we generated a murine model of intestine-targeted G6Pase overexpression (21).

According to our previous study demonstrating the protective effect of IGN overexpression against obesity, I.G6pc^{overexp} mice had a lower fat mass than WT mice fed HF-HS diet (**Figure 1-A**). Histological observations of hematoxylin-stained brown and white adipose tissue slices showed that the adipocytes in the eWAT of I.G6pc^{overexp} mice appeared smaller compared to WT mice (**Figure 1-B**). Moreover, the adipocytes in the BAT of I.G6pc^{overexp} contained smaller lipid droplets than WT mice. Consistent with reduced lipid storage in BAT and eWAT of I.G6pc^{overexp} mice, the expression levels of *Perilipin*, which is the major lipid droplet coat protein in mature adipocytes tended to decrease in eWAT and significantly decreased in BAT compared to WT mice (**Figure 1-C-D**). In addition, *Leptin* expression levels were decreased by about 60% in the BAT of I.G6pc^{overexp} mice compared to WT mice (**Figure 1-E**).

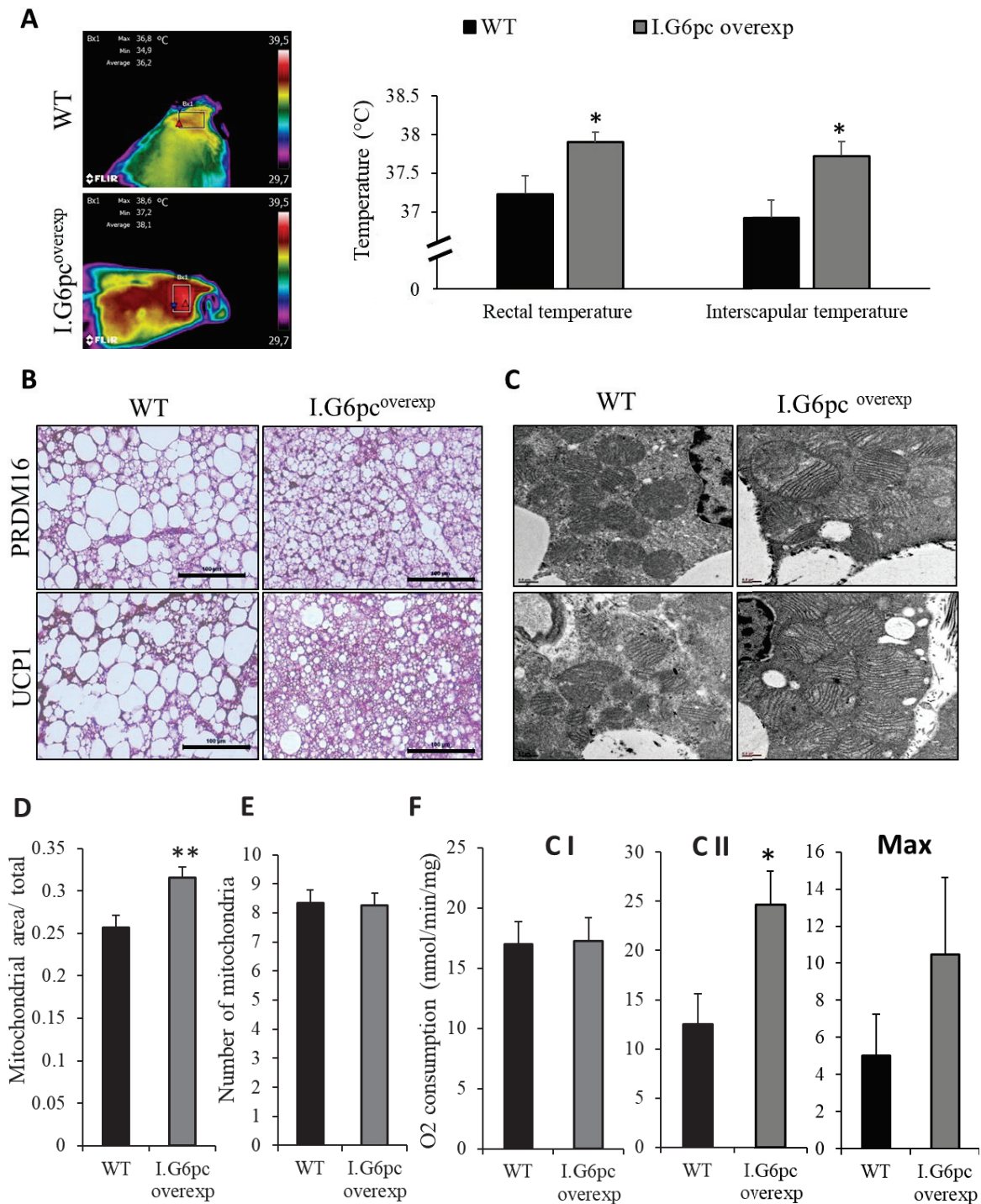


Figure 2: Induction of intestinal gluconeogenesis prevents brown adipose tissue whitening induced by high fat-high sucrose diet

(A) Skin temperature surrounding the BAT (interscapular region) and rectal temperature of I.G6pc^{overexp} and WT mice (means ± SEM, n= 6-7) (B) Representative pictures of UCP1 and PRDM16 staining (in brown) of BAT histological sections. Scale bar represents 100 μm. (C-D-E) Representative pictures of electronic microscopy of BAT sections, scale bar represents 0.5 μm (C) and quantification of mitochondria area (D) and number (E) (n=4; 10 pictures per mice). (F) Measure of BAT mitochondria respiratory capacity (means ± SEM, n=12-13). (A-F) Student's t-test was performed as a statistical analysis. *p < 0.05; ** p<0.01 versus WT mice.

Intestinal gluconeogenesis induction promotes thermogenesis and prevents whitening processes in brown adipose tissue in mice fed a high fat-high sucrose diet

Thermogenesis is an important energy expenditure component particularly involved in the resistance to cold and in the control of energy homeostasis. It is reduced in obese subjects because in this context BAT is recruited for the storage of excess lipids. This process is named whitening and results in the loss of BAT thermogenic capacities.

I.G6pc^{overexp} mice showed a higher rectal but also inter-scapular temperatures compared to WT mice, suggesting an active thermogenesis particularly in the BAT (**Figure 2-A**). Moreover, we demonstrated by immunochemistry labelling that levels of two thermogenic markers, UCP1 and PRDM16 were higher in I.G6pc^{overexp} BAT compared to WT mice (**Figure 2-B**). Consistent with an increased thermogenesis in the BAT of mice I.G6pc^{overexp}, electron microscopy analysis revealed that mitochondria were not more numerous but bigger in these mice compared to WT mice (**Figure 2-C-D-E**). This modification in mitochondria size could result in a greater mitochondrial activity. Consistent with this hypothesis, the measurement of mitochondrial respiratory capacities showed an increase in the activity of complex II in the BAT of I.G6pc^{overexp} compared to WT mice, with no change in the activity of complex I (**Figure 2-F**). In addition, the experiment using FCCP demonstrated that maximal mitochondrial respiratory capacity tended to increase in the BAT of I.G6pc^{overexp} mice (**Figure 2-F**).

Lastly, the induction of IGN protected the BAT of I.G6pc^{overexp} mice against the whitening process, which usually occurs in a deleterious nutritional context, thus preserving BAT thermogenic capacities, crucial for the maintenance of energy balance.

Intestinal gluconeogenesis induction promotes browning processes in epididymal white adipose tissue in mice fed a high fat-high sucrose diet

White adipose tissue can acquire thermogenic capacities under certain conditions such as cold exposure. This process named browning is modulated by the sympathetic nervous system (SNS). In the eWAT of I.G6pc^{overexp} mice, we observed an increase in the expression levels of thermogenic markers, including *Ucp1*, *Prdm16*, and *Ppargc1a* (tendency ; *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha*) and of $\beta 3$ Adrenergic receptor (*Adrb3*) (**Figure 3-A-C**). These latter results suggested that the increase in thermogenic factors in I.G6pc^{overexp} eWAT could be mediated by the activation of SNS. Moreover, expression levels of *Ppara*, *Hsl* (*Hormone sensitive lipase*) and *CoxIV* (*Cytochrome c oxidase subunit 4*) were

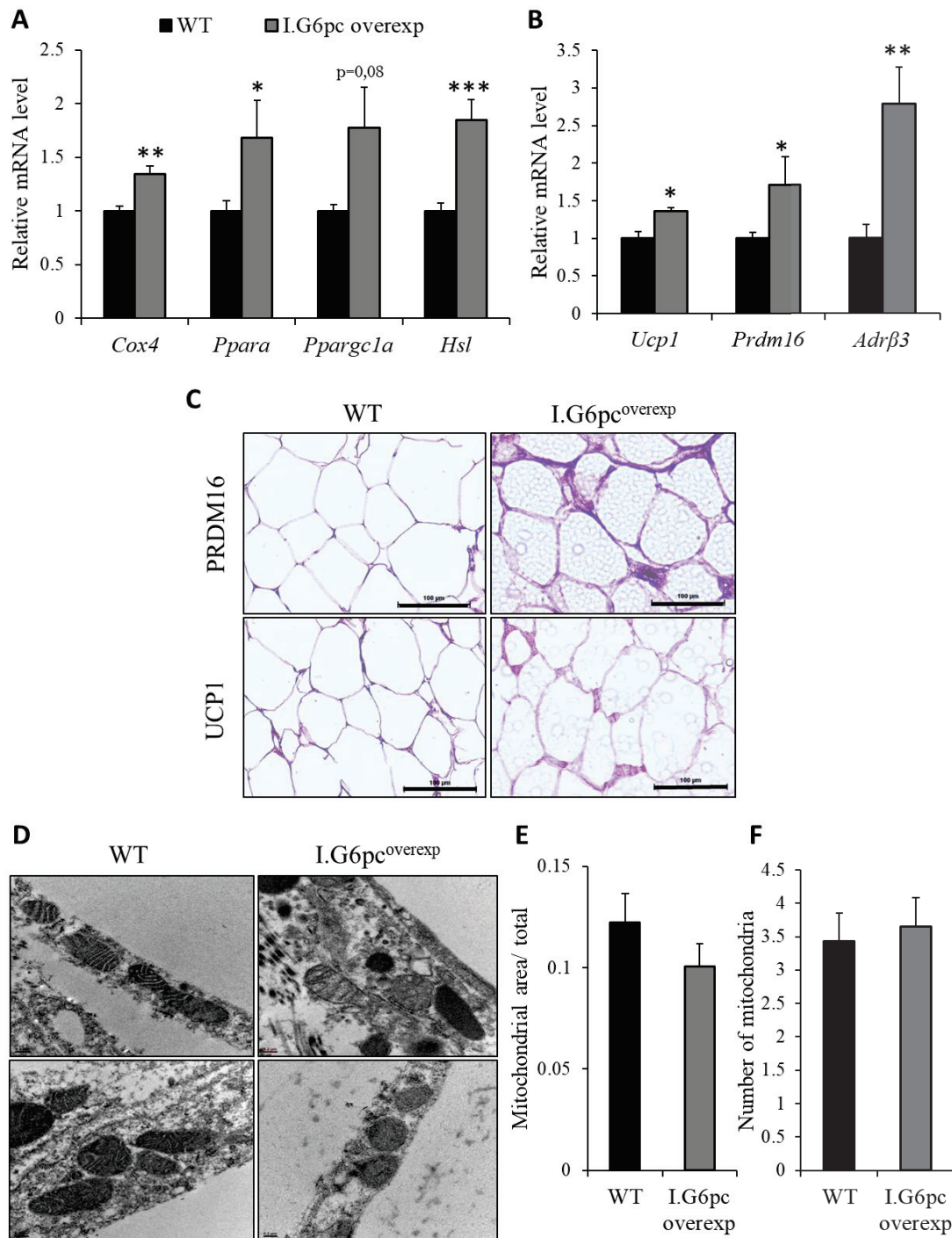


Figure 3: Induction of intestinal gluconeogenesis promotes the browning of white adipose tissue in mice fed high fat-high sucrose diet

(A) Relative mRNA levels of genes involved in WAT lipolysis (means \pm SEM, n=4-6). (B) Relative mRNA levels of genes implicated in thermogenesis capacity (means \pm SEM, n=4-6). (C) Representative pictures of UCP1 and PRDM16 staining (in brown) of eWAT histological sections. Scale bar represents 100 μ m. (D-E-F) Representative pictures of electronic microscopy of eWAT sections, Scale bar represents 0.5 μ m (D) and quantification of mitochondria area (E) and number (F) (n=4; 10 pictures per mice). Student's t-test was performed as a statistical analysis. *p < 0.05; ** p<0.01; ***p<0.001 versus WT mice.

increased in the eWAT of I.G6pc^{overexp} compared to WT mice, illustrating a stimulation of adipocyte metabolism (**Figure 3 A-B**). Nevertheless, we failed to show any difference in the size or in the number of mitochondria in the eWAT from both experimental groups (**Figure 3 D-F**).

Enhanced BAT thermogenesis and eWAT browning in I.G6pc^{overexp} mice improves energy balance

Then, we investigated whether the increase in thermogenesis in I.G6pc^{overexp} mice would confer on them a better resistance to cold (**Figure 4 A-B**). We demonstrated that I.G6pc^{overexp} mice better maintained their body temperature than WT mice when exposed to a cold temperature of 6 °C for 3 hours, without any change in their food intake (**Figure 4 A-B**).

In addition, we measured that I.G6pc^{overexp} mice significantly increased their energy expenditure and locomotor activity in the diurnal period compared to WT mice, without change in food intake (**Figure 4-C-D**).

Intestinal gluconeogenesis induction prevents alterations in adipokine secretion induced by a high fat-high sucrose diet

During the development of obesity, the WAT is the site of numerous deleterious changes, including the alteration in the production and release of adipokines. In the eWAT of I.G6pc^{overexp} mice, we measured a decrease in the gene expression of the necrosis marker TNF α , without any change in the expression of pro-inflammatory markers (**Figure 5-A**). In parallel, I.G6pc^{overexp} eWAT showed increased in adiponectin expression levels (*AdipoQ*). We also measured an increase in the HMW adiponectin conformation, which corresponds to the biologically active form exerting the majority of beneficial peripheral effects (**Figure 5-B-C**).

In addition, while expression levels of pro-fibrotic markers were not modified, results of the Masson trichrome staining suggested a reduction in fibrosis in the eWAT I.G6pc^{overexp} mice (**Figure 5-D-E**).

Specific deletion of intestinal gluconeogenesis promotes lipid storage and alteration in adipokine secretion in mice fed a standard diet

Previously, we have shown that IGN deletion favours the development of hepatic steatosis, despite a standard diet (21). In this present study, we observed that the absence of this function also promoted lipid storage in the WAT, illustrated by a higher weight of the eWAT

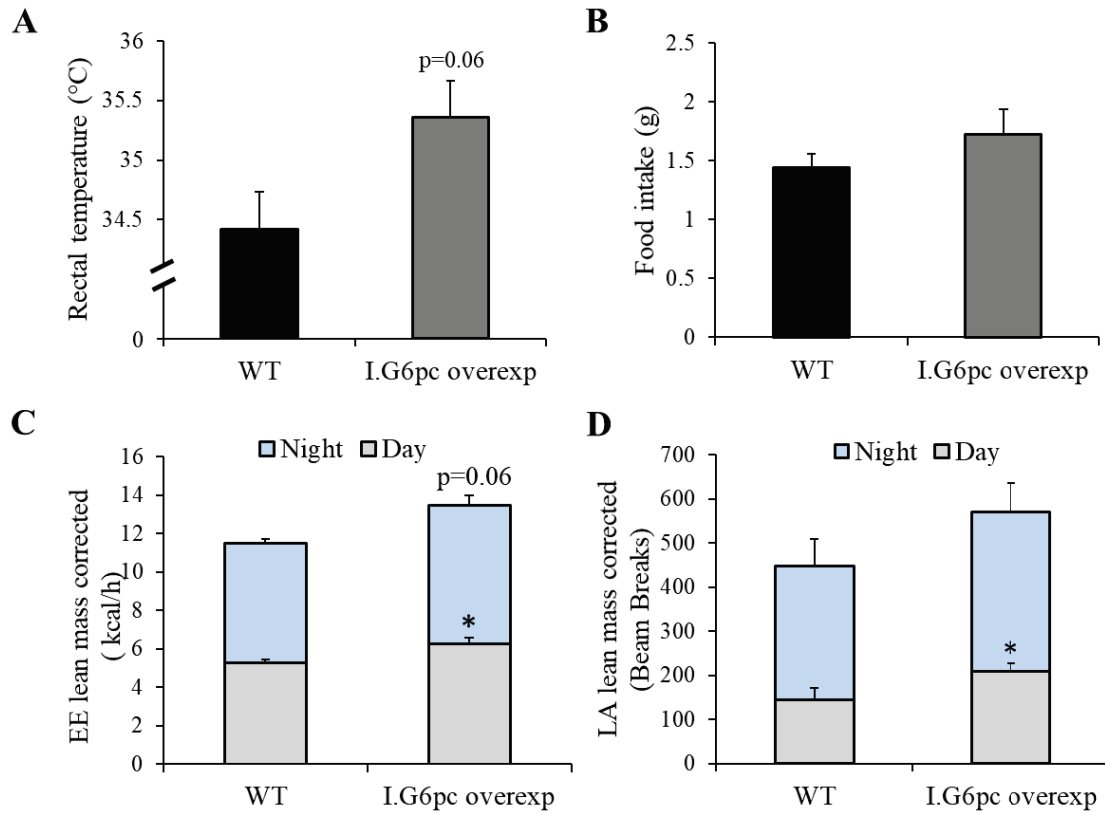


Figure 4: Induction of intestinal gluconeogenesis potentiates the resistance to cold and increases energy expenditure in mice fed high fat-high sucrose diet

(A-B) Rectal temperature and food intake following 4-hours cold exposure (6°C) (means ± SEM, n=5). (C) Total energy expenditure (EE) lean mass corrected (means ± SEM, n=6-7). (D) Locomotor activity (LA) lean mass corrected (means ± SEM, n=6-7). Student's t-test was performed as a statistical analysis. *p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001 versus WT mice.

and subcutaneous WAT in I.G6pc^{-/-} than in WT mice (**Figure 6-A-C**). Hematoxylin-stained sections of adipose tissues showed an increase in the size of adipocytes and of lipid droplets in the eWAT and BAT of I.G6pc^{-/-} mice, respectively, compared to WT mice (**Figure 6-D**). In agreement with an increase in adiposity in I.G6pc^{-/-} mice, *Perilipin* expression levels were increased in the eWAT, but not in the BAT (**Figure 6-E**). Nevertheless, the decrease in *Ucp1* expression levels in the BAT were not reflected into lower rectal and inter-scapular temperatures in I.G6pc^{-/-} mice (**Figure 6-F-G**). Moreover, IGN deletion led to a decrease in expression levels of proteins and genes involved in eWAT thermogenic capacities, such as UCP1, PRDM16, *Ppargc1a*, *CoxIV* and *Hsl* (**Figure 6-H-I**). In addition, we showed a decrease of about 60% in *Adrb3* expression levels (**Figure 6-H**).

Even in a normal nutritional state (standard diet), the absence of IGN was sufficient to increase expression levels of the pro-inflammatory markers *Il-1* and *Il-6*, and the necrosis factor *Tnfa* in the eWAT (**Figure 7-A-B**) and conversely, to decrease expression levels of gene and HMW conformation of Adiponectin. (**Figure 6-C-D**). Pro-inflammatory processes can lead to the extra-cellular matrix proliferation, contributing to fibrosis development in adipose tissue. Nevertheless, we failed to demonstrate an increase in the expression levels of pro-fibrotic markers in the eWAT of I.G6pc^{-/-} mice (**Figure 6-E**).

Despite all these deleterious modifications in adipocyte metabolism, we failed to observe any modification in energy expenditure and locomotor activity in I.G6pc^{-/-} mice fed standard diet. (**Figure S1-A-B**).

DISCUSSION

Intestinal gluconeogenesis (IGN) is a new function, which positively interferes with the control of glucose and energy homeostasis. The metabolic benefits conferred by IGN induction were previously observed upon various nutritional manipulations. Indeed, IGN is a causal link in the anti-obesity and anti-diabetic effects of dietary proteins and soluble fibers (17,20,22,27). In particular, fiber-enriched diets reduce weight gain and fat mass in WT mice fed an HF-HS diet (17). Importantly, these metabolic benefits were suppressed in I.G6pc^{-/-} mice. In order to study the beneficial effects of IGN *per se*, independently of the nutritional context, we generated mouse models of overexpression or suppression of IGN, by targeting G6PC, the catalytic subunit of G6Pase which is the last enzyme operating before glucose release. A previous study

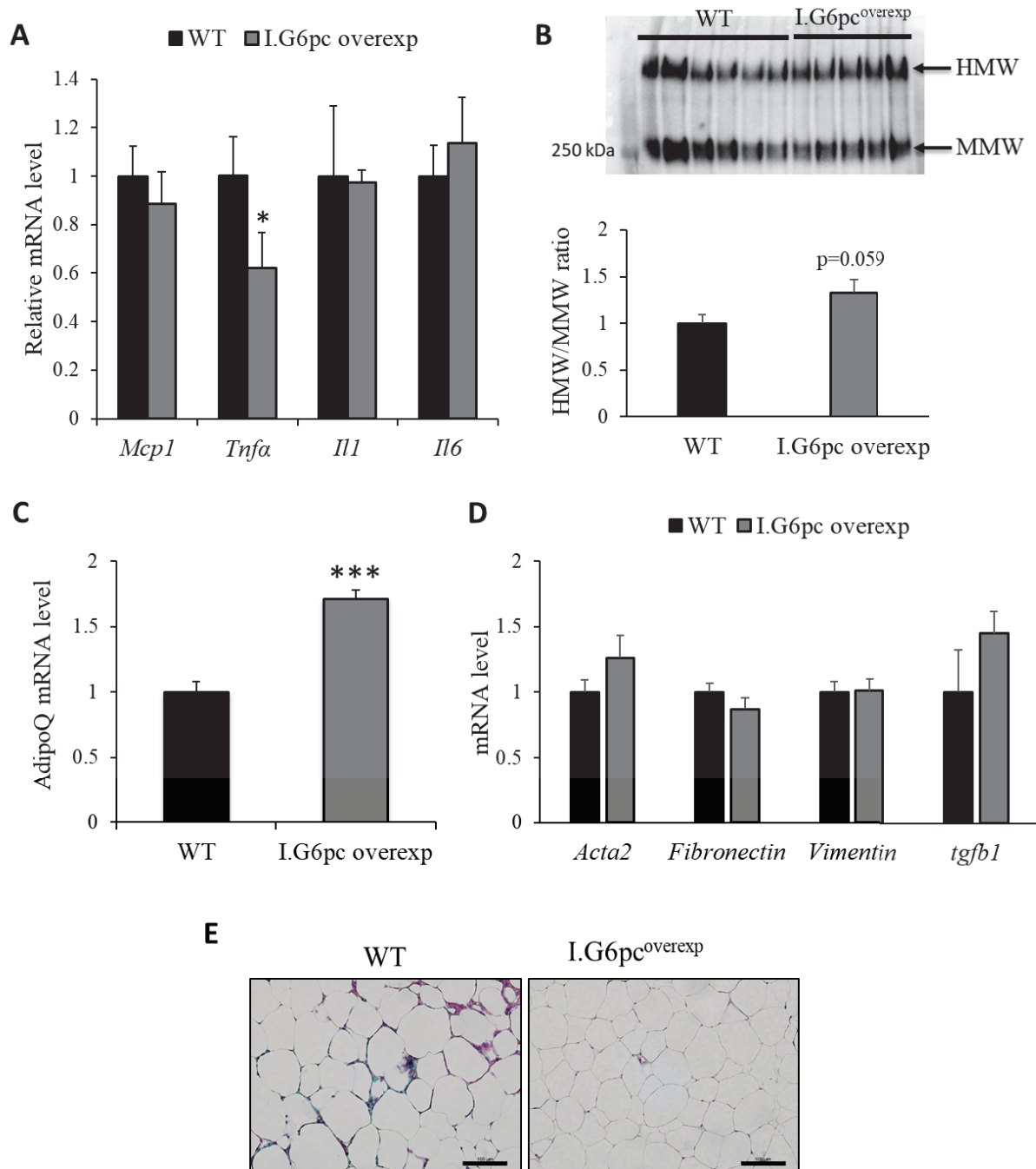


Figure 5: Induction of intestinal gluconeogenesis protects against deleterious changes in adipokine secretion profile induced by high fat-high sucrose diet

(A) Relative mRNA levels of genes involved in pro-inflammatory processes (means \pm SEM, n=5-6). (B) Representative image of non-denaturing SDS-PAGE in the eWAT. The graph shows the quantification of High Molecular Weight (HMW)/Medium Molecular Weight (MMW) forms (means \pm SEM, n= 10-12). (C) mRNA levels of *AdipoQ* expression (means \pm SEM, n=4-6). (D) Relative mRNA levels of genes involved in pro-fibrotic processes (means \pm SEM, n=5-6). (E) Masson trichrome staining of liver histological sections. Scale bar represents 100 μ m. (A-D) Student's t-test was performed as a statistical analysis. *p < 0.05; ***p<0.001 versus WT mice.

has shown that IGN induction protects against the development of obesity and associated complications, including hepatic steatosis (21).

In agreement with the protection against obesity induced by 5 months of HF-HS diet, we reported here that the induction of IGN, in addition to decreasing the ectopic storage of lipids in the liver, led to less lipid storage in both eWAT and BAT. Because the expansion of adipose tissue in obesity is associated with adipocyte death, hypoxia, deregulation of fatty acid flows and adipokine secretion and can lead to a chronic pro-inflammatory and insulin-resistant state, the prevention of this alteration is therefore a key parameter (for review see (8)).

BAT is the main player in nonshivering thermogenesis and its activity varies according to age, outside temperature, gender, and fat mass expansion (28–33). In obese subjects, BAT undergoes profound deleterious changes. Indeed, prospective studies in humans have shown that the activity of BAT decreases with increasing adiposity (32,34). Thus, the induction of BAT thermogenesis represents a therapeutic target in the treatment of obesity and potentially in the prevention of its associated complications. In this context, we showed here that I.G6pc^{overexp} mice had a higher body temperature associated with an increase in heat production by the BAT compared to WT mice. These data therefore strongly suggest that the induction of IGN protects the BAT against the whitening process, which occurs in a deleterious nutritional context such as a HF-HS diet and induces the loss of thermogenic capacities (10,35,36).

The morphology of mitochondria is a key parameter for an optimal metabolic activity of BAT, and particularly for thermogenesis (29,37). The mitochondrial uncoupling protein UCP1, located in the mitochondrial inner membrane, allows H⁺ proton leakage associated with heat generation. Specifically, the interaction of an anionic fatty acid with UCP1 allows the H⁺ fixation and translocation in the mitochondrial matrix by conformational change (38). This process can be inhibited by binding of a purine nucleotide to UCP1, which masks the interaction site. On the contrary, an increase in mitochondria size in BAT could be accompanied with an unmasking of GDP-binding site on UCP1 that removes the inhibition exerted on UCP1 thus promoting the BAT activity (29,39,40). In line with these data, the increase in mitochondria size in the BAT of I.G6pc^{overexp} mice could contribute to the induction of heat production in BAT. Induction of UCP1-dependent thermogenesis by cold exposure requires an increase in the oxidation of succinate, while an inhibition of complex II suppresses cold-induced thermogenesis (41). Thus, we propose that the increase in complex II activity measured in I.G6pc^{overexp} BAT could be responsible for their better resistance to cold.

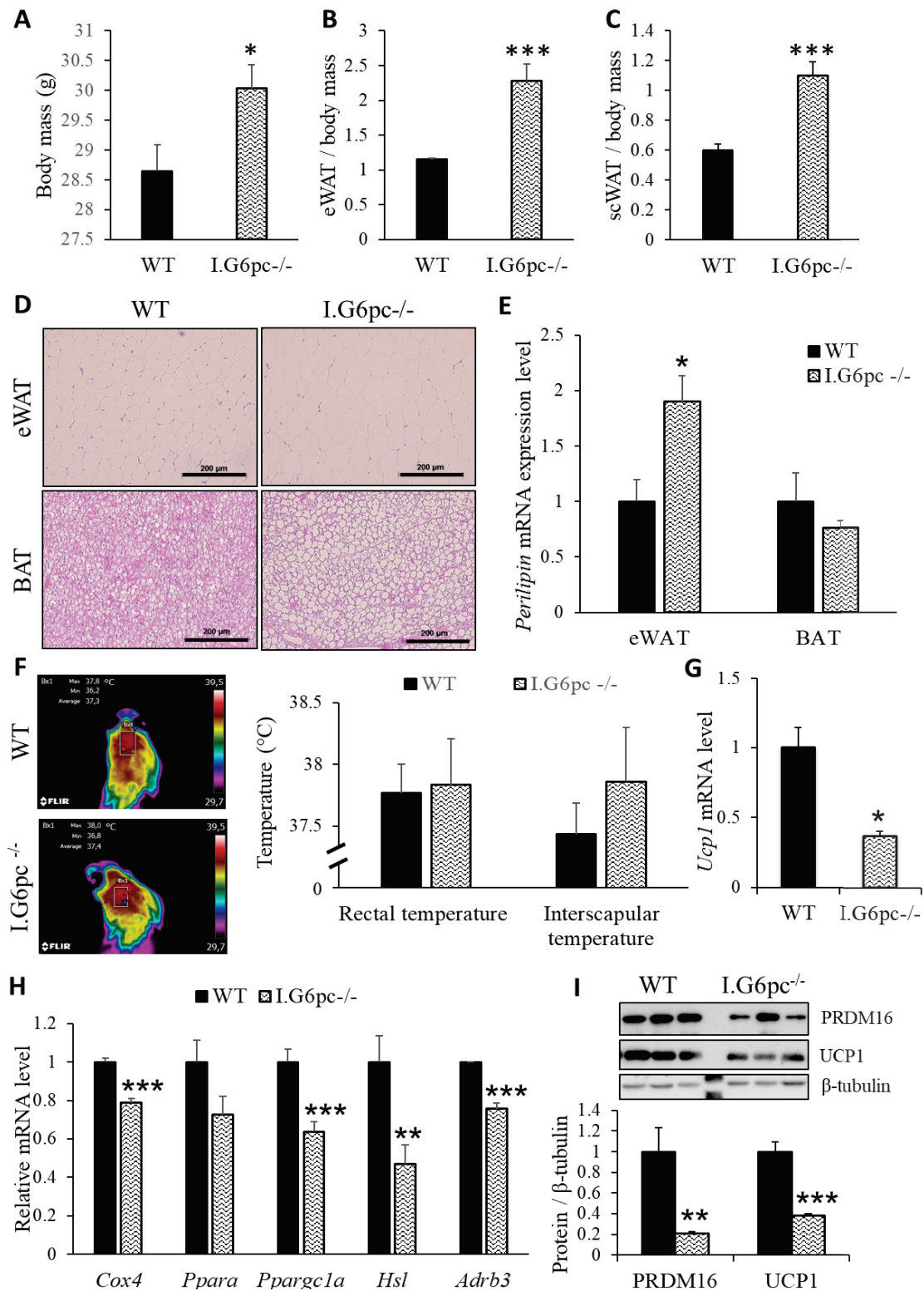


Figure 6: Absence of intestinal gluconeogenesis promotes adipose tissue alterations (in standard diet)

(A) Body mass of I.G6pc^{-/-} and WT mice (means ± SEM, n=7-8). (B-C) eWAT and scWAT mass relative to body mass (means ± SEM, n=7-8). (D) Hematoxylin and eosin staining of eWAT and BAT histological sections. Scale bar represents 200 μm. (E) Relative *Perilipin* mRNA expression levels in the eWAT and BAT (means ± SEM, n=4-6). (F) Skin temperature surrounding BAT (interscapular region) and rectal temperature of I.G6pc^{-/-} and WT mice (means ± SEM, n= 6-7). (G) Relative mRNA levels of *Ucp1* in the BAT (means ± SEM, n=3-4). (H) Relative mRNA levels of genes involved in eWAT lipolysis and thermogenesis (means ± SEM, n=4-6). (I) Relative quantification of protein levels of PRDM16 and UCP1 in the eWAT (means ± SEM, n=5) and representative western blot picture.

BAT thermogenesis and the process of browning in WAT, which corresponds to the appearance of beige adipocytes capable of producing heat, are mainly under the control of the SNS (29,42–45). In this study, we showed that IGN induction led to an increase in the expression levels of thermogenic markers and β 3-adrenergic receptor in the eWAT. These results suggest that IGN promotes the browning of the eWAT by involving a gut-brain-WAT neural axis and activating eWAT sympathetic tone. Interestingly, this increase in eWAT-thermogenesis likely contributes to both the better resistance to cold and the increase in energy expenditure in I.G6pc^{overexp} mice, improving energy balance.

Mice lacking IGN showed an increase in the size of adipocytes and lipid droplets associated to a decrease in the expression levels of thermogenic markers in both the eWAT and BAT. These alterations had not impact on rectal and inter-scapular temperatures but could be linked to the development of dyslipidemia in the absence of IGN (9,46). Indeed, the decrease in adipose tissue thermogenesis could be responsible, at least in part, for the increase in plasma triglycerides observed in I.G6pc^{-/-} mice (21). This excess may contribute to ectopic lipid accumulation in others tissues, particularly in the liver, which could worsen hepatic insulin resistance in I.G6pc^{-/-} mice (21). Conversely, the activation of both the eWAT and BAT metabolism in I.G6pc^{overexp} mice could contribute to the protection against obesity induced by HF-HS diet (21).

The adipose tissue is an important endocrine tissue implicated in the regulation of carbohydrate and energy homeostasis by secreting adipokines (Yanai and Yoshida, 2019). During the development of obesity, the secretion profile of these hormones is altered with a decrease in so-called beneficial adipokines, such as adiponectin, in favour of pro-inflammatory adipokines (47–50). This change could be strongly impacts the metabolism of other tissues, such as the liver, muscles and pancreas (49). A decreased in circulating adiponectin levels in obese patients was proposed to have a crucial role in the pathogenesis of metabolic complications associated with obesity, including hepatic steatosis (49,51–53). Moreover, adiponectin circulating level generally predicts the degree of steatosis and the severity of NAFLD (53). In this respect, adiponectin, which has beneficial anti-diabetes, anti-steatosis, anti-inflammation and anti-fibrosis effects, represents a key therapeutic target (53). Indeed, the administration of recombinant adiponectin has been shown to exert hepatoprotective effects in mice with NASH (54,55). In this context, I.G6pc^{overexp} mice showed an increase in gene expression of adiponectin and its HMW conformation, the main biologically active form exerting its beneficial peripheral effects, such as the improvement of hepatic insulin sensitivity

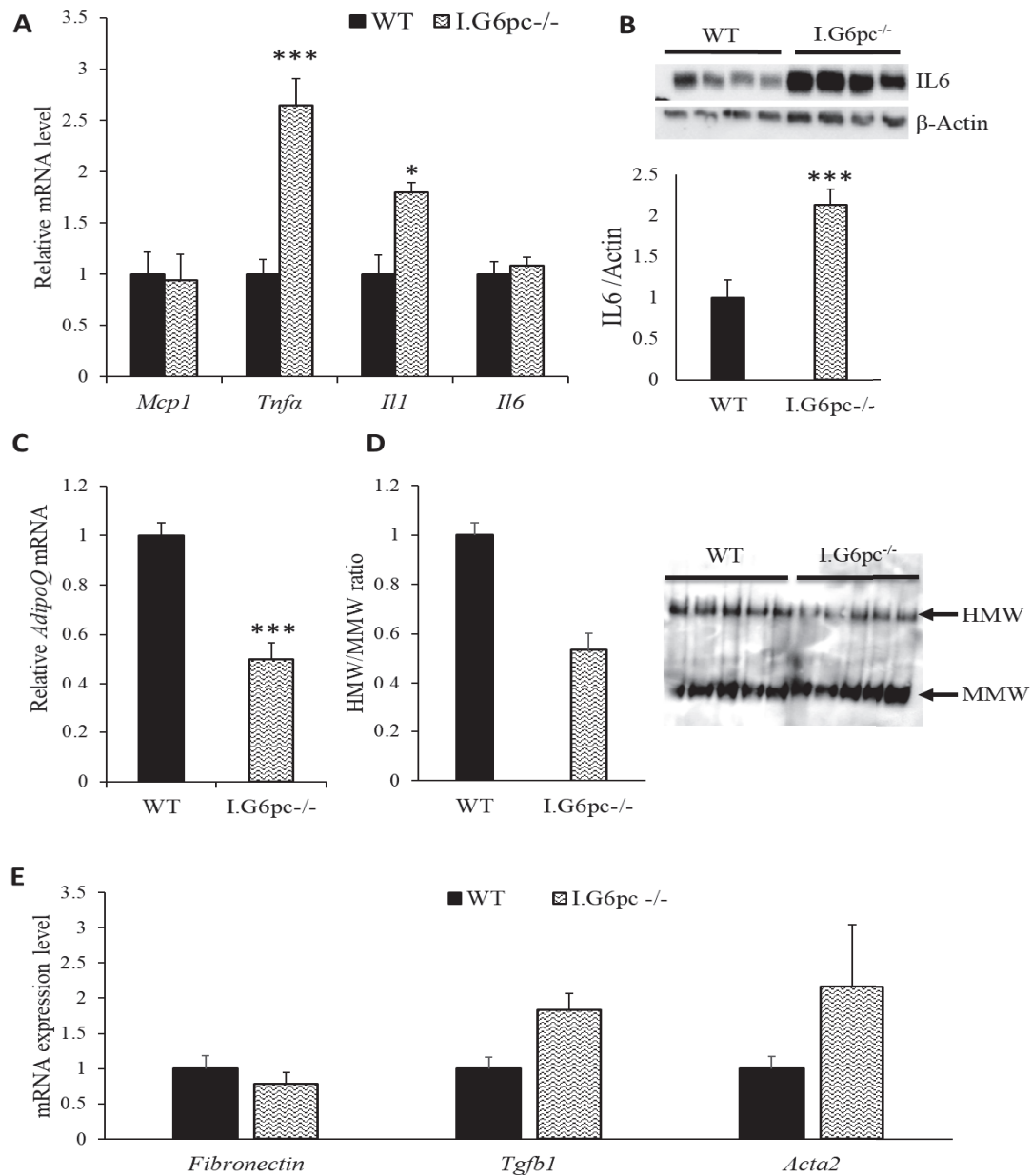


Figure 7: Absence of intestinal gluconeogenesis promotes deleterious changes in adipokine secretion profile (in standard diet)

(A) Relative mRNA levels of genes involved in pro-inflammatory processes (means \pm SEM, n=5-6). (B) Relative quantification of protein levels of IL6 in the eWAT (means \pm SEM, n=5) and representative western blot picture. (C) Relative mRNA levels of *AdipoQ* expression (means \pm SEM, n=7). (D) Representative image of non-denaturing SDS-PAGE in the eWAT. The graph shows the quantification of MHW/MMW forms (means \pm SEM, n= 5). (E) Relative mRNA levels of genes involved in pro-fibrotic processes (means \pm SEM, n=4-6).

or lipid metabolism. This modification may be involved in protecting against the development of hepatic steatosis and delaying the onset of diabetes in I.G6pc^{overexp} mice. In contrast, I.G6pc^{-/-} mice showed a decrease in HMW adiponectin levels and in the hepatic expression of its receptors AdipoR2, whose the activation is known to plays an important role in protecting against the NASH development (Vily-Petit , Soty and Mithieux, unpublished data) (56,57). All of these alterations could be partly involved in the installation of the pre-diabetic state and increase in hepatic lipid content previously observed in I.G6pc^{-/-} mice and characterized by hepatic insulin resistance and defects in insulin secretion by the pancreas (21,58).

On the other hand , I.G6pc^{overexp} mice fed HF-HS diet take less weight, without altering their food intake, but increasing their EE, as suggested in the context of induction of IGN by a fiber-enriched diet (17). This EE increase probably contributes to protect I.G6pc^{overexp} mice from the development of obesity and could result from the stimulation of their LA during the diurnal period, which normally corresponds to sleeping times in rodents. Interestingly, it has been shown that a hypercaloric western diet (40.3% lipids, 42.8% carbohydrates, 16.9% proteins and 5% cellulose) reduces LA from the first hours (starting at 4h) in mice (59). According to our results, the IGN induction could protect against this LA alteration induced by HF-HS diet (36.1% lipids, 35% carbohydrates and 19.8% proteins). Thus, all of these results show that the induction of IGN protects against obesity by increasing both the thermogenesis of adipose tissue and the locomotor activity.

CONCLUSION

In conclusion, we here demonstrated the beneficial effects of IGN on energy homeostasis regulation. Indeed, IGN controls fat mass, thermogenic capacities and the adipokine secretion profile through a gut-brain-adipose tissue neural circuit. Moreover, this modulation takes place independently of nutritional manipulations, such as protein or fiber-enriched diets. Therefore, these data highlight IGN induction as a potential therapeutic approach to prevent or correct obesity and its deleterious metabolic consequences, including the pathological expansion of adipose tissue or the energy expenditure decline.

ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank the members of Animalerie Lyon Est Conventionnelle et SPF (ALECS, Université Lyon 1, SFR Santé Lyon Est) for animal housing and care, and the members of the CIQLE platform (Université Lyon 1, SFR Santé Lyon Est) for histological and electro microscopy experiments (Université Lyon 1). We are grateful to Antoine Martinez for helpful advising in relation with overexpression technics at the beginning of this work. This work was supported by research grants from the Agence Nationale de la Recherche (ANR-17-CE14-0020-01), the Fondation pour la Recherche Médicale (Equipe FRM DEB20160334898) and the company Servier.

FINANCIAL SUPPORT STATEMENT

This work was supported by research grants from the Agence Nationale de la Recherche (ANR-17-CE14-0020-01), the Fondation pour la Recherche Médicale (Equipe FRM DEB20160334898) and the company Servier.

CONFLICT OF INTEREST STATEMENT

No conflict of interest has to be disclosed relating to the work described in this paper.

REFERENCES

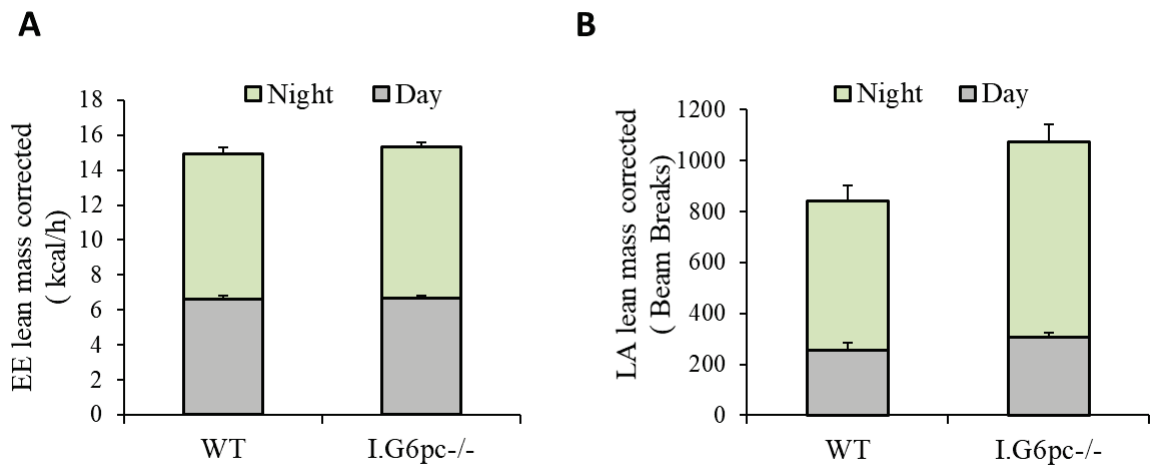
1. Dharmalingam M, Yamasandhi PG. Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Type 2 Diabetes Mellitus. *Indian J Endocrinol Metab.* 2018;22(3):421–8.
2. Reeves HL, Zaki MYW, Day CP. Hepatocellular Carcinoma in Obesity, Type 2 Diabetes, and NAFLD. *Dig Dis Sci.* 2016 May 1;61(5):1234–45.
3. Cade WT. Diabetes-Related Microvascular and Macrovascular Diseases in the Physical Therapy Setting. *Phys Ther.* 2008 Nov;88(11):1322–35.
4. Bianchini F, Kaaks R, Vainio H. Overweight, obesity, and cancer risk. *Lancet Oncol.* 2002 Sep 1;3(9):565–74.
5. Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM. Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science.* 1993 Jan 1;259(5091):87–91.
6. Kershaw EE, Flier JS. Adipose tissue as an endocrine organ. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004 Jun;89(6):2548–56.
7. Koh EH, Park J-Y, Park H-S, Jeon MJ, Ryu JW, Kim M, et al. Essential role of mitochondrial function in adiponectin synthesis in adipocytes. *Diabetes.* 2007 Dec;56(12):2973–81.
8. Sun K, Kusminski CM, Scherer PE. Adipose tissue remodeling and obesity. *J Clin Invest.* 2011 Jun;121(6):2094–101.
9. Vergès B. Pathophysiology of diabetic dyslipidaemia: where are we? *Diabetologia.* 2015;58(5):886–99.

10. Kotzbeck P, Giordano A, Mondini E, Murano I, Severi I, Venema W, et al. Brown adipose tissue whitening leads to brown adipocyte death and adipose tissue inflammation. *J Lipid Res.* 2018 May;59(5):784–94.
11. Yang X, Enerbäck S, Smith U. Reduced expression of FOXC2 and brown adipogenic genes in human subjects with insulin resistance. *Obes Res.* 2003 Oct;11(10):1182–91.
12. Delaere F, Duchampt A, Mounien L, Seyer P, Duraffourd C, Zitoun C, et al. The role of sodium-coupled glucose co-transporter 3 in the satiety effect of portal glucose sensing. *Mol Metab.* 2013 Feb;2(1):47–53.
13. Delaere F, Akaoka H, De Vadder F, Duchampt A, Mithieux G. Portal glucose influences the sensory, cortical and reward systems in rats. *Eur J Neurosci.* 2013 Nov;38(10):3476–86.
14. Soty M, Gautier-Stein A, Rajas F, Mithieux G. Gut-Brain Glucose Signaling in Energy Homeostasis. *Cell Metab.* 2017 Jun 6;25(6):1231–42.
15. Sun D, Wang K, Yan Z, Zhang G, Liu S, Liu F, et al. Duodenal-jejunal bypass surgery up-regulates the expression of the hepatic insulin signaling proteins and the key regulatory enzymes of intestinal gluconeogenesis in diabetic Goto-Kakizaki rats. *Obes Surg.* 2013 Nov;23(11):1734–42.
16. Troy S, Soty M, Ribeiro L, Laval L, Migrenne S, Fioramonti X, et al. Intestinal gluconeogenesis is a key factor for early metabolic changes after gastric bypass but not after gastric lap-band in mice. *Cell Metab.* 2008 Sep;8(3):201–11.
17. De Vadder F, Kovatcheva-Datchary P, Goncalves D, Vinera J, Zitoun C, Duchampt A, et al. Microbiota-Generated Metabolites Promote Metabolic Benefits via Gut-Brain Neural Circuits. *Cell.* 2014 Jan 16;156(1):84–96.
18. Duraffourd C, De Vadder F, Goncalves D, Delaere F, Penhoat A, Brusset B, et al. Mu-Opioid Receptors and Dietary Protein Stimulate a Gut-Brain Neural Circuitry Limiting Food Intake. *Cell.* 2012 Jul 20;150(2):377–88.
19. Gutierrez-Repiso C, Garcia-Serrano S, Moreno-Ruiz FJ, Alcain-Martinez G, Rodriguez-Pacheco F, Garcia-Fuentes E. Jejunal gluconeogenesis associated with insulin resistance level and its evolution after Roux-en-Y gastric bypass. *Surg Obes Relat Dis Off J Am Soc Bariatr Surg.* 2017 Apr;13(4):623–30.
20. Mithieux G, Misery P, Magnan C, Pillot B, Gautier-Stein A, Bernard C, et al. Portal sensing of intestinal gluconeogenesis is a mechanistic link in the diminution of food intake induced by diet protein. *Cell Metab.* 2005 Nov;2(5):321–9.
21. Vily-Petit J, Soty-Roca M, Silva M, Raffin M, Gautier-Stein A, Rajas F, et al. Intestinal gluconeogenesis prevents obesity-linked liver steatosis and non-alcoholic fatty liver disease. *Gut.* 2020 Mar 23;
22. Penhoat A, Mutel E, Amigo-Correig M, Pillot B, Stefanutti A, Rajas F, et al. Protein-induced satiety is abolished in the absence of intestinal gluconeogenesis. *Physiol Behav.* 2011 Nov 30;105(1):89–93.
23. Martínez de Morentin PB, Whittle AJ, Fernø J, Nogueiras R, Diéguez C, Vidal-Puig A, et al. Nicotine Induces Negative Energy Balance Through Hypothalamic AMP-Activated Protein Kinase. *Diabetes.* 2012 Apr;61(4):807–17.
24. Martínez de Morentin PB, González-García I, Martins L, Lage R, Fernández-Mallo D, Martínez-Sánchez N, et al. Estradiol regulates brown adipose tissue thermogenesis via hypothalamic AMPK. *Cell Metab.* 2014 Jul 1;20(1):41–53.
25. Martínez-Sánchez N, Seoane-Collazo P, Contreras C, Varela L, Villarroya J, Rial-Pensado E, et al. Hypothalamic AMPK-ER Stress-JNK1 Axis Mediates the Central Actions of Thyroid Hormones on Energy Balance. *Cell Metab.* 2017 Jul 5;26(1):212-229.e12.

26. Martins L, Seoane-Collazo P, Contreras C, González-García I, Martínez-Sánchez N, González F, et al. A Functional Link between AMPK and Orexin Mediates the Effect of BMP8B on Energy Balance. *Cell Rep.* 2016 23;16(8):2231–42.
27. De Vadder F, Kovatcheva-Datchary P, Zitoun C, Duchamp A, Bäckhed F, Mithieux G. Microbiota-Produced Succinate Improves Glucose Homeostasis via Intestinal Gluconeogenesis. *Cell Metab.* 2016 12;24(1):151–7.
28. Cannon B, Nedergaard J. The biochemistry of an inefficient tissue: brown adipose tissue. *Essays Biochem.* 1985;20:110–64.
29. Cannon B, Nedergaard J. Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol Rev.* 2004 Jan;84(1):277–359.
30. Cypess AM, Lehman S, Williams G, Tal I, Rodman D, Goldfine AB, et al. Identification and importance of brown adipose tissue in adult humans. *N Engl J Med.* 2009 Apr 9;360(15):1509–17.
31. Enerbäck S, Jacobsson A, Simpson EM, Guerra C, Yamashita H, Harper ME, et al. Mice lacking mitochondrial uncoupling protein are cold-sensitive but not obese. *Nature.* 1997 May 1;387(6628):90–4.
32. Saito M, Okamatsu-Ogura Y, Matsushita M, Watanabe K, Yoneshiro T, Nio-Kobayashi J, et al. High Incidence of Metabolically Active Brown Adipose Tissue in Healthy Adult Humans. *Diabetes.* 2009 Jul;58(7):1526–31.
33. Virtanen KA, Lidell ME, Orava J, Heglind M, Westergren R, Niemi T, et al. Functional brown adipose tissue in healthy adults. *N Engl J Med.* 2009 Apr 9;360(15):1518–25.
34. van Marken Lichtenbelt WD, Vanhommerig JW, Smulders NM, Drossaerts JMAFL, Kemerink GJ, Bouvy ND, et al. Cold-activated brown adipose tissue in healthy men. *N Engl J Med.* 2009 Apr 9;360(15):1500–8.
35. Cinti S. Transdifferentiation properties of adipocytes in the adipose organ. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2009 Nov;297(5):E977-986.
36. Giordano A, Smorlesi A, Frontini A, Barbatelli G, Cinti S. White, brown and pink adipocytes: the extraordinary plasticity of the adipose organ. *Eur J Endocrinol.* 2014 May;170(5):R159-171.
37. Desautels M, Himms-Hagen J. Parallel regression of cold-induced changes in ultrastructure, composition, and properties of brown adipose tissue mitochondria during recovery of rats from acclimation to cold. *Can J Biochem.* 1980 Oct;58(10):1057–68.
38. Bertholet AM, Kirichok Y. UCP1: a transporter for H⁺ and fatty acid anions. *Biochimie.* 2017 Mar;134:28–34.
39. Gribskov CL, Henningfield MF, Swick AG, Swick RW. Evidence for unmasking of rat brown-adipose-tissue mitochondrial GDP-binding sites in response to acute cold exposure. Effects of washing with albumin on GDP binding. *Biochem J.* 1986 Feb 1;233(3):743–7.
40. Huang SG, Klingenberg M. Nature of the masking of nucleotide-binding sites in brown adipose tissue mitochondria. Involvement of endogenous adenosine triphosphate. *Eur J Biochem.* 1995 May 1;229(3):718–25.
41. Mills EL, Pierce KA, Jedrychowski MP, Garrity R, Winther S, Vidoni S, et al. Accumulation of succinate controls activation of adipose tissue thermogenesis. *Nature.* 2018 Aug;560(7716):102–6.
42. Cousin B, Cinti S, Morroni M, Raimbault S, Ricquier D, Pénicaud L, et al. Occurrence of brown adipocytes in rat white adipose tissue: molecular and morphological characterization. *J Cell Sci.* 1992 Dec;103 (Pt 4):931–42.

43. Guerra C, Koza RA, Yamashita H, Walsh K, Kozak LP. Emergence of brown adipocytes in white fat in mice is under genetic control. Effects on body weight and adiposity. *J Clin Invest*. 1998 Jul 15;102(2):412–20.
44. Harms M, Seale P. Brown and beige fat: development, function and therapeutic potential. *Nat Med*. 2013 Oct;19(10):1252–63.
45. Wu J, Boström P, Sparks LM, Ye L, Choi JH, Giang A-H, et al. Beige Adipocytes Are a Distinct Type of Thermogenic Fat Cell in Mouse and Human. *Cell*. 2012 Jul 20;150(2):366–76.
46. Delarue J, Magnan C. Free fatty acids and insulin resistance. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2007 Mar;10(2):142–8.
47. Achari AE, Jain SK. Adiponectin, a Therapeutic Target for Obesity, Diabetes, and Endothelial Dysfunction. *Int J Mol Sci*. 2017 Jun 21;18(6).
48. Ouchi N, Kihara S, Arita Y, Nishida M, Matsuyama A, Okamoto Y, et al. Adipocyte-derived plasma protein, adiponectin, suppresses lipid accumulation and class A scavenger receptor expression in human monocyte-derived macrophages. *Circulation*. 2001 Feb 27;103(8):1057–63.
49. Yanai H, Yoshida H. Beneficial Effects of Adiponectin on Glucose and Lipid Metabolism and Atherosclerotic Progression: Mechanisms and Perspectives. *Int J Mol Sci*. 2019 Mar 8.
50. Yokota T, Oritani K, Takahashi I, Ishikawa J, Matsuyama A, Ouchi N, et al. Adiponectin, a new member of the family of soluble defense collagens, negatively regulates the growth of myelomonocytic progenitors and the functions of macrophages. *Blood*. 2000 Sep 1;96(5):1723–32.
51. Arita Y, Kihara S, Ouchi N, Takahashi M, Maeda K, Miyagawa J, et al. Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999 Apr 2;257(1):79–83.
52. Funahashi T, Nakamura T, Shimomura I, Maeda K, Kuriyama H, Takahashi M, et al. Role of adipocytokines on the pathogenesis of atherosclerosis in visceral obesity. *Intern Med Tokyo Jpn*. 1999 Feb;38(2):202–6.
53. Polyzos SA, Kountouras J, Zavos C, Tsiaousi E. The role of adiponectin in the pathogenesis and treatment of non-alcoholic fatty liver disease. *Diabetes Obes Metab*. 2010 May;12(5):365–83.
54. Fukushima J, Kamada Y, Matsumoto H, Yoshida Y, Ezaki H, Takemura T, et al. Adiponectin prevents progression of steatohepatitis in mice by regulating oxidative stress and Kupffer cell phenotype polarization. *Hepatol Res Off J Jpn Soc Hepatol*. 2009 Jul;39(7):724–38.
55. Xu A, Wang Y, Keshaw H, Xu LY, Lam KSL, Cooper GJS. The fat-derived hormone adiponectin alleviates alcoholic and nonalcoholic fatty liver diseases in mice. *J Clin Invest*. 2003 Jul;112(1):91–100.
56. Alzahrani B, Iseli T, Ramezani-Moghadam M, Ho V, Wankell M, Sun EJ, et al. The role of AdipoR1 and AdipoR2 in liver fibrosis. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*. 2018 Mar;1864(3):700–8.
57. Tomita K, Oike Y, Teratani T, Taguchi T, Noguchi M, Suzuki T, et al. Hepatic AdipoR2 signaling plays a protective role against progression of nonalcoholic steatohepatitis in mice. *Hepatol Baltim Md*. 2008 Aug;48(2):458–73.
58. Soty M, Penhoat A, Amigo-Correig M, Vinera J, Sardella A, Vullin-Bouilloux F, et al. A gut–brain neural circuit controlled by intestinal gluconeogenesis is crucial in metabolic health. *Mol Metab*. 2014 Dec 26;4(2):106–17.
59. Bjursell M, Gerdin A-K, Lelliott CJ, Eggecioglu E, Elmgren A, Törnell J, et al. Acutely reduced locomotor activity is a major contributor to Western diet-induced obesity in mice. *Am J Physiol-Endocrinol Metab*. 2008 Feb 1;294(2):E251–60.

SUPPLEMENTAL FIGURE



Supplemental figure 1:

(A) Total energy expenditure (EE) lean mass corrected (means \pm SEM, n=6-7). (B) Locomotor activity (LA) lean mass corrected (means \pm SEM, n=6-7). (A-B) Student's t-test was performed as a statistical analysis.

SUPPLEMENTAL METHODS

Organisms:

Name	Citation	Supplier	Strain	Sex	Age	Overall n number
WT	Soty et al., 2014	Charles River Laboratory	C57BL6/J	Male	13 weeks (fed standard diet) or 7 months (fed HF-HS diet)	38
I.G6pc ^{overexp}	Vily-Petit et al. submitted	Animalerie Lyon Est Conventiennelle et SPF	B6.rosa26 ^{G6pcLoxS} TOP -B6.vill ^{Cre/w}	Male	13 weeks (fed standard diet) or 7 months (fed HF-HS diet)	23
I.G6pc ^{-/-}	Soty et al., 2014	Animalerie Lyon Est Conventiennelle et SPF	B6.G6pclox/lox. VillCreERT2	Male	13 weeks (fed standard diet)	14

Sequence based reagents (Eurogentec) :

Name	Sequence
Adiponectin (AdipoQ) forward	GCAGAGATGGCACTCCTGGA
Adiponectin (AdipoQ) reverse	CCCTTCAGCTCCTGTCATTCC
Adrenergic receptor $\beta 3$ (ADR $\beta 3$) reverse	CGCGCACCTTCATAGCCATCAAACC
Adrenergic receptor $\beta 3$ (ADR $\beta 3$) forward	TCTAGTTCCCAGCGGAGTTTTTCATCG
Cluster of differentiation 36 (Cd36) forward	GATGACGTGGCAAAGAACAG
Cluster of differentiation 36 (Cd36) reverse	TCCTCGGGTCTGAGTTAT
Cyclophilin forward	TTGCCATTCCTGGACCCAAA
Cyclophilin reverse	ATGGCACTGGCGGCAGGTCC
Cytochrome c oxidase subunit IV (CoxIV) forward	CAAATCAGAACGAGCGCAG
Cytochrome c oxidase subunit IV (CoxIV) reverse	CCGACTGGAGCAGCCTTTC
Fibronectin forward	TGGCTGCCTTCAACTTCTCTCT
Fibronectin reverse	TGTTTGATCTGGACTGGCAGTTT
Hormone sensitive lipase (Hsl) forward	GCT GGA GGA GTG TTT TTT TGC
Hormone sensitive lipase (Hsl) reverse	AGT TGA ACC AAG CAG GTC ACA
Interleukine 1 beta (Il-1) forward	GCCAACAAGTGGTATTCTCCA

Interleukine 1 beta (Il-1) reverse	TGCCGTCTTTCATCACACAG
Interleukine 6 (Il-6) forward	GTGGCTAAGGACCAAGACCA
Interleukine 6 (Il-6) reverse	TAACGCACTAGGTTTGCCGA
L32 ribosomal protein (L32) forward	CAAGGAGCTGGAGGTGCTGC
L32 ribosomal protein (L32) reverse	CTGCTCTTCTACAATGGC
Lipoprotein lipase (Lpl) forward	GGCCAGATTCATCAACTGGAT
Lipoprotein lipase (Lpl) reverse	GCTCCAAGGCTGTACCCTAAG
Monocyte chemoattractant protein 1 (Mcp1) forward	TTAAAAACCTGGATCGGAACCAA
Monocyte chemoattractant protein 1 (Mcp1) reverse	GCATTAGCTTCAGATTTACGGGT
Perilipin-2 forward	GACCTTGTGTCTCCGCTTAT
Perilipin-2 reverse	CAACCGCAATTTGTGGCTC
Peroxisome proliferator-activated receptor alpha PPAR α (Ppara) forward	AGTTCACGCATGTGAAGGCTG
Peroxisome proliferator-activated receptor alpha PPAR α (Ppara) reverse	TTCCGGTTCTTCTTCTGAATC
Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha (Ppargc1a) forward	AGA CAA ATG TGC TTC CAA AAA GAA
Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha (Ppargc1a) reverse	GCC AAA CCA ACA ACT TTA TCT CTT C
PR domain containing 16 (PRDM16) forward	GCG TGC ATC CGC TTG TGC
PR domain containing 16 (PRDM16) reverse	CAGCACGGTGAAGCCATTC
Transforming growth factor b1 (Tgfb1) forward	CAACAATTCCTGGCGTTACCTTGG
Transforming growth factor b1 (Tgfb1) reverse	GAAAGCCCTGTATTCCGTCTCCTT
Tumor necrosis factor alpha (Tnfa) forward	AGGCTGCCCCGACTACGT
Tumor necrosis factor alpha (Tnfa) reverse	GACTTTCTCCTGGTATGAGATAGCAAA
Uncoupling Protein 1 (UCP1) forward	TACCAAGCTGTGCGATGT
Uncoupling Protein 1 (UCP1) reverse	AAGCCCAATGATGTTCAAGT
Vimentin forward	CGGCTGCGAGAGAAATTGC
Vimentin reverse	CCACTTCCGTTCAAGGTCAAG
α 2 -Smooth muscle actin (Acta2) forward	GTCCCAGACATCAGGGAGTAA
α 2 -Smooth muscle actin (Acta2) reverse	TCGGATACTTCAGCGTCAGGA

Antibodies used :

Name	Citation	Supplier	Cat no.	Clone no.
Rabbit polyclonal anti-PRDM16 (1/2000)	(762)	Abcam	AB106410	N/A
Rabbit polyclonal anti-UCP1 (1/10000)	(763)	Abcam	AB10983	N/A
Rabbit polyclonal anti- $\alpha\beta$ -tubulin (1/1000)	(764)	Cell signalling	2148	N/A
Mouse monoclonal anti- Il6 (1/500)	(765)	Santa Cruz Biotechnology	sc-57315	10E5
Rabbit polyclonal anti-adiponectin (1/1000)	(766)	Sigma-Aldrich	AB3269P	N/A

Software :

Software name	Manufacturer	Version
ChemiDoc Software	Biorad	Version 1.2.0.12
Image Lab	Biorad	Version 5.2.1 ; RRID: SCR_014210
ImageJ	http://imagej.nih.gov/ij	Version 1.47 ; RRID: SCR_003070
Fiji	http://fiji.sc/	Version 1.51n ; RRID:SCR_002285
Biorad CFX Manager	Biorad	Version 3.1
NIS-Elements	Nikon	Version F4.60.00 64bit
Prism	GraphPad	6.05

Other :

Description	Supplier	Identifier
Pierce™ BCA Protein Assay Kit	Thermo Scientific	Cat# 23225
Clarity™ Western ECL Substrate	Biorad	Cat# 170-5061
NuPAGE™ 3-8% Tris-Acetate Protein Gels, 1.0 mm, 10-well	Thermo Fisher Scientific	Cat# EA03785BOX
Tris-glycine native running buffer	Thermo Fisher Scientific	Cat# LC2672
Native Tris-glycine sample buffer	Thermo Fisher Scientific	Cat# Lc2673
QuantiTect Reverse Transcription Kit	Qiagen	Cat# 205314
SSO advanced universal SYBR Green Supermix	Biorad	Cat# 172-5274
TRIzol™ Reagent	Invitrogen	Cat# 15596026
Standard diet	SAFE Laboratory	A04
High-Fat/High Sucrose diet	INRA Jouy-en-Josas, France	N/A

DISCUSSION

Un déséquilibre de la balance énergétique, caractérisé par une diminution des dépenses au profit d'une augmentation des apports, conduit au développement de l'obésité. Cette maladie chronique, définie comme une épidémie mondiale depuis 1997 par l'OMS, affecte le fonctionnement de nombreux organes et favorise l'apparition de nombreuses pathologies. Dans ce contexte, le laboratoire a mis en évidence une nouvelle fonction, la NGI, qui exerce des effets bénéfiques sur le métabolisme (pour revue (279)). Le glucose qui est produit par l'intestin au cours du jeûne ou encore en période post-absorptive après la prise d'un repas riche en protéines ou en fibres, se comporte comme une molécule signal qui informe les régions centrales impliquées dans la régulation de l'homéostasie glucidique et énergétique. Mon projet de thèse visait à mettre en évidence les effets métaboliques bénéfiques de la NGI, en absence de manipulation nutritionnelle pour l'induire. Dans ce but, mes travaux ont reposé sur la comparaison de deux modèles transgéniques murins d'inactivation (souris $I.G6pc^{-/-}$) et d'induction de la NGI (souris $I.G6pc^{overexp}$).

1. La NGI contrôle la balance énergétique

1.1 L'induction de la NGI augmente l'activité locomotrice

Mes travaux démontrent le rôle essentiel de la NGI dans le maintien de la balance énergétique. En effet, l'induction de la NGI limite la prise de poids induite par un régime HF/HS, sans modifier la prise alimentaire, mais en augmentant la dépense énergétique, comme nous l'avons suggéré dans le cadre de l'induction de la NGI par un régime enrichi en fibres (746). Cette augmentation contribue probablement à protéger les souris $I.G6pc^{overexp}$ du développement de l'obésité et pourrait être consécutive à la stimulation de leur activité locomotrice pendant la période diurne, qui correspond normalement aux temps de sommeil des rongeurs. Or, il a été montré qu'un régime alimentaire de type occidental riche en calorie (40.3% lipides, 42.8% glucides, 16.9% protéines et 5% cellulose) diminue l'activité locomotrice dès les premières heures (à partir de 4h) chez la souris (767). D'après nos résultats, l'induction de la NGI pourrait protéger de cette altération induite par une alimentation HF-HS (36.1% lipides, 35% glucides et 19.8% protéines). D'autre part, il est important de souligner que ces mesures ont été effectuées à une température ambiante de 22°C qui ne correspond pas à une situation de thermoneutralité (30°C) pour la souris. Ainsi, la dépense énergétique mesurée inclut toutes les composantes dont la thermogénèse.

1.2 L'induction de la NGI augmente la thermogenèse du tissu adipeux

Le contrôle de la dépense énergétique par la NGI ne se limite pas à la modulation de l'activité locomotrice puisque nous mettons également en évidence son rôle essentiel dans la régulation de la thermogenèse du TAB et le brunissement du tissu adipeux blanc, qui correspond à l'apparition d'adipocytes beiges capables de produire de la chaleur. Ces processus sont des cibles clés dans les traitements contre l'obésité, et de nombreuses études pharmacologiques visent à identifier des molécules capables de les activer afin d'améliorer la santé métabolique (510–512,540,541). Parmi les molécules d'intérêt étudiées, on retrouve principalement des sympathomimétiques, dont l'éphédrine ou encore la caféine, qui sont capables d'induire la thermogenèse dans le tissu adipeux en activant les récepteurs β -adrénergiques et en réduisant le contenu en lipides du tissu adipeux, un paramètre important dans le contrôle de l'activité du TAB (503,510,523–526,768). En effet, des études prospectives chez l'homme ont montré que l'activité thermogénique du TAB diminue avec l'augmentation de l'adiposité (525,769). Mes travaux s'inscrivent parfaitement dans ce contexte puisqu'ils montrent que l'induction de la NGI, tout en diminuant l'adiposité, pourrait protéger le TAB contre les effets délétères du régime HF-HS, en limitant la perte de ses capacités thermogéniques. Ceci confère une meilleure résistance au froid aux souris I.G6pc^{overexp} (690–692). La NGI pourrait ainsi représenter un moyen thérapeutique clé pour induire les processus de thermogenèse et de brunissement du tissu adipeux blanc ; et ainsi contribuer à l'amélioration du bilan énergétique dans le traitement de l'obésité et potentiellement intervenir dans la protection de ses complications, telle que la stéatose hépatique (768,770,771).

2. La NGI contrôle le métabolisme hépatique

2.1 L'induction de la NGI protège du développement de la stéatose hépatique

Au cours de ma thèse j'ai pu montrer que l'induction de la NGI protège du développement de la stéatose hépatique induite par un régime HF-HS en diminuant à la fois le captage et la synthèse *de novo* de lipides dans le foie. Au contraire, l'induction de ces deux mécanismes en l'absence de NGI, aboutit à l'augmentation du contenu hépatique en lipides malgré un contexte alimentaire standard. Or, le métabolisme lipidique, notamment dans le foie, est sous le contrôle de l'insuline, et de façon cohérente avec les résultats obtenus dans le cadre d'une induction de la NGI par les régimes riches en fibres ou en protéines, nous montrons que les souris I.G6pc^{overexp} présentent une meilleure sensibilité à l'insuline (279,733,739–741,746).

De ce fait, nous suggérons que cette amélioration pourrait participer à la protection du développement de la stéatose hépatique observée lors de l'induction de la NGI dans notre modèle de souris (316,613,772). En miroir de ces données, l'état pré-diabétique, décrit précédemment chez des souris I.G6pc^{-/-}, et caractérisé par une insulino-résistance hépatique, pourrait favoriser l'augmentation du contenu en lipides dans le foie de ces souris (316,613,750,772). De plus, nous avons pu démontrer le rôle causal de la NGI dans la modulation de la stéatose hépatique en mettant en évidence une réduction de l'expression des marqueurs de la lipogenèse *de novo* par une perfusion de glucose dans la veine porte, visant à restaurer le signal glucose portal chez les souris I.G6pc^{-/-}.

2.2 L'induction de la NGI protège du développement de la stéato-hépatite non alcoolique

L'accumulation de lipides dans le foie peut ne pas perturber la fonction cellulaire mais peut aussi évoluer vers la NASH, un stade où la stéatose est associée à l'inflammation et/ou à la fibrose. Cet état peut conduire au développement de la cirrhose hépatique qui peut rester asymptomatique et insoupçonnable jusqu'à l'apparition de complications telles que l'ascite, la péritonite bactérienne spontanée, l'encéphalopathie ou encore la mort. Dans ces travaux, nous suggérons que l'induction de la NGI permettrait de prévenir l'ensemble de ces troubles en empêchant la progression de la maladie hépatique vers l'installation d'un état pro-inflammatoire et pro-fibrotique (pour revue (756)). En miroir de ces données, l'absence de NGI chez des souris nourries avec un régime standard entraîne l'apparition d'un état pro-inflammatoire sans fibrose. Ce dernier résultat pourrait s'expliquer par le fait que les expériences ont été réalisées en régime standard chez des souris âgées seulement de 13 semaines. Des conditions de durée qui pourraient être insuffisantes pour observer une fibrose. Cela peut également suggérer que seule l'induction de la NGI est susceptible de moduler la voie de la fibrose, tandis que la NGI basale (non stimulée) serait sans effet sur ce processus.

3. Influence de la NGI sur le métabolisme du foie et du tissu adipeux et les mécanismes mis en jeu

3.1 Modifications du métabolisme hépatique

▪ *Mise en jeu d'un circuit neuronal intestin-cerveau-foie*

Nos études précédentes réalisées dans le cadre d'une induction de la NGI par un régime riche en protéines, ont suggéré que cette fonction est capable de moduler le métabolisme hépatique par l'activation d'un circuit neuronal intestin-cerveau-foie (740).

Le métabolisme du foie est sous le contrôle des hormones pancréatiques mais aussi du système nerveux autonome. Nous avons montré une augmentation du nombre de neurones exprimant la tyrosine hydroxylase, un marqueur de l'activité sympathique dans le foie des souris I.G6pc^{overexp}. Ces résultats suggèrent que la NGI serait capable d'inhiber la voie de la lipogenèse *de novo* dans le foie en activant le SNS (754,755). D'autre part, bien que l'activation sympathique soit connue pour activer la PHG, nous avons montré que l'induction de la NGI par un régime enrichi en protéines était associée à une modération de la PHG (740,773). En accord avec des données de la littérature, nous suggérons que la PHG pourrait être davantage contrôlée par les hormones circulantes telles que l'insuline et le glucagon que par l'activation des nerfs hépatiques sympathiques (pour revue (773)).

- ***Rôle de l'insuline dans la régulation du métabolisme hépatique***

Les résultats contradictoires précédents pourraient s'expliquer par le paradoxe retrouvé dans le cadre du développement de l'insulino-résistance hépatique. En effet, le métabolisme hépatique est également régulé par les hormones circulantes telles que l'insuline, qui inhibe la PHG et induit la lipogenèse *de novo* par l'intermédiaire de l'activation du facteur de transcription SREBP-1c. Néanmoins, dans certaines conditions d'insulino-résistance hépatique, l'insuline n'est plus capable d'inhiber la PHG mais conserve sa capacité à induire la lipogenèse *de novo* (624–627). En accord avec ces données, l'absence de NGI est associée à une insulino-résistance et se traduit par une augmentation à la fois de la PHG et de la lipogenèse *de novo* qui pourrait être régulée, selon nos résultats, par SREBP-1c (279,740,746,750).

Cette résistance sélective à l'insuline pourrait s'expliquer par des différences d'expression des protéines IRS1 et IRS2, impliquées dans la voie de signalisation de l'insuline. Plus précisément, la protéine IRS1 serait plutôt impliqué dans les effets activateurs de l'insuline sur les gènes de la lipogenèse *de novo*, tandis que l'activation de IRS 2 serait associée aux effets inhibiteurs de l'insuline sur la PHG (pour revue (622)). Dans les modèles animaux d'insulino-résistance ou chez des patients obèses atteints de NAFLD non diabétiques, l'expression et l'activité d'IRS 2 est diminuée alors que l'expression d'IRS 1 n'est pas modifiée, ce qui permet à l'insuline d'induire SREBP-1c, et par conséquent la lipogenèse *de novo* (626,628,629). Ainsi, nous suggérons qu'en absence de NGI, l'augmentation de la lipogenèse *de novo* pourrait s'expliquer par une activation préférentielle de la protéine IRS1 par l'insuline au détriment de la protéine IRS2. L'hypothèse inverse peut être proposée pour justifier d'une part la diminution de la lipogenèse *de novo* consécutive à l'action de SREBP-1c observée chez les souris

I.G6pc^{overexp}, et d'autre part la diminution de la PHG associée à l'induction de la NGI par les protéines (740).

3.2 *Modifications du métabolisme du tissu adipeux*

▪ *Mise en jeu d'un circuit neuronal intestin-cerveau-tissu adipeux*

Le SNS est le principal acteur dans la régulation de la thermogénèse du tissu adipeux (510). En accord avec cela, l'augmentation de la thermogénèse chez les souris I.G6pc^{overexp} est associée à une augmentation de l'expression du récepteur adrénergique $\beta 3$ dans le tissu adipeux blanc épидидymaire (TAE). En miroir, la diminution des marqueurs thermogéniques chez les souris I.G6pc^{-/-} est associée à une diminution de l'expression de ce récepteur. Ainsi, nous suggérons que la NGI serait capable de contrôler le métabolisme du tissu adipeux en initiant, comme pour le foie, un circuit neuronal intestin-cerveau-TAE, impliquant le SNS.

▪ *Modulation de la thermogénèse et ses retentissements sur le métabolisme lipidique*

Bien que notre hypothèse principale implique que les effets de la NGI passent principalement par voie nerveuse, nous ne pouvons pas exclure que les modifications du métabolisme d'un tissu se répercutent sur celui des autres. En effet, la diminution de la thermogénèse du tissu adipeux, associée à l'excès d'apport alimentaire, peut conduire à une dyslipidémie et à une augmentation du stockage ectopique de lipides dans le foie, qui sont impliqués dans l'apparition de la résistance hépatique à l'insuline et du DT2 (510,774). Au contraire, l'activation de ce processus est impliquée dans la réduction des niveaux de triglycérides et de cholestérol plasmatiques chez les patients obèses (775,776). En accord avec ces données, la diminution de l'expression des marqueurs de thermogénèse dans le TAB et le TAE des souris I.G6pc^{-/-}, pourrait participer à l'augmentation des triglycérides plasmatiques, au développement de la résistance à l'insuline et à l'accumulation de lipides observés dans le foie (316,613,750). Au contraire, l'induction de la NGI pourrait contribuer à protéger les souris du développement de la stéatose hépatique en favorisant l'oxydation des lipides via la thermogénèse dans le tissu adipeux, sans pour autant moduler les taux de triglycérides circulants.

▪ *Modulation du profil de sécrétion des adipokines et son rôle dans l'apparition de la stéatose hépatique et du diabète*

D'autre part, le tissu adipeux est capable de contrôler le métabolisme des autres tissus tels que le foie, le muscle et le pancréas, en sécrétant des adipokines (760). Au cours du

développement de l'obésité, le profil de sécrétion de ces hormones est modifié avec une diminution des adipokines dites bénéfiques, comme l'adiponectine, au profit des adipokines pro-inflammatoires (680,759–761). Il a été proposé que la diminution du taux d'adiponectine circulante chez les patients obèses joue un rôle crucial dans la pathogenèse des complications métaboliques associées à l'obésité, dont la stéatose hépatique (724,760,777,778). En effet, le niveau d'adiponectine circulante prédit généralement le degré de stéatose et la gravité de la NAFLD (778). À cet égard, l'adiponectine, qui exerce des effets bénéfiques anti-diabète, anti-stéatose, anti-inflammation et anti-fibrose, représente une cible thérapeutique idéale (778). De plus, l'administration d'adiponectine recombinante exerce des effets hépato-protecteurs chez la souris atteinte de NASH (779,780). Dans ce contexte, l'augmentation de l'expression génique de l'adiponectine et de sa forme HMW pourrait participer à la protection contre le développement de la stéatose hépatique et au retardement de l'apparition du diabète chez les souris I.G6pc^{overexp}. En opposition, la diminution du taux d'adiponectine HMW en absence de NGI pourrait participer à l'accumulation de lipides dans le foie et à l'installation de l'état pré-diabétique observé chez les souris I.G6pc^{-/-} (750).

4. Conclusion et perspectives

Mes travaux de thèse ont permis de montrer les effets bénéfiques de la NGI en tant que telle, sur la régulation de l'homéostasie énergétique. Plus précisément, nous montrons le rôle central de la NGI dans la régulation du métabolisme du foie et du tissu adipeux. En effet, nous montrons que l'induction de la NGI est protectrice contre le développement de l'obésité, du DT2, de la stéatose hépatique et de l'expansion pathologique du tissu adipeux. En miroir de ces résultats, l'absence de cette fonction prédispose les animaux à des troubles métaboliques.

Nous suggérons que la NGI est capable de moduler le métabolisme du foie et du tissu adipeux en activant un axe nerveux intestin-cerveau-tissus périphériques impliquant le SNS. Néanmoins, afin de déterminer son implication, nous étudierons les effets de la NGI induite par un régime riche en fibres sur le métabolisme du foie et du tissu adipeux chez des souris présentant une ablation périphérique sélective du SNS (781). Une collaboration avec Ana Domingo (Université d'Oxford) a été initiée à cet effet. Par ailleurs, afin d'étudier plus précisément la contribution de la thermogenèse du tissu adipeux dans les améliorations métaboliques observées chez les souris I.G6pc^{overexp}, une dénervation chimique restreinte au TAB ou au TAE est envisagée (782,783).

D'autre part, alors que l'induction de la NGI exerce une action protectrice sur le développement de l'obésité, il serait intéressant d'étudier si cette fonction est également capable de corriger un état d'obésité et de diabète préinstallé. Pour répondre à cette question, nous avons développé un modèle murin de surexpression inductible de la G6Pase. Des études préliminaires suggèrent que l'induction de la NGI serait capable de corriger l'obésité et les défauts métaboliques induits préalablement par 3 mois de régime hypercalorique HF-HS.

Enfin, face à l'épidémie d'obésité, il est crucial de trouver des molécules capables de prévenir ou de traiter ces maladies métaboliques et de mieux comprendre leurs mécanismes d'action. Mes résultats montrent que l'augmentation de l'activité de la G6Pase spécifiquement dans l'intestin est suffisante pour produire les effets métaboliques bénéfiques de la NGI. Les recherches futures du laboratoire viseront à rechercher des métabolites d'origine alimentaire ou non, susceptibles d'activer la NGI, soit en tant que substrat, soit en activant l'expression de ses gènes régulateurs, comme la G6Pase, ou encore en activant l'activité de cette enzyme. Ces investigations permettront d'élaborer de futures approches préventives et/ou thérapeutiques des désordres métaboliques, tels que l'obésité et de ses complications comme DT2 ou encore la stéatose hépatique

TRAVAUX PERSONNELS

PUBLICATIONS :

- Barataud, A., **Vily-Petit, J.**, Goncalves, D., Zitoun, C., Duchamp, A., Philippe, E., Gautier-Stein, A., and Mithieux, G. (2020). *Metabolic benefits of gastric bypass surgery in the mouse: The role of fecal losses*. Mol. Metab. 31, 14–23.
- **Vily-Petit J**, Soty-Roca M, Silva M, Raffin M, Gautier-Stein A, Rajas F, et al. *Intestinal gluconeogenesis prevents obesity-linked liver steatosis and non-alcoholic fatty liver disease*. Gut. 2020 Mar 23;
- Maud Soty, **Justine Vily-Petit**, Ashley Castellanos-Jankiewicz, Omar Guzman-Quevedo, Margaux Raffin, Samantha Clark, Marine Silva, Amandine Gautier-Stein, Daniela Cota and Gilles Mithieux. *Calcitonin gene-related peptide-induced phosphorylation of STAT3 in arcuate neurons is a link in the metabolic benefits of portal glucose*. Neuroendocrinology. 2020 Jun 9.
- **Justine Vily-Petit**, Maud Soty-Roca, Marine Silva, Clara Bron, Margaux Raffin, Rubén Nogueiras, Damien Roussel, Amandine Gautier-Stein, Fabienne Rajas, Gilles Mithieux. *Intestinal Gluconeogenesis Prevents Obesity-Linked deleterious changes in brown and white adipose tissues*. En preparation.

COMMUNICATIONS ORALES :

- **VILY PETIT J, SOTY M, RAJAS F, SILVA M, BRON C, RAFFIN M, MITHIEUX G.** La néoglucogenèse intestinale protège de l'altération du métabolisme du tissu adipeux induite par un régime hypercalorique. *Congrès de la SFD, reporté en septembre 2020, Bruxelles, Belgique*.
- **VILY PETIT J, SOTY M, GAUTIER-STEIN A, RAFFIN M, MITHIEUX G.** Intestinal gluconeogenesis exerts metabolic benefits by activating the leptin signaling pathway and CGRP neurons. *Congrès de la SNE, 2-4 Octobre 2019, Tours, France. Prix de communication oral*.
- **VILY PETIT J, SOTY M, RAJAS F, RAFFIN M, SILVA M, MITHIEUX G.** La néoglucogenèse intestinale corrige les troubles métaboliques induits par un régime hypercalorique. *Congrès de la SFD, 26-29 Mars 2019, Marseille, France*.
- **VILY J, SOTY M, RAFFIN M, MITHIEUX G.** Rôle de la néoglucogenèse intestinal dans la régulation du métabolisme du tissu adipeux. *Congrès de la SFE, 12-15 Septembre 2018, Nancy, France*.

- **VILY J, SOTY M, RAJAS F, RAFFIN M & MITHIEUX G.** La néoglucogenèse intestinale contrôle une communication humorale entre le tissu adipeux blanc et les cellules β -pancréatiques. *Congrès de la SFD, 20-23 Mars 2018, Nantes, France.*
- **VILY J, SOTY M, RAJAS F, RAFFIN M & MITHIEUX G.** Rôle de la néoglucogenèse intestinale dans la régulation du métabolisme du tissu adipeux. *Congrès de la SFD, 20-23 Mars 2018, Nantes, France.*
- **VILY J, SOTY M, RAJAS F, RAFFIN M, MITHIEUX G.** Protective role of intestinal gluconeogenesis in the development of obesity and hepatic steatosis, *Journée scientifique de la SFR Santé Lyon Est, 5 Décembre 2016, Lyon, France.*
- **VILY J, SOTY M, RAFFIN M, MITHIEUX G.** La néoglucogenèse intestinale contrôle une interaction humorale entre le tissu adipeux blanc et les cellules β -pancréatiques. *Congrès de la SFE, 11-14 Octobre 2017, Poitiers, France.*
- **SOTY M, VILY J, RAFFIN M, MITHIEUX G.** Effet protecteur de la néoglucogenèse intestinale sur le développement de l'obésité et du diabète. *Congrès de la SFE, 5-8 Octobre 2016, Bordeaux, France.*

MEMBRE DE SOCIETES SAVANTES :

Membre de la Société Française d'Endocrinologie (SFE) depuis 2016.

Membre de la Société de Neuro-Endocrinologie (SNE) depuis 2019.

PARTICIPATION A L'ORGANISATION DE CONGRES :

Membre du comité d'organisation du congrès de la Société Francophone du Diabète (SFD), organisé en mars 2016 à Lyon, France.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Duvernoy HM, Risold P-Y. The circumventricular organs: an atlas of comparative anatomy and vascularization. *Brain Res Rev.* 2007 Nov;56(1):119–47.
2. Ganong WF. Circumventricular Organs: Definition And Role In The Regulation Of Endocrine And Autonomic Function. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2000;27(5–6):422–7.
3. Chen HY, Trumbauer ME, Chen AS, Weingarh DT, Adams JR, Frazier EG, et al. Orexigenic action of peripheral ghrelin is mediated by neuropeptide Y and agouti-related protein. *Endocrinology.* 2004 Jun;145(6):2607–12.
4. Mizuno TM, Mobbs CV. Hypothalamic agouti-related protein messenger ribonucleic acid is inhibited by leptin and stimulated by fasting. *Endocrinology.* 1999 Feb;140(2):814–7.
5. Schwartz MW, Seeley RJ, Woods SC, Weigle DS, Campfield LA, Burn P, et al. Leptin increases hypothalamic pro-opiomelanocortin mRNA expression in the rostral arcuate nucleus. *Diabetes.* 1997 Dec;46(12):2119–23.
6. Cone RD. Anatomy and regulation of the central melanocortin system. *Nat Neurosci.* 2005 May;8(5):571–8.
7. Morton GJ, Cummings DE, Baskin DG, Barsh GS, Schwartz MW. Central nervous system control of food intake and body weight. *Nature.* 2006 Sep 21;443(7109):289–95.
8. Saper CB, Chou TC, Elmquist JK. The need to feed: homeostatic and hedonic control of eating. *Neuron.* 2002 Oct 10;36(2):199–211.
9. Hahn TM, Breininger JF, Baskin DG, Schwartz MW. Coexpression of *Agrp* and *NPY* in fasting-activated hypothalamic neurons. *Nat Neurosci.* 1998 Aug;1(4):271–2.
10. Kristensen P, Judge ME, Thim L, Ribel U, Christjansen KN, Wulff BS, et al. Hypothalamic CART is a new anorectic peptide regulated by leptin. *Nature.* 1998 May 7;393(6680):72–6.
11. Suzuki K, Simpson KA, Minnion JS, Shillito JC, Bloom SR. The role of gut hormones and the hypothalamus in appetite regulation. *Endocr J.* 2010;57(5):359–72.
12. Williams G, Bing C, Cai XJ, Harrold JA, King PJ, Liu XH. The hypothalamus and the control of energy homeostasis: different circuits, different purposes. *Physiol Behav.* 2001 Dec;74(4–5):683–701.
13. Harrold JA, Dovey TM, Blundell JE, Halford JCG. CNS regulation of appetite. *Neuropharmacology.* 2012 Jul;63(1):3–17.
14. López M, Lage R, Saha AK, Pérez-Tilve D, Vázquez MJ, Varela L, et al. Hypothalamic fatty acid metabolism mediates the orexigenic action of ghrelin. *Cell Metab.* 2008 May;7(5):389–99.
15. Meguid MM, Fetissov SO, Varma M, Sato T, Zhang L, Laviano A, et al. Hypothalamic dopamine and serotonin in the regulation of food intake. *Nutr Burbank Los Angel Cty Calif.* 2000 Oct;16(10):843–57.
16. Englaro W, Rezzonico R, Durand-Clément M, Lallemand D, Ortonne JP, Ballotti R. Mitogen-activated protein kinase pathway and AP-1 are activated during cAMP-induced melanogenesis in B-16 melanoma cells. *J Biol Chem.* 1995 Oct 13;270(41):24315–20.
17. Mountjoy KG, Mortrud MT, Low MJ, Simerly RB, Cone RD. Localization of the melanocortin-4 receptor (MC4-R) in neuroendocrine and autonomic control circuits in the brain. *Mol Endocrinol Baltim Md.* 1994 Oct;8(10):1298–308.
18. Breit A, Wolff K, Kalwa H, Jarry H, Büch T, Gudermann T. The natural inverse agonist agouti-related protein induces arrestin-mediated endocytosis of melanocortin-3 and -4 receptors. *J Biol Chem.* 2006 Dec 8;281(49):37447–56.

19. Ollmann MM, Wilson BD, Yang YK, Kerns JA, Chen Y, Gantz I, et al. Antagonism of central melanocortin receptors in vitro and in vivo by agouti-related protein. *Science*. 1997 Oct 3;278(5335):135–8.
20. Bagnol D, Lu XY, Kaelin CB, Day HE, Ollmann M, Gantz I, et al. Anatomy of an endogenous antagonist: relationship between Agouti-related protein and proopiomelanocortin in brain. *J Neurosci Off J Soc Neurosci*. 1999 Sep 15;19(18):RC26.
21. Jégou S, Boutelet I, Vaudry H. Melanocortin-3 receptor mRNA expression in pro-opiomelanocortin neurones of the rat arcuate nucleus. *J Neuroendocrinol*. 2000 Jun;12(6):501–5.
22. Mounien L, Bizet P, Boutelet I, Vaudry H, Jégou S. Expression of melanocortin MC3 and MC4 receptor mRNAs by neuropeptide Y neurons in the rat arcuate nucleus. *Neuroendocrinology*. 2005;82(3–4):164–70.
23. Adam CL, Archer ZA, Findlay PA, Thomas L, Marie M. Hypothalamic gene expression in sheep for cocaine- and amphetamine-regulated transcript, pro-opiomelanocortin, neuropeptide Y, agouti-related peptide and leptin receptor and responses to negative energy balance. *Neuroendocrinology*. 2002 Apr;75(4):250–6.
24. Aja S, Sahandy S, Ladenheim EE, Schwartz GJ, Moran TH. Intracerebroventricular CART peptide reduces food intake and alters motor behavior at a hindbrain site. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2001 Dec;281(6):R1862-1867.
25. Chronwall BM. Anatomy and physiology of the neuroendocrine arcuate nucleus. *Peptides*. 1985;6 Suppl 2:1–11.
26. Zhang M, Han L, Xu Y. Roles of cocaine- and amphetamine-regulated transcript in the central nervous system. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2012 Jun;39(6):586–92.
27. Lakatos A, Prinster S, Vicentic A, Hall RA, Kuhar MJ. Cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) peptide activates the extracellular signal-regulated kinase (ERK) pathway in AtT20 cells via putative G-protein coupled receptors. *Neurosci Lett*. 2005 Aug 12;384(1–2):198–202.
28. Lau J, Herzog H. CART in the regulation of appetite and energy homeostasis. *Front Neurosci*. 2014 Oct 13;8.
29. Sen A, Bettgowda A, Jimenez-Krassel F, Ireland JJ, Smith GW. Cocaine- and amphetamine-regulated transcript regulation of follicle-stimulating hormone signal transduction in bovine granulosa cells. *Endocrinology*. 2007 Sep;148(9):4400–10.
30. Yermolaieva O, Chen J, Couceyro PR, Hoshi T. Cocaine- and amphetamine-regulated transcript peptide modulation of voltage-gated Ca²⁺ signaling in hippocampal neurons. *J Neurosci Off J Soc Neurosci*. 2001 Oct 1;21(19):7474–80.
31. Kong WM, Stanley S, Gardiner J, Abbott C, Murphy K, Seth A, et al. A role for arcuate cocaine and amphetamine-regulated transcript in hyperphagia, thermogenesis, and cold adaptation. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol*. 2003 Sep;17(12):1688–90.
32. Lau J, Farzi A, Qi Y, Heilbronn R, Mietzsch M, Shi Y-C, et al. CART neurons in the arcuate nucleus and lateral hypothalamic area exert differential controls on energy homeostasis. *Mol Metab*. 2017 Nov 8;7:102–18.
33. Wang C, Billington CJ, Levine AS, Kotz CM. Effect of CART in the hypothalamic paraventricular nucleus on feeding and uncoupling protein gene expression. *Neuroreport*. 2000 Sep 28;11(14):3251–5.
34. Elmquist JK, Elias CF, Saper CB. From lesions to leptin: hypothalamic control of food intake and body weight. *Neuron*. 1999 Feb;22(2):221–32.

35. Stanley BG, Thomas WJ. Feeding responses to perifornical hypothalamic injection of neuropeptide Y in relation to circadian rhythms of eating behavior. *Peptides*. 1993 Jun;14(3):475–81.
36. Cowley MA, Smart JL, Rubinstein M, Cerdán MG, Diano S, Horvath TL, et al. Leptin activates anorexigenic POMC neurons through a neural network in the arcuate nucleus. *Nature*. 2001 May 24;411(6836):480–4.
37. Broberger C, Johansen J, Johansson C, Schalling M, Hökfelt T. The neuropeptide Y/agouti gene-related protein (AGRP) brain circuitry in normal, anorectic, and monosodium glutamate-treated mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 Dec 8;95(25):15043–8.
38. Duhault J, Boulanger M, Chamorro S, Boutin JA, Della Zuana O, Douillet E, et al. Food intake regulation in rodents: Y5 or Y1 NPY receptors or both? *Can J Physiol Pharmacol*. 2000 Feb;78(2):173–85.
39. Hentges ST, Nishiyama M, Overstreet LS, Stenzel-Poore M, Williams JT, Low MJ. GABA release from proopiomelanocortin neurons. *J Neurosci Off J Soc Neurosci*. 2004 Feb 18;24(7):1578–83.
40. Horvath TL, Bechmann I, Naftolin F, Kalra SP, Leranath C. Heterogeneity in the neuropeptide Y-containing neurons of the rat arcuate nucleus: GABAergic and non-GABAergic subpopulations. *Brain Res*. 1997 May 9;756(1–2):283–6.
41. Kim ER, Wu Z, Sun H, Xu Y, Mangieri LR, Xu Y, et al. Hypothalamic Non-AgRP, Non-POMC GABAergic Neurons Are Required for Postweaning Feeding and NPY Hyperphagia. *J Neurosci*. 2015 Jul 22;35(29):10440–50.
42. Dicken MS, Tooker RE, Hentges ST. Regulation of GABA and Glutamate Release from Proopiomelanocortin Neuron Terminals in Intact Hypothalamic Networks. *J Neurosci*. 2012 Mar 21;32(12):4042–8.
43. Haskell-Luevano C, Chen P, Li C, Chang K, Smith MS, Cameron JL, et al. Characterization of the neuroanatomical distribution of agouti-related protein immunoreactivity in the rhesus monkey and the rat. *Endocrinology*. 1999 Mar;140(3):1408–15.
44. Jacobowitz DM, O'Donohue TL. alpha-Melanocyte stimulating hormone: immunohistochemical identification and mapping in neurons of rat brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1978 Dec;75(12):6300–4.
45. Jegou S, Blasquez C, Delbende C, Bunel DT, Vaudry H. Regulation of alpha-melanocyte-stimulating hormone release from hypothalamic neurons. *Ann N Y Acad Sci*. 1993 May 31;680:260–78.
46. Pu S, Jain MR, Horvath TL, Diano S, Kalra PS, Kalra SP. Interactions between neuropeptide Y and gamma-aminobutyric acid in stimulation of feeding: a morphological and pharmacological analysis. *Endocrinology*. 1999 Feb;140(2):933–40.
47. Watson SJ, Akil H, Richard CW, Barchas JD. Evidence for two separate opiate peptide neuronal systems. *Nature*. 1978 Sep 21;275(5677):226–8.
48. Wu Q, Palmiter RD. GABAergic signaling by AgRP neurons prevents anorexia via a melanocortin-independent mechanism. *Eur J Pharmacol*. 2011 Jun 11;660(1):21–7.
49. Andermann ML, Lowell BB. Towards a Wiring-Diagram Understanding of Appetite Control. *Neuron*. 2017 Aug 16;95(4):757–78.
50. Fenselau H, Campbell JN, Verstegen AMJ, Madara JC, Xu J, Shah BP, et al. A rapidly acting glutamatergic ARC→PVH satiety circuit postsynaptically regulated by α -MSH. *Nat Neurosci*. 2017;20(1):42–51.
51. Arborelius L, Owens MJ, Plotsky PM, Nemeroff CB. The role of corticotropin-releasing factor in depression and anxiety disorders. *J Endocrinol*. 1999 Jan;160(1):1–12.
52. Heinrichs SC, Richard D. The role of corticotropin-releasing factor and urocortin in the modulation of ingestive behavior. *Neuropeptides*. 1999 Oct;33(5):350–9.

53. Licinio J, Wong ML, Gold PW. The hypothalamic-pituitary-adrenal axis in anorexia nervosa. *Psychiatry Res.* 1996 Apr 16;62(1):75–83.
54. Lu X-Y, Barsh GS, Akil H, Watson SJ. Interaction between alpha-melanocyte-stimulating hormone and corticotropin-releasing hormone in the regulation of feeding and hypothalamo-pituitary-adrenal responses. *J Neurosci Off J Soc Neurosci.* 2003 Aug 27;23(21):7863–72.
55. Richard D, Lin Q, Timofeeva E. The corticotropin-releasing factor family of peptides and CRF receptors: their roles in the regulation of energy balance. *Eur J Pharmacol.* 2002 Apr 12;440(2–3):189–97.
56. Rivest S, Deshaies Y, Richard D. Effects of corticotropin-releasing factor on energy balance in rats are sex dependent. *Am J Physiol.* 1989 Dec;257(6 Pt 2):R1417-1422.
57. Campbell RE, Grove KL, Smith MS. Distribution of corticotropin releasing hormone receptor immunoreactivity in the rat hypothalamus: coexpression in neuropeptide Y and dopamine neurons in the arcuate nucleus. *Brain Res.* 2003 May 30;973(2):223–32.
58. Davidowa H, Plagemann A. Hypothalamic neurons of postnatally overfed, overweight rats respond differentially to corticotropin-releasing hormones. *Neurosci Lett.* 2004 Nov 16;371(1):64–8.
59. Steckler T, Holsboer F. Corticotropin-releasing hormone receptor subtypes and emotion. *Biol Psychiatry.* 1999 Dec 1;46(11):1480–508.
60. Rivier C, Brownstein M, Spiess J, Rivier J, Vale W. In vivo corticotropin-releasing factor-induced secretion of adrenocorticotropin, beta-endorphin, and corticosterone. *Endocrinology.* 1982 Jan;110(1):272–8.
61. Amin A, Dhillon WS, Murphy KG. The Central Effects of Thyroid Hormones on Appetite. *J Thyroid Res.* 2011 May 25;2011:e306510.
62. Yarbrough GG. Studies on the neuropharmacology of thyrotropin releasing hormone (TRH) and a new TRH analog. *Eur J Pharmacol.* 1978 Mar 1;48(1):19–27.
63. Fekete C, Marks DL, Sarkar S, Emerson CH, Rand WM, Cone RD, et al. Effect of Agouti-related protein in regulation of the hypothalamic-pituitary-thyroid axis in the melanocortin 4 receptor knockout mouse. *Endocrinology.* 2004 Nov;145(11):4816–21.
64. Kim MS, Small CJ, Stanley SA, Morgan DG, Seal LJ, Kong WM, et al. The central melanocortin system affects the hypothalamo-pituitary thyroid axis and may mediate the effect of leptin. *J Clin Invest.* 2000 Apr;105(7):1005–11.
65. Flier JS, Maratos-Flier E. Obesity and the hypothalamus: novel peptides for new pathways. *Cell.* 1998 Feb 20;92(4):437–40.
66. Mantzoros CS. Leptin and the hypothalamus: neuroendocrine regulation of food intake. *Mol Psychiatry.* 1999 Jan;4(1):8–12, 6–7.
67. Nillni EA, Vaslet C, Harris M, Hollenberg A, Bjørbak C, Flier JS. Leptin regulates prothyrotropin-releasing hormone biosynthesis. Evidence for direct and indirect pathways. *J Biol Chem.* 2000 Nov 17;275(46):36124–33.
68. Gotoh K, Fukagawa K, Fukagawa T, Noguchi H, Kakuma T, Sakata T, et al. Hypothalamic neuronal histamine mediates the thyrotropin-releasing hormone-induced suppression of food intake. *J Neurochem.* 2007 Nov;103(3):1102–10.
69. Sakata T, Yoshimatsu H, Kurokawa M. Hypothalamic neuronal histamine: implications of its homeostatic control of energy metabolism. *Nutr Burbank Los Angel Cty Calif.* 1997 May;13(5):403–11.
70. Simpson KA, Martin NM, Bloom SR. Hypothalamic regulation of food intake and clinical therapeutic applications. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2009 Mar;53(2):120–8.

71. Kim KW, Sohn J-W, Kohno D, Xu Y, Williams K, Elmquist JK. SF-1 in the ventral medial hypothalamic nucleus: a key regulator of homeostasis. *Mol Cell Endocrinol*. 2011 Apr 10;336(1–2):219–23.
72. Morris DL, Rui L. Recent advances in understanding leptin signaling and leptin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2009 Dec;297(6):E1247-1259.
73. Park H-K, Ahima RS. Leptin signaling. *F1000Prime Rep*. 2014 Sep 4;6.
74. Ban T. Fiber connections in the hypothalamus and some autonomic functions. *Pharmacol Biochem Behav*. 1975;3(1 Suppl):3–13.
75. Lim K, Barzel B, Burke SL, Armitage JA, Head GA. Origin of Aberrant Blood Pressure and Sympathetic Regulation in Diet-Induced Obesity. *Hypertens Dallas Tex* 1979. 2016;68(2):491–500.
76. Young JB, Landsberg L. Impaired Suppression of Sympathetic Activity during Fasting in the Gold Thioglucose-treated Mouse. *J Clin Invest*. 1980 May;65(5):1086–94.
77. Chao P-T, Yang L, Aja S, Moran TH, Bi S. Knockdown of NPY expression in the dorsomedial hypothalamus promotes development of brown adipocytes and prevents diet-induced obesity. *Cell Metab*. 2011 May 4;13(5):573–83.
78. Chou TC, Scammell TE, Gooley JJ, Gaus SE, Saper CB, Lu J. Critical role of dorsomedial hypothalamic nucleus in a wide range of behavioral circadian rhythms. *J Neurosci Off J Soc Neurosci*. 2003 Nov 19;23(33):10691–702.
79. Dodd GT, Worth AA, Nunn N, Korpak AK, Bechtold DA, Allison MB, et al. The thermogenic effect of leptin is dependent on a distinct population of prolactin-releasing peptide neurons in the dorsomedial hypothalamus. *Cell Metab*. 2014 Oct 7;20(4):639–49.
80. Groessl F, Jeong JH, Talmage DA, Role LW, Jo Y-H. Overnight fasting regulates inhibitory tone to cholinergic neurons of the dorsomedial nucleus of the hypothalamus. *PLoS One*. 2013;8(4):e60828.
81. Jeong JH, Lee DK, Blouet C, Ruiz HH, Buettner C, Chua S, et al. Cholinergic neurons in the dorsomedial hypothalamus regulate mouse brown adipose tissue metabolism. *Mol Metab*. 2015 Jun;4(6):483–92.
82. Jeong JH, Lee DK, Jo Y-H. Cholinergic neurons in the dorsomedial hypothalamus regulate food intake. *Mol Metab*. 2017 Jan 12;6(3):306–12.
83. Rezai-Zadeh K, Yu S, Jiang Y, Laque A, Schwartzenburg C, Morrison CD, et al. Leptin receptor neurons in the dorsomedial hypothalamus are key regulators of energy expenditure and body weight, but not food intake. *Mol Metab*. 2014 Oct;3(7):681–93.
84. Stuber GD, Wise RA. Lateral Hypothalamic Circuits for Feeding and Reward. *Nat Neurosci*. 2016 Feb;19(2):198–205.
85. Betley JN, Cao ZFH, Ritola KD, Sternson SM. Parallel, redundant circuit organization for homeostatic control of feeding behavior. *Cell*. 2013 Dec 5;155(6):1337–50.
86. Broberger C, De Lecea L, Sutcliffe JG, Hökfelt T. Hypocretin/orexin- and melanin-concentrating hormone-expressing cells form distinct populations in the rodent lateral hypothalamus: relationship to the neuropeptide Y and agouti gene-related protein systems. *J Comp Neurol*. 1998 Dec 28;402(4):460–74.
87. Canteras NS, Simerly RB, Swanson LW. Organization of projections from the ventromedial nucleus of the hypothalamus: a Phaseolus vulgaris-leucoagglutinin study in the rat. *J Comp Neurol*. 1994 Oct 1;348(1):41–79.
88. Heimer L, Zahm DS, Churchill L, Kalivas PW, Wohltmann C. Specificity in the projection patterns of accumbal core and shell in the rat. *Neuroscience*. 1991;41(1):89–125.

89. Nauta WJ. Hippocampal projections and related neural pathways to the midbrain in the cat. *Brain J Neurol.* 1958 Sep;81(3):319–40.
90. Wu Z, Kim ER, Sun H, Xu Y, Mangieri LR, Li D-P, et al. GABAergic Projections from Lateral Hypothalamus to Paraventricular Hypothalamic Nucleus Promote Feeding. *J Neurosci.* 2015 Feb 25;35(8):3312–8.
91. Diniz GB, Bittencourt JC. The Melanin-Concentrating Hormone as an Integrative Peptide Driving Motivated Behaviors. *Front Syst Neurosci.* 2017 [cited 2019 Dec 4];11.
92. Flier JS. Obesity wars: molecular progress confronts an expanding epidemic. *Cell.* 2004 Jan 23;116(2):337–50.
93. Routh VH. Glucose-sensing neurons: are they physiologically relevant? *Physiol Behav.* 2002 Jul;76(3):403–13.
94. Schwartz MW, Woods SC, Porte D, Seeley RJ, Baskin DG. Central nervous system control of food intake. *Nature.* 2000 Apr 6;404(6778):661–71.
95. Rodgers RJ, Halford JC, Nunes de Souza RL, Canto de Souza AL, Piper DC, Arch JR, et al. Dose-response effects of orexin-A on food intake and the behavioural satiety sequence in rats. *Regul Pept.* 2000 Dec 22;96(1–2):71–84.
96. Mahler SV, Moorman DE, Smith RJ, James MH, Aston-Jones G. Motivational activation: a unifying hypothesis of orexin/hypocretin function. *Nat Neurosci.* 2014 Oct;17(10):1298–303.
97. Scammell TE, Winrow CJ. Orexin Receptors: Pharmacology and Therapeutic Opportunities. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2011 Feb 10;51:243–66.
98. Jennings JH, Ung RL, Resendez SL, Stamatakis AM, Taylor JG, Huang J, et al. Visualizing hypothalamic network dynamics for appetitive and consummatory behaviors. *Cell.* 2015 Jan 29;160(3):516–27.
99. Nieh EH, Matthews GA, Allsop SA, Presbrey KN, Leppla CA, Wichmann R, et al. Decoding neural circuits that control compulsive sucrose seeking. *Cell.* 2015 Jan 29;160(3):528–41.
100. Laque A, Yu S, Qualls-Creekmore E, Gettys S, Schwartzburg C, Bui K, et al. Leptin modulates nutrient reward via inhibitory galanin action on orexin neurons. *Mol Metab.* 2015 Oct;4(10):706–17.
101. Melander T, Hökfelt T, Rökaeus A, Cuello AC, Oertel WH, Verhofstad A, et al. Coexistence of galanin-like immunoreactivity with catecholamines, 5-hydroxytryptamine, GABA and neuropeptides in the rat CNS. *J Neurosci Off J Soc Neurosci.* 1986 Dec;6(12):3640–54.
102. Qualls-Creekmore E, Yu S, Francois M, Hoang J, Huesing C, Bruce-Keller A, et al. Galanin-Expressing GABA Neurons in the Lateral Hypothalamus Modulate Food Reward and Noncompulsive Locomotion. *J Neurosci.* 2017 Jun 21;37(25):6053–65.
103. Sherin JE, Elmquist JK, Torrealba F, Saper CB. Innervation of histaminergic tuberomammillary neurons by GABAergic and galaninergic neurons in the ventrolateral preoptic nucleus of the rat. *J Neurosci Off J Soc Neurosci.* 1998 Jun 15;18(12):4705–21.
104. Kim ER, Leckstrom A, Mizuno TM. Impaired anorectic effect of leptin in neurotensin receptor 1-deficient mice. *Behav Brain Res.* 2008 Dec 1;194(1):66–71.
105. Remaury A, Vita N, Gendreau S, Jung M, Arnone M, Poncelet M, et al. Targeted inactivation of the neurotensin type 1 receptor reveals its role in body temperature control and feeding behavior but not in analgesia. *Brain Res.* 2002 Oct 25;953(1–2):63–72.
106. Schroeder LE, Leininger GM. Role of central neurotensin in regulating feeding: Implications for the development and treatment of body weight disorders. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Basis Dis.* 2018 Mar 1;1864(3):900–16.

107. Berthoud H-R, Münzberg H. The lateral hypothalamus as integrator of metabolic and environmental needs: from electrical self-stimulation to opto-genetics. *Physiol Behav.* 2011 Jul 25;104(1):29–39.
108. Laque A, Zhang Y, Gettys S, Nguyen T-A, Bui K, Morrison CD, et al. Leptin receptor neurons in the mouse hypothalamus are colocalized with the neuropeptide galanin and mediate anorexigenic leptin action. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2013 May 1;304(9):E999-1011.
109. Niu J-G, Yokota S, Tsumori T, Qin Y, Yasui Y. Glutamatergic lateral parabrachial neurons innervate orexin-containing hypothalamic neurons in the rat. *Brain Res.* 2010 Oct 28;1358:110–22.
110. Yoshida K, McCormack S, España RA, Crocker A, Scammell TE. Afferents to the orexin neurons of the rat brain. *J Comp Neurol.* 2006 Feb 10;494(5):845–61.
111. Cutler DJ, Morris R, Sheridhar V, Wattam TA, Holmes S, Patel S, et al. Differential distribution of orexin-A and orexin-B immunoreactivity in the rat brain and spinal cord. *Peptides.* 1999 Dec;20(12):1455–70.
112. Moga MM, Herbert H, Hurley KM, Yasui Y, Gray TS, Saper CB. Organization of cortical, basal forebrain, and hypothalamic afferents to the parabrachial nucleus in the rat. *J Comp Neurol.* 1990 May 22;295(4):624–61.
113. Peyron C, Tighe DK, van den Pol AN, de Lecea L, Heller HC, Sutcliffe JG, et al. Neurons containing hypocretin (orexin) project to multiple neuronal systems. *J Neurosci Off J Soc Neurosci.* 1998 Dec 1;18(23):9996–10015.
114. Touzani K, Tramu G, Nahon JL, Velley L. Hypothalamic melanin-concentrating hormone and alpha-neoendorphin-immunoreactive neurons project to the medial part of the rat parabrachial area. *Neuroscience.* 1993 Apr;53(3):865–76.
115. Tokita K, Armstrong WE, St. John SJ, Boughter Jr. JD. Activation of lateral hypothalamus-projecting parabrachial neurons by intraorally delivered gustatory stimuli. *Front Neural Circuits.* 2014 Jul 29;8.
116. Fan W, Ellacott KLJ, Halatchev IG, Takahashi K, Yu P, Cone RD. Cholecystokinin-mediated suppression of feeding involves the brainstem melanocortin system. *Nat Neurosci.* 2004 Apr;7(4):335–6.
117. Grill HJ, Hayes MR. The nucleus tractus solitarius: a portal for visceral afferent signal processing, energy status assessment and integration of their combined effects on food intake. *Int J Obes* 2005. 2009 Apr;33 Suppl 1:S11-15.
118. Zhan C, Zhou J, Feng Q, Zhang J-E, Lin S, Bao J, et al. Acute and long-term suppression of feeding behavior by POMC neurons in the brainstem and hypothalamus, respectively. *J Neurosci Off J Soc Neurosci.* 2013 Feb 20;33(8):3624–32.
119. Thorens B, Larsen PJ. Gut-derived signaling molecules and vagal afferents in the control of glucose and energy homeostasis. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2004 Jul;7(4):471–8.
120. Woods SC. Gastrointestinal satiety signals I. An overview of gastrointestinal signals that influence food intake. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2004 Jan;286(1):G7-13.
121. Azzara AV, Sokolnicki JP, Schwartz GJ. Central melanocortin receptor agonist reduces spontaneous and scheduled meal size but does not augment duodenal preload-induced feeding inhibition. *Physiol Behav.* 2002 Nov;77(2–3):411–6.
122. Skofitsch G, Insel TR, Jacobowitz DM. Binding sites for corticotropin releasing factor in sensory areas of the rat hindbrain and spinal cord. *Brain Res Bull.* 1985 Nov;15(5):519–22.
123. Williams DL, Grill HJ, Weiss SM, Baird J-P, Kaplan JM. Behavioral processes underlying the intake suppressive effects of melanocortin 3/4 receptor activation in the rat. *Psychopharmacology (Berl).* 2002 Apr;161(1):47–53.

124. Blouet C, Schwartz GJ. Brainstem nutrient sensing in the nucleus of the solitary tract inhibits feeding. *Cell Metab.* 2012 Nov 7;16(5):579–87.
125. Faulconbridge LF, Cummings DE, Kaplan JM, Grill HJ. Hyperphagic effects of brainstem ghrelin administration. *Diabetes.* 2003 Sep;52(9):2260–5.
126. Hayes MR, Bradley L, Grill HJ. Endogenous hindbrain glucagon-like peptide-1 receptor activation contributes to the control of food intake by mediating gastric satiation signaling. *Endocrinology.* 2009 Jun;150(6):2654–9.
127. Hayes MR, Skibicka KP, Lechner TM, Guarnieri DJ, DiLeone RJ, Bence KK, et al. Endogenous leptin signaling in the caudal nucleus tractus solitarius and area postrema is required for energy balance regulation. *Cell Metab.* 2010 Jan;11(1):77–83.
128. Hommel JD, Trinko R, Sears RM, Georgescu D, Liu Z-W, Gao X-B, et al. Leptin receptor signaling in midbrain dopamine neurons regulates feeding. *Neuron.* 2006 Sep 21;51(6):801–10.
129. Huo L, Maeng L, Bjørbaek C, Grill HJ. Leptin and the control of food intake: neurons in the nucleus of the solitary tract are activated by both gastric distension and leptin. *Endocrinology.* 2007 May;148(5):2189–97.
130. Scott MM, Williams KW, Rossi J, Lee CE, Elmquist JK. Leptin receptor expression in hindbrain Glp-1 neurons regulates food intake and energy balance in mice. *J Clin Invest.* 2011 Jun;121(6):2413–21.
131. Shimizu I, Hirota M, Ohboshi C, Shima K. Identification and localization of glucagon-like peptide-1 and its receptor in rat brain. *Endocrinology.* 1987 Sep;121(3):1076–82.
132. Alhadeff AL, Rupprecht LE, Hayes MR. GLP-1 Neurons in the Nucleus of the Solitary Tract Project Directly to the Ventral Tegmental Area and Nucleus Accumbens to Control for Food Intake. *Endocrinology.* 2012 Feb;153(2):647–58.
133. D’Agostino G, Lyons DJ, Cristiano C, Burke LK, Madara JC, Campbell JN, et al. Appetite controlled by a cholecystokinin nucleus of the solitary tract to hypothalamus neurocircuit. Takahashi JS, editor. *eLife.* 2016 Mar 14;5:e12225.
134. Herbert H, Moga MM, Saper CB. Connections of the parabrachial nucleus with the nucleus of the solitary tract and the medullary reticular formation in the rat. *J Comp Neurol.* 1990 Mar 22;293(4):540–80.
135. Rinaman L. Ascending projections from the caudal visceral nucleus of the solitary tract to brain regions involved in food intake and energy expenditure. *Brain Res.* 2010 Sep 2;1350:18–34.
136. Everitt BJ, Hökfelt T, Terenius L, Tatemoto K, Mutt V, Goldstein M. Differential co-existence of neuropeptide Y (NPY)-like immunoreactivity with catecholamines in the central nervous system of the rat. *Neuroscience.* 1984 Feb;11(2):443–62.
137. Joseph SA, Pilcher WH, Bennett-Clarke C. Immunocytochemical localization of ACTH perikarya in nucleus tractus solitarius: evidence for a second opiocortin neuronal system. *Neurosci Lett.* 1983 Aug 8;38(3):221–5.
138. Dossat AM, Lilly N, Kay K, Williams DL. Glucagon-like peptide 1 receptors in nucleus accumbens affect food intake. *J Neurosci Off J Soc Neurosci.* 2011 Oct 12;31(41):14453–7.
139. Gaykema RP, Newmyer BA, Ottolini M, Raje V, Warthen DM, Lambeth PS, et al. Activation of murine pre-proglucagon-producing neurons reduces food intake and body weight. *J Clin Invest.* 2017 Mar 1;127(3):1031–45.
140. Liu J, Conde K, Zhang P, Lilascharoen V, Xu Z, Lim BK, et al. Enhanced AMPA Receptor Trafficking Mediates the Anorexigenic Effect of Endogenous Glucagon-like Peptide-1 in the Paraventricular Hypothalamus. *Neuron.* 2017 Nov 15;96(4):897-909.e5.

141. Luckman SM. Fos-like immunoreactivity in the brainstem of the rat following peripheral administration of cholecystokinin. *J Neuroendocrinol.* 1992 Apr;4(2):149–52.
142. Rinaman L. A functional role for central glucagon-like peptide-1 receptors in lithium chloride-induced anorexia. *Am J Physiol.* 1999;277(5):R1537-1540.
143. Shi X, Chacko S, Li F, Li D, Burrin D, Chan L, et al. Acute activation of GLP-1-expressing neurons promotes glucose homeostasis and insulin sensitivity. *Mol Metab.* 2017;6(11):1350–9.
144. Holt MK, Richards JE, Cook DR, Brierley DI, Williams DL, Reimann F, et al. Preproglucagon Neurons in the Nucleus of the Solitary Tract Are the Main Source of Brain GLP-1, Mediate Stress-Induced Hypophagia, and Limit Unusually Large Intakes of Food. *Diabetes.* 2019 Jan 1;68(1):21–33.
145. Cheung CC, Clifton DK, Steiner RA. Proopiomelanocortin neurons are direct targets for leptin in the hypothalamus. *Endocrinology.* 1997 Oct;138(10):4489–92.
146. Elias CF, Aschkenasi C, Lee C, Kelly J, Ahima RS, Bjorbaek C, et al. Leptin differentially regulates NPY and POMC neurons projecting to the lateral hypothalamic area. *Neuron.* 1999 Aug;23(4):775–86.
147. Fan W, Boston BA, Kesterson RA, Hruby VJ, Cone RD. Role of melanocortineric neurons in feeding and the agouti obesity syndrome. *Nature.* 1997 Jan 9;385(6612):165–8.
148. Appleyard SM, Bailey TW, Doyle MW, Jin Y-H, Smart JL, Low MJ, et al. Proopiomelanocortin neurons in nucleus tractus solitarius are activated by visceral afferents: regulation by cholecystokinin and opioids. *J Neurosci Off J Soc Neurosci.* 2005 Apr 6;25(14):3578–85.
149. Wang L, Martínez V, Barrachina MD, Taché Y. Fos expression in the brain induced by peripheral injection of CCK or leptin plus CCK in fasted lean mice. *Brain Res.* 1998 Apr 27;791(1–2):157–66.
150. Palmiter RD. The Parabrachial Nucleus: CGRP Neurons Function as a General Alarm. *Trends Neurosci.* 2018;41(5):280–93.
151. Zséli G, Vida B, Martinez A, Lechan RM, Khan AM, Fekete C. Elucidation of the anatomy of a satiety network: Focus on connectivity of the parabrachial nucleus in the adult rat. *J Comp Neurol.* 2016 01;524(14):2803–27.
152. Herbert H, Saper CB. Cholecystokinin-, galanin-, and corticotropin-releasing factor-like immunoreactive projections from the nucleus of the solitary tract to the parabrachial nucleus in the rat. *J Comp Neurol.* 1990 Mar 22;293(4):581–98.
153. McLatchie LM, Fraser NJ, Main MJ, Wise A, Brown J, Thompson N, et al. RAMPs regulate the transport and ligand specificity of the calcitonin-receptor-like receptor. *Nature.* 1998 May 28;393(6683):333–9.
154. Poyner DR, Sexton PM, Marshall I, Smith DM, Quirion R, Born W, et al. International Union of Pharmacology. XXXII. The mammalian calcitonin gene-related peptides, adrenomedullin, amylin, and calcitonin receptors. *Pharmacol Rev.* 2002 Jun;54(2):233–46.
155. Rosenfeld MG, Mermod JJ, Amara SG, Swanson LW, Sawchenko PE, Rivier J, et al. Production of a novel neuropeptide encoded by the calcitonin gene via tissue-specific RNA processing. *Nature.* 1983 Jul 14;304(5922):129–35.
156. Carter ME, Soden ME, Zweifel LS, Palmiter RD. Genetic identification of a neural circuit that suppresses appetite. *Nature.* 2013 Nov 7;503(7474):111–4.
157. Essner RA, Smith AG, Jamnik AA, Ryba AR, Trutner ZD, Carter ME. AgRP Neurons Can Increase Food Intake during Conditions of Appetite Suppression and Inhibit Anorexigenic Parabrachial Neurons. *J Neurosci Off J Soc Neurosci.* 2017 06;37(36):8678–87.
158. Roman CW, Derkach VA, Palmiter RD. Genetically and functionally defined NTS to PBN brain circuits mediating anorexia. *Nat Commun.* 2016 15;7:11905.

159. Berthoud HR, Blackshaw LA, Brookes SJH, Grundy D. Neuroanatomy of extrinsic afferents supplying the gastrointestinal tract. *Neurogastroenterol Motil Off J Eur Gastrointest Motil Soc.* 2004 Apr;16 Suppl 1:28–33.
160. Campos CA, Bowen AJ, Schwartz MW, Palmiter RD. Parabrachial CGRP Neurons Control Meal Termination. *Cell Metab.* 2016 May 10;23(5):811–20.
161. Ritter RC. Gastrointestinal mechanisms of satiation for food. *Physiol Behav.* 2004 Apr;81(2):249–73.
162. Carter ME, Han S, Palmiter RD. Parabrachial Calcitonin Gene-Related Peptide Neurons Mediate Conditioned Taste Aversion. *J Neurosci.* 2015 Mar 18;35(11):4582–6.
163. Huang T, Yan J, Kang Y. Role of the central amygdaloid nucleus in shaping the discharge of gustatory neurons in the rat parabrachial nucleus. *Brain Res Bull.* 2003 Aug 30;61(4):443–52.
164. Kang Y, Yan J, Huang T. Microinjection of bicuculline into the central nucleus of the amygdala alters gustatory responses of the rat parabrachial nucleus. *Brain Res.* 2004 Nov 26;1028(1):39–47.
165. Li C-S, Cho YK, Smith DV. Modulation of parabrachial taste neurons by electrical and chemical stimulation of the lateral hypothalamus and amygdala. *J Neurophysiol.* 2005 Mar;93(3):1183–96.
166. Lundy RF, Norgren R. Pontine gustatory activity is altered by electrical stimulation in the central nucleus of the amygdala. *J Neurophysiol.* 2001 Feb;85(2):770–83.
167. Lundy RF, Norgren R. Activity in the hypothalamus, amygdala, and cortex generates bilateral and convergent modulation of pontine gustatory neurons. *J Neurophysiol.* 2004 Mar;91(3):1143–57.
168. Tokita K, Inoue T, Boughter JD. Afferent connections of the parabrachial nucleus in C57BL/6J mice. *Neuroscience.* 2009 Jun 30;161(2):475–88.
169. Saggi S, Lundy RF. Forebrain neurons that project to the gustatory parabrachial nucleus in rat lack glutamic acid decarboxylase. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2008 Jan;294(1):R52–57.
170. Kreisler AD, Davis EA, Rinaman L. Differential activation of chemically identified neurons in the caudal nucleus of the solitary tract in non-entrained rats after intake of satiating vs. non-satiating meals. *Physiol Behav.* 2014 Sep;136:47–54.
171. Rehfeld JF. The new biology of gastrointestinal hormones. *Physiol Rev.* 1998 Oct;78(4):1087–108.
172. Abdalla MMI. Central and peripheral control of food intake. *Endocr Regul.* 2017 Jan 1;51(1):52–70.
173. Bray GA, York DA. Studies on food intake of genetically obese rats. *Am J Physiol.* 1972 Jul;223(1):176–9.
174. Rehfeld JF. Clinical endocrinology and metabolism. Cholecystokinin. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2004 Dec;18(4):569–86.
175. Rehfeld JF, Sun G, Christensen T, Hillingsø JG. The predominant cholecystokinin in human plasma and intestine is cholecystokinin-33. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001 Jan;86(1):251–8.
176. Liddle RA, Goldfine ID, Rosen MS, Taplitz RA, Williams JA. Cholecystokinin bioactivity in human plasma. Molecular forms, responses to feeding, and relationship to gallbladder contraction. *J Clin Invest.* 1985 Apr;75(4):1144–52.
177. Yox DP, Brenner L, Ritter RC. CCK-receptor antagonists attenuate suppression of sham feeding by intestinal nutrients. *Am J Physiol.* 1992 Apr;262(4 Pt 2):R554–561.
178. Rehfeld JF, Bungaard JR, Friis-Hansen L, Goetze JP. On the tissue-specific processing of procholecystokinin in the brain and gut—a short review. *J Physiol Pharmacol Off J Pol Physiol Soc.* 2003 Dec;54 Suppl 4:73–9.

179. Sayegh AI. The role of cholecystokinin receptors in the short-term control of food intake. *Prog Mol Biol Transl Sci.* 2013;114:277–316.
180. Dockray GJ. Cholecystokinin. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.* 2012 Feb;19(1):8–12.
181. Richmond BK, DiBaise J, Ziessman H. Utilization of cholecystokinin cholescintigraphy in clinical practice. *J Am Coll Surg.* 2013 Aug;217(2):317–23.
182. Gibbs J, Young RC, Smith GP. Cholecystokinin decreases food intake in rats. *J Comp Physiol Psychol.* 1973 Sep;84(3):488–95.
183. Smith GP, Gibbs J. Satiating effect of cholecystokinin. *Ann N Y Acad Sci.* 1994 Mar 23;713:236–41.
184. Overduin J, Gibbs J, Cummings DE, Reeve JR. CCK-58 elicits both satiety and satiation in rats while CCK-8 elicits only satiation. *Peptides.* 2014 Apr;54:71–80.
185. Geary N. Endocrine controls of eating: CCK, leptin, and ghrelin. *Physiol Behav.* 2004 Jul;81(5):719–33.
186. Liddle RA. Regulation of cholecystokinin synthesis and secretion in rat intestine. *J Nutr.* 1994;124(8 Suppl):1308S-1314S.
187. Liddle RA. Cholecystokinin cells. *Annu Rev Physiol.* 1997;59:221–42.
188. Moran TH, Katz LF, Plata-Salaman CR, Schwartz GJ. Disordered food intake and obesity in rats lacking cholecystokinin A receptors. *Am J Physiol.* 1998;274(3):R618-625.
189. Moran TH, Robinson PH, Goldrich MS, McHugh PR. Two brain cholecystokinin receptors: implications for behavioral actions. *Brain Res.* 1986 Jan 1;362(1):175–9.
190. Hill DR, Campbell NJ, Shaw TM, Woodruff GN. Autoradiographic localization and biochemical characterization of peripheral type CCK receptors in rat CNS using highly selective nonpeptide CCK antagonists. *J Neurosci Off J Soc Neurosci.* 1987 Sep;7(9):2967–76.
191. MacLean DB. Abrogation of peripheral cholecystokinin-satiety in the capsaicin treated rat. *Regul Pept.* 1985 Aug;11(4):321–33.
192. Moran TH, Kinzig KP. Gastrointestinal satiety signals II. Cholecystokinin. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2004 Feb;286(2):G183-188.
193. Moran TH, Baldessarini AR, Salorio CF, Lowery T, Schwartz GJ. Vagal afferent and efferent contributions to the inhibition of food intake by cholecystokinin. *Am J Physiol.* 1997 Apr;272(4 Pt 2):R1245-1251.
194. Prinz P, Stengel A. Control of Food Intake by Gastrointestinal Peptides: Mechanisms of Action and Possible Modulation in the Treatment of Obesity. *J Neurogastroenterol Motil.* 2017 Apr 31;23(2):180–96.
195. South EH, Ritter RC. Capsaicin application to central or peripheral vagal fibers attenuates CCK satiety. *Peptides.* 1988 Jun;9(3):601–12.
196. Verbalis JG, Stricker EM, Robinson AG, Hoffman GE. Cholecystokinin activates C-fos expression in hypothalamic oxytocin and corticotropin-releasing hormone neurons. *J Neuroendocrinol.* 1991 Apr 1;3(2):205–13.
197. Drucker DJ. The biology of incretin hormones. *Cell Metab.* 2006 Mar;3(3):153–65.
198. Holst JJ. On the physiology of GIP and GLP-1. *Horm Metab Res Horm Stoffwechselforschung Horm Metab.* 2004 Dec;36(11–12):747–54.
199. Baggio LL, Drucker DJ. Glucagon-like peptide-1 receptors in the brain: controlling food intake and body weight. *J Clin Invest.* 2014 Oct 1;124(10):4223–6.

200. Little TJ, Pilichiewicz AN, Russo A, Phillips L, Jones KL, Nauck MA, et al. Effects of intravenous glucagon-like peptide-1 on gastric emptying and intragastric distribution in healthy subjects: relationships with postprandial glycemic and insulinemic responses. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006 May;91(5):1916–23.
201. Miller LJ, Sexton PM, Dong M, Harikumar KG. The class B G-protein-coupled GLP-1 receptor: an important target for the treatment of type-2 diabetes mellitus. *Int J Obes Suppl.* 2014 Jul;4(Suppl 1):S9–13.
202. Hoare SRJ. Mechanisms of peptide and nonpeptide ligand binding to Class B G-protein-coupled receptors. *Drug Discov Today.* 2005 Mar 15;10(6):417–27.
203. Secher A, Jelsing J, Baquero AF, Hecksher-Sørensen J, Cowley MA, Dalbøge LS, et al. The arcuate nucleus mediates GLP-1 receptor agonist liraglutide-dependent weight loss. *J Clin Invest.* 2014 Oct;124(10):4473–88.
204. Sisley S, Gutierrez-Aguilar R, Scott M, D'Alessio DA, Sandoval DA, Seeley RJ. Neuronal GLP1R mediates liraglutide's anorectic but not glucose-lowering effect. *J Clin Invest.* 2014 Jun;124(6):2456–63.
205. Hare KJ. Role of GLP-1 induced glucagon suppression in type 2 diabetes mellitus. *Dan Med Bull.* 2010 Sep;57(9):B4181.
206. Parker JA, McCullough KA, Field BCT, Minnion JS, Martin NM, Ghatei MA, et al. Glucagon and GLP-1 inhibit food intake and increase c-fos expression in similar appetite regulating centres in the brainstem and amygdala. *Int J Obes* 2005. 2013 Oct;37(10):1391–8.
207. Lin S, Boey D, Herzog H. NPY and Y receptors: lessons from transgenic and knockout models. *Neuropeptides.* 2004 Aug;38(4):189–200.
208. Batterham RL, Cohen MA, Ellis SM, Le Roux CW, Withers DJ, Frost GS, et al. Inhibition of food intake in obese subjects by peptide YY3-36. *N Engl J Med.* 2003 Sep 4;349(10):941–8.
209. Essah PA, Levy JR, Sistrun SN, Kelly SM, Nestler JE. Effect of macronutrient composition on postprandial peptide YY levels. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007 Oct;92(10):4052–5.
210. Vincent RP, le Roux CW. The satiety hormone peptide YY as a regulator of appetite. *J Clin Pathol.* 2008 May;61(5):548–52.
211. Wynne K, Stanley S, McGowan B, Bloom S. Appetite control. *J Endocrinol.* 2005 Feb;184(2):291–318.
212. Koda S, Date Y, Murakami N, Shimbara T, Hanada T, Toshinai K, et al. The role of the vagal nerve in peripheral PYY3-36-induced feeding reduction in rats. *Endocrinology.* 2005 May;146(5):2369–75.
213. Nonaka N, Shioda S, Niehoff ML, Banks WA. Characterization of blood-brain barrier permeability to PYY3-36 in the mouse. *J Pharmacol Exp Ther.* 2003 Sep;306(3):948–53.
214. De Silva A, Bloom SR. Gut Hormones and Appetite Control: A Focus on PYY and GLP-1 as Therapeutic Targets in Obesity. *Gut Liver.* 2012 Jan;6(1):10–20.
215. Batterham RL, Cowley MA, Small CJ, Herzog H, Cohen MA, Dakin CL, et al. Gut hormone PYY(3-36) physiologically inhibits food intake. *Nature.* 2002 Aug 8;418(6898):650–4.
216. Blevins JE, Chelikani PK, Haver AC, Reidelberger RD. PYY(3-36) induces Fos in the arcuate nucleus and in both catecholaminergic and non-catecholaminergic neurons in the nucleus tractus solitarius of rats. *Peptides.* 2008 Jan;29(1):112–9.
217. Abbott CR, Monteiro M, Small CJ, Sajedi A, Smith KL, Parkinson JRC, et al. The inhibitory effects of peripheral administration of peptide YY(3-36) and glucagon-like peptide-1 on food intake are attenuated by ablation of the vagal-brainstem-hypothalamic pathway. *Brain Res.* 2005 May 17;1044(1):127–31.

218. Boey D, Lin S, Enriquez RF, Lee NJ, Slack K, Couzens M, et al. PYY transgenic mice are protected against diet-induced and genetic obesity. *Neuropeptides*. 2008 Feb;42(1):19–30.
219. Talsania T, Anini Y, Siu S, Drucker DJ, Brubaker PL. Peripheral exendin-4 and peptide YY(3-36) synergistically reduce food intake through different mechanisms in mice. *Endocrinology*. 2005 Sep;146(9):3748–56.
220. Cowley MA, Smith RG, Diano S, Tschöp M, Pronchuk N, Grove KL, et al. The distribution and mechanism of action of ghrelin in the CNS demonstrates a novel hypothalamic circuit regulating energy homeostasis. *Neuron*. 2003 Feb 20;37(4):649–61.
221. Kojima M, Hosoda H, Date Y, Nakazato M, Matsuo H, Kangawa K. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature*. 1999 Dec 9;402(6762):656–60.
222. Tschöp M, Smiley DL, Heiman ML. Ghrelin induces adiposity in rodents. *Nature*. 2000 Oct 19;407(6806):908–13.
223. Frago LM, Chowen JA. Involvement of Astrocytes in Mediating the Central Effects of Ghrelin. *Int J Mol Sci*. 2017 Mar 2;18(3).
224. Gauna C, van de Zande B, van Kerkwijk A, Themmen APN, van der Lely AJ, Delhanty PJD. Unacylated ghrelin is not a functional antagonist but a full agonist of the type 1a growth hormone secretagogue receptor (GHS-R). *Mol Cell Endocrinol*. 2007 Aug 15;274(1–2):30–4.
225. Heppner KM, Piechowski CL, Müller A, Ottaway N, Sisley S, Smiley DL, et al. Both acyl and des-acyl ghrelin regulate adiposity and glucose metabolism via central nervous system ghrelin receptors. *Diabetes*. 2014 Jan;63(1):122–31.
226. Chow KBS, Sun J, Chu KM, Tai Cheung W, Cheng CHK, Wise H. The truncated ghrelin receptor polypeptide (GHS-R1b) is localized in the endoplasmic reticulum where it forms heterodimers with ghrelin receptors (GHS-R1a) to attenuate their cell surface expression. *Mol Cell Endocrinol*. 2012 Jan 2;348(1):247–54.
227. Navarro G, Aguinaga D, Angelats E, Medrano M, Moreno E, Mallol J, et al. A Significant Role of the Truncated Ghrelin Receptor GHS-R1b in Ghrelin-induced Signaling in Neurons. *J Biol Chem*. 2016 Jun 17;291(25):13048–62.
228. Date Y. Ghrelin and the vagus nerve. *Methods Enzymol*. 2012;514:261–9.
229. Gasco V, Beccuti G, Marotta F, Benso A, Granata R, Broglio F, et al. Endocrine and metabolic actions of ghrelin. *Endocr Dev*. 2010;17:86–95.
230. Howard AD, Feighner SD, Cully DF, Arena JP, Liberatore PA, Rosenblum CI, et al. A receptor in pituitary and hypothalamus that functions in growth hormone release. *Science*. 1996 Aug 16;273(5277):974–7.
231. Sun Y, Wang P, Zheng H, Smith RG. Ghrelin stimulation of growth hormone release and appetite is mediated through the growth hormone secretagogue receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Mar 30;101(13):4679–84.
232. Camandola S. Astrocytes, emerging stars of energy homeostasis. *Cell Stress*. 2018 Sep 29;2(10):246–52.
233. Fuente-Martín E, García-Cáceres C, Argente-Arizón P, Díaz F, Granado M, Freire-Regatillo A, et al. Ghrelin Regulates Glucose and Glutamate Transporters in Hypothalamic Astrocytes. *Sci Rep*. 2016 Mar 30;6:23673.
234. García-Cáceres C, Fuente-Martín E, Díaz F, Granado M, Argente-Arizón P, Frago LM, et al. The opposing effects of ghrelin on hypothalamic and systemic inflammatory processes are modulated by its acylation status and food intake in male rats. *Endocrinology*. 2014 Aug;155(8):2868–80.

235. Date Y, Murakami N, Toshinai K, Matsukura S, Nijjima A, Matsuo H, et al. The role of the gastric afferent vagal nerve in ghrelin-induced feeding and growth hormone secretion in rats. *Gastroenterology*. 2002 Oct;123(4):1120–8.
236. Kamegai J, Tamura H, Shimizu T, Ishii S, Sugihara H, Wakabayashi I. Chronic central infusion of ghrelin increases hypothalamic neuropeptide Y and Agouti-related protein mRNA levels and body weight in rats. *Diabetes*. 2001 Nov;50(11):2438–43.
237. Castañeda TR, Tong J, Datta R, Culler M, Tschöp MH. Ghrelin in the regulation of body weight and metabolism. *Front Neuroendocrinol*. 2010 Jan;31(1):44–60.
238. Strassburg S, Anker SD, Castaneda TR, Burget L, Perez-Tilve D, Pfluger PT, et al. Long-term effects of ghrelin and ghrelin receptor agonists on energy balance in rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2008 Jul;295(1):E78–84.
239. Theander-Carrillo C, Wiedmer P, Cettour-Rose P, Nogueiras R, Perez-Tilve D, Pfluger P, et al. Ghrelin action in the brain controls adipocyte metabolism. *J Clin Invest*. 2006 Jul;116(7):1983–93.
240. Wren AM, Seal LJ, Cohen MA, Brynes AE, Frost GS, Murphy KG, et al. Ghrelin enhances appetite and increases food intake in humans. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001 Dec;86(12):5992.
241. Egea PF, Stroud RM, Walter P. Targeting proteins to membranes: structure of the signal recognition particle. *Curr Opin Struct Biol*. 2005 Apr;15(2):213–20.
242. Huang XF, Arvan P. Intracellular transport of proinsulin in pancreatic beta-cells. Structural maturation probed by disulfide accessibility. *J Biol Chem*. 1995 Sep 1;270(35):20417–23.
243. Munro S, Pelham HR. A C-terminal signal prevents secretion of luminal ER proteins. *Cell*. 1987 Mar 13;48(5):899–907.
244. Patzelt C, Labrecque AD, Duguid JR, Carroll RJ, Keim PS, Heinrikson RL, et al. Detection and kinetic behavior of preproinsulin in pancreatic islets. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1978 Mar;75(3):1260–4.
245. Fu Z, Gilbert ER, Liu D. Regulation of Insulin Synthesis and Secretion and Pancreatic Beta-Cell Dysfunction in Diabetes. *Curr Diabetes Rev*. 2013 Jan 1;9(1):25–53.
246. Nishi M, Sanke T, Nagamatsu S, Bell GI, Steiner DF. Islet amyloid polypeptide. A new beta cell secretory product related to islet amyloid deposits. *J Biol Chem*. 1990 Mar 15;265(8):4173–6.
247. Thorens B. GLUT2 in pancreatic and extra-pancreatic gluco-detection (review). *Mol Membr Biol*. 2001 Dec;18(4):265–73.
248. Plum L, Belgardt BF, Brüning JC. Central insulin action in energy and glucose homeostasis. *J Clin Invest*. 2006 Jul;116(7):1761–6.
249. Saltiel AR, Kahn CR. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature*. 2001 Dec 13;414(6865):799–806.
250. Air EL, Strowski MZ, Benoit SC, Conarello SL, Salituro GM, Guan X-M, et al. Small molecule insulin mimetics reduce food intake and body weight and prevent development of obesity. *Nat Med*. 2002 Feb;8(2):179–83.
251. Brown LM, Clegg DJ, Benoit SC, Woods SC. Intraventricular insulin and leptin reduce food intake and body weight in C57BL/6J mice. *Physiol Behav*. 2006 Dec 30;89(5):687–91.
252. Hallschmid M, Benedict C, Schultes B, Fehm H-L, Born J, Kern W. Intranasal insulin reduces body fat in men but not in women. *Diabetes*. 2004 Nov;53(11):3024–9.
253. Woods SC, Lotter EC, McKay LD, Porte D. Chronic intracerebroventricular infusion of insulin reduces food intake and body weight of baboons. *Nature*. 1979 Nov 29;282(5738):503–5.

254. De Meyts P. The insulin receptor: a prototype for dimeric, allosteric membrane receptors? *Trends Biochem Sci.* 2008 Aug;33(8):376–84.
255. Wilden PA, Kahn CR, Siddle K, White MF. Insulin receptor kinase domain autophosphorylation regulates receptor enzymatic function. *J Biol Chem.* 1992 Aug 15;267(23):16660–8.
256. Brüning JC, Gautam D, Burks DJ, Gillette J, Schubert M, Orban PC, et al. Role of brain insulin receptor in control of body weight and reproduction. *Science.* 2000 Sep 22;289(5487):2122–5.
257. Havrankova J, Roth J, Brownstein M. Insulin receptors are widely distributed in the central nervous system of the rat. *Nature.* 1978 Apr 27;272(5656):827–9.
258. van Houten M, Posner BI, Kopriwa BM, Brawer JR. Insulin-binding sites in the rat brain: in vivo localization to the circumventricular organs by quantitative radioautography. *Endocrinology.* 1979 Sep;105(3):666–73.
259. Benoit SC, Air EL, Coolen LM, Strauss R, Jackman A, Clegg DJ, et al. The catabolic action of insulin in the brain is mediated by melanocortins. *J Neurosci Off J Soc Neurosci.* 2002 Oct 15;22(20):9048–52.
260. Schwartz MW, Sipols AJ, Marks JL, Sanacora G, White JD, Scheurink A, et al. Inhibition of hypothalamic neuropeptide Y gene expression by insulin. *Endocrinology.* 1992 Jun;130(6):3608–16.
261. Sipols AJ, Baskin DG, Schwartz MW. Effect of intracerebroventricular insulin infusion on diabetic hyperphagia and hypothalamic neuropeptide gene expression. *Diabetes.* 1995 Feb;44(2):147–51.
262. Könnner AC, Janoschek R, Plum L, Jordan SD, Rother E, Ma X, et al. Insulin action in AgRP-expressing neurons is required for suppression of hepatic glucose production. *Cell Metab.* 2007 Jun;5(6):438–49.
263. Loh K, Zhang L, Brandon A, Wang Q, Begg D, Qi Y, et al. Insulin controls food intake and energy balance via NPY neurons. *Mol Metab.* 2017 Jun 1;6(6):574–84.
264. Luquet S, Perez FA, Hnasko TS, Palmiter RD. NPY/AgRP neurons are essential for feeding in adult mice but can be ablated in neonates. *Science.* 2005 Oct 28;310(5748):683–5.
265. Campbell JN, Macosko EZ, Fenselau H, Pers TH, Lyubetskaya A, Tenen D, et al. A molecular census of arcuate hypothalamus and median eminence cell types. *Nat Neurosci.* 2017 Mar;20(3):484–96.
266. Areias MFC, Prada PO. Mechanisms of insulin resistance in the amygdala: influences on food intake. *Behav Brain Res.* 2015 Apr 1;282:209–17.
267. Castro G, C Areias MF, Weissmann L, Quaresma PGF, Katashima CK, Saad MJA, et al. Diet-induced obesity induces endoplasmic reticulum stress and insulin resistance in the amygdala of rats. *FEBS Open Bio.* 2013;3:443–9.
268. Friedman JM, Halaas JL. Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature.* 1998 Oct 22;395(6704):763–70.
269. Dalamaga M, Chou SH, Shields K, Papageorgiou P, Polyzos SA, Mantzoros CS. Leptin at the intersection of neuroendocrinology and metabolism: current evidence and therapeutic perspectives. *Cell Metab.* 2013 Jul 2;18(1):29–42.
270. Ahima RS, Osei SY. Leptin signaling. *Physiol Behav.* 2004 Apr;81(2):223–41.
271. Wada N, Hirako S, Takenoya F, Kageyama H, Okabe M, Shioda S. Leptin and its receptors. *J Chem Neuroanat.* 2014 Nov;61–62:191–9.
272. Korner J, Savontaus E, Chua SC, Leibel RL, Wardlaw SL. Leptin regulation of *Agrp* and *Npy* mRNA in the rat hypothalamus. *J Neuroendocrinol.* 2001 Nov;13(11):959–66.

273. Xu Y, Elmquist JK, Fukuda M. Central nervous control of energy and glucose balance: focus on the central melanocortin system. *Ann N Y Acad Sci.* 2011 Dec;1243:1–14.
274. Kelesidis T, Kelesidis I, Chou S, Mantzoros CS. Narrative review: the role of leptin in human physiology: emerging clinical applications. *Ann Intern Med.* 2010 Jan 19;152(2):93–100.
275. Bell GI, Kayano T, Buse JB, Burant CF, Takeda J, Lin D, et al. Molecular biology of mammalian glucose transporters. *Diabetes Care.* 1990 Mar;13(3):198–208.
276. Foley K, Boguslavsky S, Klip A. Endocytosis, recycling, and regulated exocytosis of glucose transporter 4. *Biochemistry.* 2011 Apr 19;50(15):3048–61.
277. Chang L, Chiang S-H, Saltiel AR. Insulin signaling and the regulation of glucose transport. *Mol Med Camb Mass.* 2004 Dec;10(7–12):65–71.
278. Sano H, Kane S, Sano E, Mîinea CP, Asara JM, Lane WS, et al. Insulin-stimulated phosphorylation of a Rab GTPase-activating protein regulates GLUT4 translocation. *J Biol Chem.* 2003 Apr 25;278(17):14599–602.
279. Soty M, Gautier-Stein A, Rajas F, Mithieux G. Gut-Brain Glucose Signaling in Energy Homeostasis. *Cell Metab.* 2017 Jun 6;25(6):1231–42.
280. Gluchowski NL, Becuwe M, Walther TC, Farese RV. Lipid droplets and liver disease: from basic biology to clinical implications. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2017 Jun;14(6):343–55.
281. Kim JB, Sarraf P, Wright M, Yao KM, Mueller E, Solanes G, et al. Nutritional and insulin regulation of fatty acid synthetase and leptin gene expression through ADD1/SREBP1. *J Clin Invest.* 1998 Jan 1;101(1):1–9.
282. Letexier D, Pinteur C, Large V, Fréring V, Beylot M. Comparison of the expression and activity of the lipogenic pathway in human and rat adipose tissue. *J Lipid Res.* 2003 Nov;44(11):2127–34.
283. Newgard CB, Brady MJ, O'Doherty RM, Saltiel AR. Organizing glucose disposal: emerging roles of the glycogen targeting subunits of protein phosphatase-1. *Diabetes.* 2000 Dec;49(12):1967–77.
284. Aiston S, Andersen B, Agius L. Glucose 6-phosphate regulates hepatic glycogenolysis through inactivation of phosphorylase. *Diabetes.* 2003 Jun;52(6):1333–9.
285. Kim KH. Regulation of mammalian acetyl-coenzyme A carboxylase. *Annu Rev Nutr.* 1997;17:77–99.
286. Abu-Elheiga L, Brinkley WR, Zhong L, Chirala SS, Woldegiorgis G, Wakil SJ. The subcellular localization of acetyl-CoA carboxylase 2. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000 Feb 15;97(4):1444–9.
287. Wakil SJ, Abu-Elheiga LA. Fatty acid metabolism: target for metabolic syndrome. *J Lipid Res.* 2009 Apr;50(Suppl):S138–43.
288. Guillou H, Zadavec D, Martin PGP, Jacobsson A. The key roles of elongases and desaturases in mammalian fatty acid metabolism: Insights from transgenic mice. *Prog Lipid Res.* 2010 Apr;49(2):186–99.
289. Miyazaki M, Flowers MT, Sampath H, Chu K, Otzelberger C, Liu X, et al. Hepatic stearyl-CoA desaturase-1 deficiency protects mice from carbohydrate-induced adiposity and hepatic steatosis. *Cell Metab.* 2007 Dec;6(6):484–96.
290. Cagen LM, Deng X, Wilcox HG, Park EA, Raghov R, Elam MB. Insulin activates the rat sterol-regulatory-element-binding protein 1c (SREBP-1c) promoter through the combinatorial actions of SREBP, LXR, Sp-1 and NF-Y cis-acting elements. *Biochem J.* 2005 Jan 1;385(Pt 1):207–16.
291. Fleischmann M, Iynedjian PB. Regulation of sterol regulatory-element binding protein 1 gene expression in liver: role of insulin and protein kinase B/cAkt. *Biochem J.* 2000 Jul 1;349(Pt 1):13–7.

292. Owen JL, Zhang Y, Bae S-H, Farooqi MS, Liang G, Hammer RE, et al. Insulin stimulation of SREBP-1c processing in transgenic rat hepatocytes requires p70 S6-kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012 Oct 2;109(40):16184–9.
293. Sun X, Haas ME, Miao J, Mehta A, Graham MJ, Crooke RM, et al. Insulin Dissociates the Effects of Liver X Receptor on Lipogenesis, Endoplasmic Reticulum Stress, and Inflammation. *J Biol Chem*. 2016 Jan 15;291(3):1115–22.
294. Vergnes L, Chin RG, de Aguiar Vallim T, Fong LG, Osborne TF, Young SG, et al. SREBP-2-deficient and hypomorphic mice reveal roles for SREBP-2 in embryonic development and SREBP-1c expression. *J Lipid Res*. 2016 Mar;57(3):410–21.
295. Hegarty BD, Bobard A, Hainault I, Ferré P, Bossard P, Foufelle F. Distinct roles of insulin and liver X receptor in the induction and cleavage of sterol regulatory element-binding protein-1c. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Jan 18;102(3):791–6.
296. Brown MS, Goldstein JL. A proteolytic pathway that controls the cholesterol content of membranes, cells, and blood. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 Sep 28;96(20):11041–8.
297. Eberlé D, Hegarty B, Bossard P, Ferré P, Foufelle F. SREBP transcription factors: master regulators of lipid homeostasis. *Biochimie*. 2004 Nov;86(11):839–48.
298. Postic C, Girard J. Contribution of de novo fatty acid synthesis to hepatic steatosis and insulin resistance: lessons from genetically engineered mice. *J Clin Invest*. 2008 Mar;118(3):829–38.
299. Rawson RB. Control of lipid metabolism by regulated intramembrane proteolysis of sterol regulatory element binding proteins (SREBPs). *Biochem Soc Symp*. 2003;(70):221–31.
300. Abdul-Wahed A, Guilmeau S, Postic C. Sweet Sixteenth for ChREBP: Established Roles and Future Goals. *Cell Metab*. 2017 Aug 1;26(2):324–41.
301. Dentin R, Pégurier J-P, Benhamed F, Fofelle F, Ferré P, Fauveau V, et al. Hepatic glucokinase is required for the synergistic action of ChREBP and SREBP-1c on glycolytic and lipogenic gene expression. *J Biol Chem*. 2004 May 7;279(19):20314–26.
302. Ortega-Prieto P, Postic C. Carbohydrate Sensing Through the Transcription Factor ChREBP. *Front Genet*. 2019 Jun 4;10.
303. Yamashita H, Takenoshita M, Sakurai M, Bruick RK, Henzel WJ, Shillinglaw W, et al. A glucose-responsive transcription factor that regulates carbohydrate metabolism in the liver. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Jul 31;98(16):9116–21.
304. Bricambert J, Miranda J, Benhamed F, Girard J, Postic C, Dentin R. Salt-inducible kinase 2 links transcriptional coactivator p300 phosphorylation to the prevention of ChREBP-dependent hepatic steatosis in mice. *J Clin Invest*. 2010 Dec;120(12):4316–31.
305. Guinez C, Filhoulaud G, Rayah-Benhamed F, Marmier S, Dubuquoy C, Dentin R, et al. O-GlcNAcylation increases ChREBP protein content and transcriptional activity in the liver. *Diabetes*. 2011 May;60(5):1399–413.
306. Stoeckman AK, Ma L, Towle HC. Mlx is the functional heteromeric partner of the carbohydrate response element-binding protein in glucose regulation of lipogenic enzyme genes. *J Biol Chem*. 2004 Apr 9;279(15):15662–9.
307. Herman MA, Peroni OD, Villoria J, Schön MR, Abumrad NA, Blüher M, et al. A novel ChREBP isoform in adipose tissue regulates systemic glucose metabolism. *Nature*. 2012 Apr 19;484(7394):333–8.
308. Iizuka K, Bruick RK, Liang G, Horton JD, Uyeda K. Deficiency of carbohydrate response element-binding protein (ChREBP) reduces lipogenesis as well as glycolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 May 11;101(19):7281–6.

309. Ma L, Robinson LN, Towle HC. ChREBP*MLx is the principal mediator of glucose-induced gene expression in the liver. *J Biol Chem*. 2006 Sep 29;281(39):28721–30.
310. Davies MN, O’Callaghan BL, Towle HC. Glucose activates ChREBP by increasing its rate of nuclear entry and relieving repression of its transcriptional activity. *J Biol Chem*. 2008 Aug 29;283(35):24029–38.
311. Kawaguchi T, Takenoshita M, Kabashima T, Uyeda K. Glucose and cAMP regulate the L-type pyruvate kinase gene by phosphorylation/dephosphorylation of the carbohydrate response element binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Nov 20;98(24):13710–5.
312. Kawaguchi T, Osatomi K, Yamashita H, Kabashima T, Uyeda K. Mechanism for fatty acid ‘sparing’ effect on glucose-induced transcription: regulation of carbohydrate-responsive element-binding protein by AMP-activated protein kinase. *J Biol Chem*. 2002 Feb 8;277(6):3829–35.
313. Wang H, Zhao M, Sud N, Christian P, Shen J, Song Y, et al. Glucagon regulates hepatic lipid metabolism via cAMP and Insig-2 signaling: implication for the pathogenesis of hypertriglyceridemia and hepatic steatosis. *Sci Rep*. 2016 Sep 1;6.
314. Girard J, Perdereau D, Fougère F, Prip-Buus C, Ferré P. Regulation of lipogenic enzyme gene expression by nutrients and hormones. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol*. 1994 Jan;8(1):36–42.
315. Peng I-C, Chen Z, Sun W, Li Y-S, Marin TL, Hsu P-H, et al. Glucagon regulates ACC activity in adipocytes through the CAMKK β /AMPK pathway. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2012 Jun 15;302(12):E1560-1568.
316. Vergès B. Pathophysiology of diabetic dyslipidaemia: where are we? *Diabetologia*. 2015;58(5):886–99.
317. Vergès B. Abnormal hepatic apolipoprotein B metabolism in type 2 diabetes. *Atherosclerosis*. 2010 Aug;211(2):353–60.
318. Cianflone K, Paglialunga S, Roy C. Intestinally derived lipids: metabolic regulation and consequences--an overview. *Atheroscler Suppl*. 2008 Sep;9(2):63–8.
319. Huang Y, Mahley RW. Apolipoprotein E: Structure and Function in Lipid Metabolism, Neurobiology, and Alzheimer’s Diseases. *Neurobiol Dis*. 2014 Dec;72PA:3–12.
320. Fisher EA, Pan M, Chen X, Wu X, Wang H, Jamil H, et al. The triple threat to nascent apolipoprotein B. Evidence for multiple, distinct degradative pathways. *J Biol Chem*. 2001 Jul 27;276(30):27855–63.
321. Olofsson SO, Stillemark-Billton P, Asp L. Intracellular assembly of VLDL: two major steps in separate cell compartments. *Trends Cardiovasc Med*. 2000 Nov;10(8):338–45.
322. Brown AM, Gibbons GF. Insulin inhibits the maturation phase of VLDL assembly via a phosphoinositide 3-kinase-mediated event. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2001 Oct;21(10):1656–61.
323. Karimian Pour N, Adeli K. Insulin silences apolipoprotein B mRNA translation by inducing intracellular traffic into cytoplasmic RNA granules. *Biochemistry*. 2011 Aug 16;50(32):6942–50.
324. Lewis GF, Uffelman KD, Szeto LW, Steiner G. Effects of acute hyperinsulinemia on VLDL triglyceride and VLDL apoB production in normal weight and obese individuals. *Diabetes*. 1993 Jun;42(6):833–42.
325. Malmström R, Packard CJ, Caslake M, Bedford D, Stewart P, Yki-Järvinen H, et al. Effects of insulin and acipimox on VLDL1 and VLDL2 apolipoprotein B production in normal subjects. *Diabetes*. 1998 May;47(5):779–87.
326. Sparks JD, Sparks CE, Adeli K. Selective hepatic insulin resistance, VLDL overproduction, and hypertriglyceridemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2012 Sep;32(9):2104–12.

327. Taskinen M-R. Diabetic dyslipidaemia: from basic research to clinical practice. *Diabetologia*. 2003 Jun;46(6):733–49.
328. Vergès B. New insight into the pathophysiology of lipid abnormalities in type 2 diabetes. *Diabetes Metab*. 2005 Nov;31(5):429–39.
329. Altomonte J, Cong L, Harbaran S, Richter A, Xu J, Meseck M, et al. Foxo1 mediates insulin action on apoC-III and triglyceride metabolism. *J Clin Invest*. 2004 Nov;114(10):1493–503.
330. Laatsch A, Merkel M, Talmud PJ, Grewal T, Beisiegel U, Heeren J. Insulin stimulates hepatic low density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP1) to increase postprandial lipoprotein clearance. *Atherosclerosis*. 2009 May;204(1):105–11.
331. Chait A, Bierman EL, Albers JJ. Low-density lipoprotein receptor activity in cultured human skin fibroblasts. Mechanism of insulin-induced stimulation. *J Clin Invest*. 1979 Nov;64(5):1309–19.
332. Ji A, Wroblewski JM, Cai L, de Beer MC, Webb NR, van der Westhuyzen DR. Nascent HDL formation in hepatocytes and role of ABCA1, ABCG1, and SR-BI. *J Lipid Res*. 2012 Mar;53(3):446–55.
333. Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L, Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L. *Biochemistry*. 5th ed. W H Freeman; 2002.
334. Tizianello A, De Ferrari G, Garibotto G, Robaudo C. Amino acid metabolism and the liver in renal failure. *Am J Clin Nutr*. 1980 Jul;33(7):1354–62.
335. Eley HL, Russell ST, Tisdale MJ. Mechanism of attenuation of muscle protein degradation induced by tumor necrosis factor-alpha and angiotensin II by beta-hydroxy-beta-methylbutyrate. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2008 Dec;295(6):E1417-1426.
336. Lang CH, Frost RA, Vary TC. Regulation of muscle protein synthesis during sepsis and inflammation. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2007 Aug;293(2):E453-459.
337. Yang X, Yang C, Farberman A, Rideout TC, de Lange CFM, France J, et al. The mammalian target of rapamycin-signaling pathway in regulating metabolism and growth. *J Anim Sci*. 2008 Apr;86(14 Suppl):E36-50.
338. Garlick PJ, McNurlan MA, Bark T, Lang CH, Gelato MC. Hormonal regulation of protein metabolism in relation to nutrition and disease. *J Nutr*. 1998;128(2 Suppl):356S-359S.
339. Bennet WM, Connacher AA, Scrimgeour CM, Rennie MJ. The effect of amino acid infusion on leg protein turnover assessed by L-[15N]phenylalanine and L-[1-13C]leucine exchange. *Eur J Clin Invest*. 1990 Feb;20(1):41–50.
340. Biolo G, Declan Fleming RY, Wolfe RR. Physiologic hyperinsulinemia stimulates protein synthesis and enhances transport of selected amino acids in human skeletal muscle. *J Clin Invest*. 1995 Feb;95(2):811–9.
341. Tessari P, Zanetti M, Barazzoni R, Vettore M, Michielan F. Mechanisms of postprandial protein accretion in human skeletal muscle. Insight from leucine and phenylalanine forearm kinetics. *J Clin Invest*. 1996 Sep 15;98(6):1361–72.
342. Wolfe RR. Effects of insulin on muscle tissue. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2000 Jan;3(1):67–71.
343. Millward DJ, Odedra B, Bates PC. The role of insulin, corticosterone and other factors in the acute recovery of muscle protein synthesis on refeeding food-deprived rats. *Biochem J*. 1983 Dec 15;216(3):583–7.
344. Shah OJ, Anthony JC, Kimball SR, Jefferson LS. 4E-BP1 and S6K1: translational integration sites for nutritional and hormonal information in muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2000 Oct;279(4):E715-729.

345. Mithieux G, Rajas F, Gautier-Stein A, Soty M. Adaptation of hepatic, renal and intestinal gluconeogenesis during food deprivation. In: Preedy VR and Patel VB, editor. Handbook of Famine, Starvation and nutrient deprivation : from cells to policy. 2017. p. 2133–47.
346. Owen OE, Morgan AP, Kemp HG, Sullivan JM, Herrera MG, Cahill GF. Brain metabolism during fasting. *J Clin Invest.* 1967 Oct;46(10):1589–95.
347. Windmueller HG, Spaeth AE. Identification of ketone bodies and glutamine as the major respiratory fuels in vivo for postabsorptive rat small intestine. *J Biol Chem.* 1978 Jan 10;253(1):69–76.
348. van Schaftingen E, Gerin I. The glucose-6-phosphatase system. *Biochem J.* 2002 Mar 15;362(Pt 3):513–32.
349. Cersosimo E, Garlick P, Ferretti J. Insulin regulation of renal glucose metabolism in humans. *Am J Physiol-Endocrinol Metab.* 1999 Jan 1;276(1):E78–84.
350. Mithieux G, Gautier-Stein A, Rajas F, Zitoun C. Contribution of intestine and kidney to glucose fluxes in different nutritional states in rat. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.* 2006 Feb;143(2):195–200.
351. Nordlie RC, Foster JD, Lange AJ. Regulation of glucose production by the liver. *Annu Rev Nutr.* 1999;19:379–406.
352. Owen OE, Felig P, Morgan AP, Wahren J, Cahill GF. Liver and kidney metabolism during prolonged starvation. *J Clin Invest.* 1969 Mar;48(3):574–83.
353. Mutel E, Gautier-Stein A, Abdul-Wahed A, Amigó-Correig M, Zitoun C, Stefanutti A, et al. Control of blood glucose in the absence of hepatic glucose production during prolonged fasting in mice: induction of renal and intestinal gluconeogenesis by glucagon. *Diabetes.* 2011 Dec;60(12):3121–31.
354. Rajas F, Labrune P, Mithieux G. Glycogen storage disease type 1 and diabetes: learning by comparing and contrasting the two disorders. *Diabetes Metab.* 2013 Oct;39(5):377–87.
355. Rajas F, Gautier-Stein A, Mithieux G. Glucose-6 Phosphate, A Central Hub for Liver Carbohydrate Metabolism. *Metabolites.* 2019 Nov 20;9(12).
356. Meyer C, Stumvoll M, Dostou J, Welle S, Haymond M, Gerich J. Renal substrate exchange and gluconeogenesis in normal postabsorptive humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2002 Feb;282(2):E428-434.
357. Stumvoll M, Meyer C, Perriello G, Kreider M, Welle S, Gerich J. Human kidney and liver gluconeogenesis: evidence for organ substrate selectivity. *Am J Physiol.* 1998;274(5):E817-826.
358. Croset M, Rajas F, Zitoun C, Hurot JM, Montano S, Mithieux G. Rat small intestine is an insulin-sensitive gluconeogenic organ. *Diabetes.* 2001 Apr;50(4):740–6.
359. Mithieux G, Rajas F, Gautier-Stein A. A Novel Role for Glucose 6-Phosphatase in the Small Intestine in the Control of Glucose Homeostasis. *J Biol Chem.* 2004 Oct 22;279(43):44231–4.
360. Mithieux G, Bady I, Gautier A, Croset M, Rajas F, Zitoun C. Induction of control genes in intestinal gluconeogenesis is sequential during fasting and maximal in diabetes. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2004 Mar;286(3):E370-375.
361. Rajas F, Bruni N, Montano S, Zitoun C, Mithieux G. The glucose-6 phosphatase gene is expressed in human and rat small intestine: Regulation of expression in fasted and diabetic rats. *Gastroenterology.* 1999 Jul;117(1):132–9.
362. Okar DA, Wu C, Lange AJ. Regulation of the regulatory enzyme, 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase. *Adv Enzyme Regul.* 2004;44:123–54.

363. Hall RK, Yamasaki T, Kucera T, Waltner-Law M, O'Brien R, Granner DK. Regulation of phosphoenolpyruvate carboxykinase and insulin-like growth factor-binding protein-1 gene expression by insulin. The role of winged helix/forkhead proteins. *J Biol Chem*. 2000 Sep 29;275(39):30169–75.
364. Mithieux G, Vidal H, Zitoun C, Bruni N, Daniele N, Minassian C. Glucose-6-phosphatase mRNA and activity are increased to the same extent in kidney and liver of diabetic rats. *Diabetes*. 1996 Jul;45(7):891–6.
365. Schmoll D, Walker KS, Alessi DR, Grempler R, Burchell A, Guo S, et al. Regulation of glucose-6-phosphatase gene expression by protein kinase Balpha and the forkhead transcription factor FKHR. Evidence for insulin response unit-dependent and -independent effects of insulin on promoter activity. *J Biol Chem*. 2000 Nov 17;275(46):36324–33.
366. Matsuzaki H, Daitoku H, Hatta M, Tanaka K, Fukamizu A. Insulin-induced phosphorylation of FKHR (Foxo1) targets to proteasomal degradation. *Proc Natl Acad Sci*. 2003 Sep 30;100(20):11285–90.
367. Vander Kooi BT, Streeper RS, Svitek CA, Oeser JK, Powell DR, O'Brien RM. The three insulin response sequences in the glucose-6-phosphatase catalytic subunit gene promoter are functionally distinct. *J Biol Chem*. 2003 Apr 4;278(14):11782–93.
368. Logie L, Ruiz-Alcaraz AJ, Keane M, Woods YL, Bain J, Marquez R, et al. Characterization of a protein kinase B inhibitor in vitro and in insulin-treated liver cells. *Diabetes*. 2007 Sep;56(9):2218–27.
369. O'Brien RM, Streeper RS, Ayala JE, Stadelmaier BT, Hornbuckle LA. Insulin-regulated gene expression. *Biochem Soc Trans*. 2001 Aug;29(Pt 4):552–8.
370. Onuma H, Oeser JK, Nelson BA, Wang Y, Flemming BP, Scheving LA, et al. Insulin and Epidermal Growth Factor Suppress Basal Glucose-6-Phosphatase Catalytic Subunit Gene Transcription Through Overlapping but Distinct Mechanisms. *Biochem J*. 2009 Jan 15;417(2):611–20.
371. Streeper RS, Svitek CA, Chapman S, Greenbaum LE, Taub R, O'Brien RM. A multicomponent insulin response sequence mediates a strong repression of mouse glucose-6-phosphatase gene transcription by insulin. *J Biol Chem*. 1997 May 2;272(18):11698–701.
372. Wang Y, Zhou Y, Graves DT. FOXO Transcription Factors: Their Clinical Significance and Regulation. *BioMed Res Int*. 2014;2014.
373. Daniele N, Rajas F, Payrastre B, Mauco G, Zitoun C, Mithieux G. Phosphatidylinositol 3-kinase translocates onto liver endoplasmic reticulum and may account for the inhibition of glucose-6-phosphatase during refeeding. *J Biol Chem*. 1999 Feb 5;274(6):3597–601.
374. el-Maghrabi MR, Pilkis J, Marker AJ, Colosia AD, D'Angelo G, Fraser BA, et al. cDNA sequence of rat liver fructose-1,6-bisphosphatase and evidence for down-regulation of its mRNA by insulin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1988 Nov;85(22):8430–4.
375. Pilkis SJ, El-Maghrabi MR, Pilkis J, Claus T. Inhibition of fructose-1,6-bisphosphatase by fructose 2,6-bisphosphate. *J Biol Chem*. 1981 Apr 25;256(8):3619–22.
376. Van Schaftingen E, Hers HG. Inhibition of fructose-1,6-bisphosphatase by fructose 2,6-biphosphate. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1981 May;78(5):2861–3.
377. Rajas F, Croset M, Zitoun C, Montano S, Mithieux G. Induction of PEPCK gene expression in insulinopenia in rat small intestine. *Diabetes*. 2000 Jul;49(7):1165–8.
378. Coppack SW, Jensen MD, Miles JM. In vivo regulation of lipolysis in humans. *J Lipid Res*. 1994 Feb;35(2):177–93.
379. Freyse EJ, Fischer U, Albrecht G, Marx S, Keilacker H. The effect of prehepatic insulin administration on alanine flux rates in diabetic dogs. *Diabetologia*. 1987 Jun;30(6):402–8.

380. Ichai C, Guignot L, El-Mir MY, Nogueira V, Guigas B, Chauvin C, et al. Glucose 6-phosphate hydrolysis is activated by glucagon in a low temperature-sensitive manner. *J Biol Chem*. 2001 Jul 27;276(30):28126–33.
381. Jiang G, Zhang BB. Glucagon and regulation of glucose metabolism. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2003 Apr;284(4):E671-678.
382. Mittelman SD, Fu YY, Rebrin K, Steil G, Bergman RN. Indirect effect of insulin to suppress endogenous glucose production is dominant, even with hyperglucagonemia. *J Clin Invest*. 1997 Dec 15;100(12):3121–30.
383. Stevenson RW, Williams PE, Cherrington AD. Role of glucagon suppression on gluconeogenesis during insulin treatment of the conscious diabetic dog. *Diabetologia*. 1987 Oct;30(10):782–90.
384. Unger RH. Glucagon physiology and pathophysiology in the light of new advances. *Diabetologia*. 1985 Aug;28(8):574–8.
385. Croniger C, Leahy P, Reshef L, Hanson RW. C/EBP and the control of phosphoenolpyruvate carboxykinase gene transcription in the liver. *J Biol Chem*. 1998 Nov 27;273(48):31629–32.
386. Gautier-Stein A, Mithieux G, Rajas F. A distal region involving hepatocyte nuclear factor 4alpha and CAAT/enhancer binding protein markedly potentiates the protein kinase A stimulation of the glucose-6-phosphatase promoter. *Mol Endocrinol Baltim Md*. 2005 Jan;19(1):163–74.
387. Gautier-Stein A, Zitoun C, Lalli E, Mithieux G, Rajas F. Transcriptional regulation of the glucose-6-phosphatase gene by cAMP/vasoactive intestinal peptide in the intestine. Role of HNF4alpha, CREM, HNF1alpha, and C/EBPalpha. *J Biol Chem*. 2006 Oct 20;281(42):31268–78.
388. Bady I, Zitoun C, Guignot L, Mithieux G. Activation of liver G-6-Pase in response to insulin-induced hypoglycemia or epinephrine infusion in the rat. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2002 Apr;282(4):E905-910.
389. Nonogaki K. New insights into sympathetic regulation of glucose and fat metabolism. *Diabetologia*. 2000 May;43(5):533–49.
390. Güemes A, Georgiou P. Review of the role of the nervous system in glucose homeostasis and future perspectives towards the management of diabetes. *Bioelectron Med*. 2018 Jul 4;4(1):9.
391. Lin HV, Plum L, Ono H, Gutiérrez-Juárez R, Shanabrough M, Borok E, et al. Divergent regulation of energy expenditure and hepatic glucose production by insulin receptor in agouti-related protein and POMC neurons. *Diabetes*. 2010 Feb;59(2):337–46.
392. Yi C-X, la Fleur SE, Fliers E, Kalsbeek A. The role of the autonomic nervous liver innervation in the control of energy metabolism. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Basis Dis*. 2010 Apr 1;1802(4):416–31.
393. Brodows RG, Pi-Sunyer null, Campbell RG. Sympathetic control of hepatic glycogenolysis during glucopenia in man. *Metabolism*. 1975 May;24(5):617–24.
394. Hoffman RP. Sympathetic mechanisms of hypoglycemic counterregulation. *Curr Diabetes Rev*. 2007 Aug;3(3):185–93.
395. Shimazu T. Reciprocal Innervation of the Liver: Its Significance in Metabolic Control. In: Szabo AJ, editor. *Advances in Metabolic Disorders*. Elsevier; 1983. p. 355–84. (CNS Regulation of Carbohydrate Metabolism; vol. 10).
396. Hanson RW, Reshef L. Regulation of phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) gene expression. *Annu Rev Biochem*. 1997;66:581–611.

397. Lin B, Morris DW, Chou JY. Hepatocyte nuclear factor 1alpha is an accessory factor required for activation of glucose-6-phosphatase gene transcription by glucocorticoids. *DNA Cell Biol.* 1998 Nov;17(11):967–74.
398. Mink S, Haenig B, Klempnauer KH. Interaction and functional collaboration of p300 and C/EBPbeta. *Mol Cell Biol.* 1997 Nov;17(11):6609–17.
399. Scott DK, Strömstedt PE, Wang JC, Granner DK. Further characterization of the glucocorticoid response unit in the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene. The role of the glucocorticoid receptor-binding sites. *Mol Endocrinol Baltim Md.* 1998 Apr;12(4):482–91.
400. Stafford JM, Wilkinson JC, Beechem JM, Granner DK. Accessory factors facilitate the binding of glucocorticoid receptor to the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene promoter. *J Biol Chem.* 2001 Oct 26;276(43):39885–91.
401. Vander Kooi BT, Onuma H, Oeser JK, Svitek CA, Allen SR, Vander Kooi CW, et al. The glucose-6-phosphatase catalytic subunit gene promoter contains both positive and negative glucocorticoid response elements. *Mol Endocrinol Baltim Md.* 2005 Dec;19(12):3001–22.
402. Corssmit EP, Romijn JA, Sauerwein HP. Review article: Regulation of glucose production with special attention to nonclassical regulatory mechanisms: a review. *Metabolism.* 2001 Jul;50(7):742–55.
403. Gutiérrez-Juárez R, Obici S, Rossetti L. Melanocortin-independent effects of leptin on hepatic glucose fluxes. *J Biol Chem.* 2004 Nov 26;279(48):49704–15.
404. Kamohara S, Burcelin R, Halaas JL, Friedman JM, Charron MJ. Acute stimulation of glucose metabolism in mice by leptin treatment. *Nature.* 1997 Sep 25;389(6649):374–7.
405. Liu L, Karkanias GB, Morales JC, Hawkins M, Barzilai N, Wang J, et al. Intracerebroventricular leptin regulates hepatic but not peripheral glucose fluxes. *J Biol Chem.* 1998 Nov 20;273(47):31160–7.
406. Rossetti L, Massillon D, Barzilai N, Vuguin P, Chen W, Hawkins M, et al. Short term effects of leptin on hepatic gluconeogenesis and in vivo insulin action. *J Biol Chem.* 1997 Oct 31;272(44):27758–63.
407. Andreelli F, Foretz M, Knauf C, Cani PD, Perrin C, Iglesias MA, et al. Liver adenosine monophosphate-activated kinase-alpha2 catalytic subunit is a key target for the control of hepatic glucose production by adiponectin and leptin but not insulin. *Endocrinology.* 2006 May;147(5):2432–41.
408. Weyer C, Funahashi T, Tanaka S, Hotta K, Matsuzawa Y, Pratley RE, et al. Hypoadiponectinemia in obesity and type 2 diabetes: close association with insulin resistance and hyperinsulinemia. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001 May;86(5):1930–5.
409. Combs TP, Berg AH, Obici S, Scherer PE, Rossetti L. Endogenous glucose production is inhibited by the adipose-derived protein Acrp30. *J Clin Invest.* 2001 Dec 15;108(12):1875–81.
410. Miller RA, Chu Q, Le Lay J, Scherer PE, Ahima RS, Kaestner KH, et al. Adiponectin suppresses gluconeogenic gene expression in mouse hepatocytes independent of LKB1-AMPK signaling. *J Clin Invest.* 2011 Jun 1;121(6):2518–28.
411. Gjedsted J, Gormsen LC, Nielsen S, Schmitz O, Djurhuus CB, Keiding S, et al. Effects of a 3-day fast on regional lipid and glucose metabolism in human skeletal muscle and adipose tissue. *Acta Physiol Oxf Engl.* 2007 Nov;191(3):205–16.
412. Debeer LJ, Beynen AC, Mannaerts GP, Geelen MJH. Lipolysis of hepatic triacylglycerol stores. *FEBS Lett.* 1982;140(2):159–64.
413. Nielsen TS, Jessen N, Jørgensen JOL, Møller N, Lund S. Dissecting adipose tissue lipolysis: molecular regulation and implications for metabolic disease. *J Mol Endocrinol.* 2014 Jun;52(3):R199–222.

414. Wiggins D, Gibbons GF. The lipolysis/esterification cycle of hepatic triacylglycerol. Its role in the secretion of very-low-density lipoprotein and its response to hormones and sulphonylureas. *Biochem J*. 1992 Jun 1;284(Pt 2):457–62.
415. Krauss RM. Lipids and lipoproteins in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 2004 Jun;27(6):1496–504.
416. Zimmermann R, Strauss JG, Haemmerle G, Schoiswohl G, Birner-Gruenberger R, Riederer M, et al. Fat mobilization in adipose tissue is promoted by adipose triglyceride lipase. *Science*. 2004 Nov 19;306(5700):1383–6.
417. Fredrikson G, Strålfors P, Nilsson NO, Belfrage P. Hormone-sensitive lipase of rat adipose tissue. Purification and some properties. *J Biol Chem*. 1981 Jun 25;256(12):6311–20.
418. Fredrikson G, Tornqvist H, Belfrage P. Hormone-sensitive lipase and monoacylglycerol lipase are both required for complete degradation of adipocyte triacylglycerol. *Biochim Biophys Acta BBA - Lipids Lipid Metab*. 1986 Apr 15;876(2):288–93.
419. Furuhashi M, Hotamisligil GS. Fatty acid-binding proteins: role in metabolic diseases and potential as drug targets. *Nat Rev Drug Discov*. 2008 Jun;7(6):489.
420. Barbe P, Millet L, Galitzky J, Lafontan M, Berlan M. In situ assessment of the role of the beta 1-, beta 2- and beta 3-adrenoceptors in the control of lipolysis and nutritive blood flow in human subcutaneous adipose tissue. *Br J Pharmacol*. 1996 Mar;117(5):907–13.
421. Mauriège P, De Pergola G, Berlan M, Lafontan M. Human fat cell beta-adrenergic receptors: beta-agonist-dependent lipolytic responses and characterization of beta-adrenergic binding sites on human fat cell membranes with highly selective beta 1-antagonists. *J Lipid Res*. 1988 May;29(5):587–601.
422. Tavernier G, Barbe P, Galitzky J, Berlan M, Caput D, Lafontan M, et al. Expression of beta3-adrenoceptors with low lipolytic action in human subcutaneous white adipocytes. *J Lipid Res*. 1996 Jan;37(1):87–97.
423. Lafontan M, Berlan M. Fat cell adrenergic receptors and the control of white and brown fat cell function. *J Lipid Res*. 1993 Jul;34(7):1057–91.
424. Lafontan M, Barbe P, Galitzky J, Tavernier G, Langin D, Carpéné C, et al. Adrenergic regulation of adipocyte metabolism. *Hum Reprod Oxf Engl*. 1997 Oct;12 Suppl 1:6–20.
425. Anthonsen MW, Rönstrand L, Wernstedt C, Degerman E, Holm C. Identification of novel phosphorylation sites in hormone-sensitive lipase that are phosphorylated in response to isoproterenol and govern activation properties in vitro. *J Biol Chem*. 1998 Jan 2;273(1):215–21.
426. Greenberg AS, Egan JJ, Wek SA, Garty NB, Blanchette-Mackie EJ, Londos C. Perilipin, a major hormonally regulated adipocyte-specific phosphoprotein associated with the periphery of lipid storage droplets. *J Biol Chem*. 1991 Jun 15;266(17):11341–6.
427. Strålfors P, Björgell P, Belfrage P. Hormonal regulation of hormone-sensitive lipase in intact adipocytes: identification of phosphorylated sites and effects on the phosphorylation by lipolytic hormones and insulin. *Proc Natl Acad Sci*. 1984 Jun 1;81(11):3317–21.
428. Granneman JG, Moore H-PH, Krishnamoorthy R, Rathod M. Perilipin controls lipolysis by regulating the interactions of AB-hydrolase containing 5 (Abhd5) and adipose triglyceride lipase (Atgl). *J Biol Chem*. 2009 Dec 11;284(50):34538–44.
429. Lass A, Zimmermann R, Haemmerle G, Riederer M, Schoiswohl G, Schweiger M, et al. Adipose triglyceride lipase-mediated lipolysis of cellular fat stores is activated by CGI-58 and defective in Chanarin-Dorfman Syndrome. *Cell Metab*. 2006 May;3(5):309–19.

430. Yamaguchi T, Omatsu N, Morimoto E, Nakashima H, Ueno K, Tanaka T, et al. CGI-58 facilitates lipolysis on lipid droplets but is not involved in the vesiculation of lipid droplets caused by hormonal stimulation. *J Lipid Res.* 2007 May;48(5):1078–89.
431. Egan JJ, Greenberg AS, Chang MK, Wek SA, Moos MC, Londos C. Mechanism of hormone-stimulated lipolysis in adipocytes: translocation of hormone-sensitive lipase to the lipid storage droplet. *Proc Natl Acad Sci.* 1992 Sep 15;89(18):8537–41.
432. Shen W-J, Patel S, Miyoshi H, Greenberg AS, Kraemer FB. Functional interaction of hormone-sensitive lipase and perilipin in lipolysis. *J Lipid Res.* 2009 Nov;50(11):2306–13.
433. Wang H, Hu L, Dalen K, Dorward H, Marcinkiewicz A, Russell D, et al. Activation of hormone-sensitive lipase requires two steps, protein phosphorylation and binding to the PAT-1 domain of lipid droplet coat proteins. *J Biol Chem.* 2009 Nov 13;284(46):32116–25.
434. Jensen MD, Nielsen S. Insulin dose response analysis of free fatty acid kinetics. *Metabolism.* 2007 Jan 1;56(1):68–76.
435. Choi YH, Park S, Hockman S, Zmuda-Trzebiatowska E, Svennelid F, Haluzik M, et al. Alterations in regulation of energy homeostasis in cyclic nucleotide phosphodiesterase 3B-null mice. *J Clin Invest.* 2006 Dec;116(12):3240–51.
436. Michalik L, Wahli W. Involvement of PPAR nuclear receptors in tissue injury and wound repair. *J Clin Invest.* 2006 Mar 1;116(3):598–606.
437. Tyagi S, Gupta P, Saini AS, Kaushal C, Sharma S. The peroxisome proliferator-activated receptor: A family of nuclear receptors role in various diseases. *J Adv Pharm Technol Res.* 2011;2(4):236–40.
438. Willson TM, Brown PJ, Sternbach DD, Henke BR. The PPARs: from orphan receptors to drug discovery. *J Med Chem.* 2000 Feb 24;43(4):527–50.
439. Dreyer C, Keller H, Mahfoudi A, Laudet V, Krey G, Wahli W. Positive regulation of the peroxisomal β -oxidation pathway by fatty acids through activation of peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR). *Biol Cell.* 1993 Jan 1;77:67–76.
440. Herzig S, Long F, Jhala US, Hedrick S, Quinn R, Bauer A, et al. CREB regulates hepatic gluconeogenesis through the coactivator PGC-1. *Nature.* 2001 Sep 13;413(6852):179–83.
441. Herzig S, Hedrick S, Morantte I, Koo S-H, Galimi F, Montminy M. CREB controls hepatic lipid metabolism through nuclear hormone receptor PPAR- γ . *Nature.* 2003 Nov 13;426(6963):190–3.
442. Vega RB, Huss JM, Kelly DP. The coactivator PGC-1 cooperates with peroxisome proliferator-activated receptor alpha in transcriptional control of nuclear genes encoding mitochondrial fatty acid oxidation enzymes. *Mol Cell Biol.* 2000 Mar;20(5):1868–76.
443. Pasiakos SM, Carbone JW. Assessment of skeletal muscle proteolysis and the regulatory response to nutrition and exercise. *IUBMB Life.* 2014 Jul;66(7):478–84.
444. Béchet D, Tassa A, Combaret L, Taillandier D, Attaix D. Regulation of skeletal muscle proteolysis by amino acids. *J Ren Nutr Off J Counc Ren Nutr Natl Kidney Found.* 2005 Jan;15(1):18–22.
445. Magkos F, Wang X, Mittendorfer B. Metabolic actions of insulin in men and women. *Nutr Burbank Los Angel Cty Calif.* 2010;26(7–8):686–93.
446. Reid MB. Response of the ubiquitin-proteasome pathway to changes in muscle activity. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2005 Jun;288(6):R1423–1431.
447. Debigaré R, Price SR. Proteolysis, the ubiquitin-proteasome system, and renal diseases. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2003 Jul;285(1):F1–8.

448. Wing SS, Banville D. 14-kDa ubiquitin-conjugating enzyme: structure of the rat gene and regulation upon fasting and by insulin. *Am J Physiol.* 1994 Jul;267(1 Pt 1):E39-48.
449. Kee AJ, Combaret L, Tilignac T, Souweine B, Aourousseau E, Dalle M, et al. Ubiquitin-proteasome-dependent muscle proteolysis responds slowly to insulin release and refeeding in starved rats. *J Physiol.* 2003 Feb 1;546(Pt 3):765-76.
450. Carbone JW, Pasiakos SM, Vislocky LM, Anderson JM, Rodriguez NR. Effects of short-term energy deficit on muscle protein breakdown and intramuscular proteolysis in normal-weight young adults. *Appl Physiol Nutr Metab Physiol Appl Nutr Metab.* 2014 Aug;39(8):960-8.
451. Cuervo AM, Knecht E, Terlecky SR, Dice JF. Activation of a selective pathway of lysosomal proteolysis in rat liver by prolonged starvation. *Am J Physiol.* 1995 Nov;269(5 Pt 1):C1200-1208.
452. Finn PF, Dice JF. Proteolytic and lipolytic responses to starvation. *Nutr Burbank Los Angel Cty Calif.* 2006 Aug;22(7-8):830-44.
453. Koga H, Martinez-Vicente M, Macian F, Verkhusha VV, Cuervo AM. A photoconvertible fluorescent reporter to track chaperone-mediated autophagy. *Nat Commun.* 2011 Jul 12;2:386.
454. Massey AC, Kaushik S, Sovak G, Kiffin R, Cuervo AM. Consequences of the selective blockage of chaperone-mediated autophagy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006 Apr 11;103(15):5805-10.
455. Gissel H. The role of Ca²⁺ in muscle cell damage. *Ann N Y Acad Sci.* 2005 Dec;1066:166-80.
456. Kinbara K, Sorimachi H, Ishiura S, Suzuki K. Muscle-specific calpain, p94, interacts with the extreme C-terminal region of connectin, a unique region flanked by two immunoglobulin C2 motifs. *Arch Biochem Biophys.* 1997 Jun 1;342(1):99-107.
457. Costelli P, Reffo P, Penna F, Autelli R, Bonelli G, Baccino FM. Ca²⁺-dependent proteolysis in muscle wasting. *Int J Biochem Cell Biol.* 2005 Oct;37(10):2134-46.
458. Goll DE, Thompson VF, Li H, Wei W, Cong J. The calpain system. *Physiol Rev.* 2003 Jul;83(3):731-801.
459. Du J, Wang X, Miereles C, Bailey JL, Debigare R, Zheng B, et al. Activation of caspase-3 is an initial step triggering accelerated muscle proteolysis in catabolic conditions. *J Clin Invest.* 2004 Jan;113(1):115-23.
460. Attaix D, Taillandier D. The Critical Role of the Ubiquitin-Proteasome Pathway in Muscle Wasting in Comparison to Lysosomal and Ca²⁺-Dependent Systems. In: Bittar EE, Rivett AJ, editors. *Advances in Molecular and Cell Biology.* Elsevier; 1998. p. 235-66. (Intracellular Protein Degradation; vol. 27).
461. Lowell BB, Ruderman NB, Goodman MN. Regulation of myofibrillar protein degradation in rat skeletal muscle during brief and prolonged starvation. *Metabolism.* 1986 Dec;35(12):1121-7.
462. Wing SS, Chiang HL, Goldberg AL, Dice JF. Proteins containing peptide sequences related to Lys-Phe-Glu-Arg-Gln are selectively depleted in liver and heart, but not skeletal muscle, of fasted rats. *Biochem J.* 1991 Apr 1;275 (Pt 1):165-9.
463. Dardevet D, Sornet C, Vary T, Grizard J. Phosphatidylinositol 3-kinase and p70 s6 kinase participate in the regulation of protein turnover in skeletal muscle by insulin and insulin-like growth factor I. *Endocrinology.* 1996 Oct;137(10):4087-94.
464. Kandarian SC, Jackman RW. Intracellular signaling during skeletal muscle atrophy. *Muscle Nerve.* 2006 Feb;33(2):155-65.
465. Pasiakos SM, Vislocky LM, Carbone JW, Altieri N, Konopelski K, Freake HC, et al. Acute energy deprivation affects skeletal muscle protein synthesis and associated intracellular signaling proteins in physically active adults. *J Nutr.* 2010 Apr;140(4):745-51.

466. Tran H, Brunet A, Griffith EC, Greenberg ME. The many forks in FOXO's road. *Sci STKE Signal Transduct Knowl Environ*. 2003 Mar 4;2003(172):RE5.
467. Wohlgemuth SE, Lees HA, Marzetti E, Manini TM, Aranda JM, Daniels MJ, et al. An exploratory analysis of the effects of a weight loss plus exercise program on cellular quality control mechanisms in older overweight women. *Rejuvenation Res*. 2011 Jun;14(3):315–24.
468. Mammucari C, Milan G, Romanello V, Masiero E, Rudolf R, Del Piccolo P, et al. FoxO3 controls autophagy in skeletal muscle in vivo. *Cell Metab*. 2007 Dec;6(6):458–71.
469. Ravussin E, Bogardus C. Relationship of genetics, age, and physical fitness to daily energy expenditure and fuel utilization. *Am J Clin Nutr*. 1989;49(5 Suppl):968–75.
470. Westerterp KR. Physical activity and physical activity induced energy expenditure in humans: measurement, determinants, and effects. *Front Physiol*. 2013;4:90.
471. Black AE, Coward WA, Cole TJ, Prentice AM. Human energy expenditure in affluent societies: an analysis of 574 doubly-labelled water measurements. *Eur J Clin Nutr*. 1996 Feb;50(2):72–92.
472. Ravussin E, Lillioja S, Anderson TE, Christin L, Bogardus C. Determinants of 24-hour energy expenditure in man. Methods and results using a respiratory chamber. *J Clin Invest*. 1986 Dec;78(6):1568–78.
473. Speakman JR. Body size, energy metabolism and lifespan. *J Exp Biol*. 2005 May 1;208(9):1717–30.
474. Doucet E, St-Pierre S, Alm eras N, Despr es JP, Bouchard C, Tremblay A. Evidence for the existence of adaptive thermogenesis during weight loss. *Br J Nutr*. 2001 Jun;85(6):715–23.
475. Gomez-Arbelaez D, Crujeiras AB, Castro AI, Martinez-Olmos MA, Canton A, Ordo nez-Mayan L, et al. Resting metabolic rate of obese patients under very low calorie ketogenic diet. *Nutr Metab*. 2018 Feb 17;15.
476. Inge TH, Courcoulas AP, Jenkins TM, Michalsky MP, Helmrath MA, Brandt ML, et al. Weight Loss and Health Status 3 Years after Bariatric Surgery in Adolescents. *N Engl J Med*. 2016 Jan 14;374(2):113–23.
477. Knuth ND, Johannsen DL, Tamboli RA, Marks-Shulman PA, Huizenga R, Chen KY, et al. Metabolic adaptation following massive weight loss is related to the degree of energy imbalance and changes in circulating leptin. *Obes Silver Spring Md*. 2014 Dec;22(12):2563–9.
478. Rosenbaum M, Hirsch J, Gallagher DA, Leibel RL. Long-term persistence of adaptive thermogenesis in subjects who have maintained a reduced body weight. *Am J Clin Nutr*. 2008 Oct;88(4):906–12.
479. Galgani JE, Santos JL. Insights about weight loss-induced metabolic adaptation. *Obes Silver Spring Md*. 2016 Feb;24(2):277–8.
480. M uller MJ, Bosy-Westphal A. Adaptive thermogenesis with weight loss in humans. *Obes Silver Spring Md*. 2013 Feb;21(2):218–28.
481. Ravussin E, Lillioja S, Knowler WC, Christin L, Freymond D, Abbott WG, et al. Reduced rate of energy expenditure as a risk factor for body-weight gain. *N Engl J Med*. 1988 Feb 25;318(8):467–72.
482. Tappy L. Thermic effect of food and sympathetic nervous system activity in humans. *Reprod Nutr Dev*. 1996;36(4):391–7.
483. de Jonge L, Bray GA. The thermic effect of food and obesity: a critical review. *Obes Res*. 1997 Nov;5(6):622–31.
484. Granata GP, Brandon LJ. The thermic effect of food and obesity: discrepant results and methodological variations. *Nutr Rev*. 2002 Aug;60(8):223–33.
485. Westerterp KR. Diet induced thermogenesis. *Nutr Metab*. 2004 Aug 18;1:5.

486. Acheson KJ. Influence of autonomic nervous system on nutrient-induced thermogenesis in humans. *Nutr* Burbank Los Angel Cty Calif. 1993 Aug;9(4):373–80.
487. Westerterp KR, Wilson SA, Rolland V. Diet induced thermogenesis measured over 24h in a respiration chamber: effect of diet composition. *Int J Obes Relat Metab Disord J Int Assoc Study Obes*. 1999 Mar;23(3):287–92.
488. Caspersen CJ, Powell KE, Christenson GM. Physical activity, exercise, and physical fitness: definitions and distinctions for health-related research. *Public Health Rep*. 1985;100(2):126–31.
489. Garland T, Schutz H, Chappell MA, Keeney BK, Meek TH, Copes LE, et al. The biological control of voluntary exercise, spontaneous physical activity and daily energy expenditure in relation to obesity: human and rodent perspectives. *J Exp Biol*. 2011 Jan 15;214(Pt 2):206–29.
490. Global Recommendations on Physical Activity for Health. Geneva: World Health Organization; 2010. (WHO Guidelines Approved by the Guidelines Review Committee).
491. Donnelly JE, Blair SN, Jakicic JM, Manore MM, Rankin JW, Smith BK, et al. American College of Sports Medicine Position Stand. Appropriate physical activity intervention strategies for weight loss and prevention of weight regain for adults. *Med Sci Sports Exerc*. 2009 Feb;41(2):459–71.
492. Haskell WL, Lee I-M, Pate RR, Powell KE, Blair SN, Franklin BA, et al. Physical activity and public health: updated recommendation for adults from the American College of Sports Medicine and the American Heart Association. *Med Sci Sports Exerc*. 2007 Aug;39(8):1423–34.
493. Lyznicki JM, Young DC, Riggs JA, Davis RM, Council on Scientific Affairs, American Medical Association. Obesity: assessment and management in primary care. *Am Fam Physician*. 2001 Jun 1;63(11):2185–96.
494. Lightfoot JT, De Geus EJC, Booth FW, Bray MS, den Hoed M, Kaprio J, et al. Biological / Genetic Regulation of Physical Activity Level: Consensus from GenBioPAC. *Med Sci Sports Exerc*. 2018 Apr;50(4):863–73.
495. Haman F, Blondin DP. Shivering thermogenesis in humans: Origin, contribution and metabolic requirement. *Temp Multidiscip Biomed J*. 2017 May 22;4(3):217–26.
496. Babu GJ, Bhupathy P, Carnes CA, Billman GE, Periasamy M. Differential expression of sarcolipin protein during muscle development and cardiac pathophysiology. *J Mol Cell Cardiol*. 2007 Aug;43(2):215–22.
497. Bal NC, Maurya SK, Sopariwala DH, Sahoo SK, Gupta SC, Shaikh SA, et al. Sarcolipin is a newly identified regulator of muscle-based thermogenesis in mammals. *Nat Med*. 2012 Oct;18(10):1575–9.
498. Pant M, Bal NC, Periasamy M. Cold adaptation overrides developmental regulation of sarcolipin expression in mice skeletal muscle: SOS for muscle-based thermogenesis? *J Exp Biol*. 2015 Aug;218(Pt 15):2321–5.
499. Butler J, Smyth N, Broadbridge R, Council CE, Lee AG, Stocker CJ, et al. The effects of sarcolipin over-expression in mouse skeletal muscle on metabolic activity. *Arch Biochem Biophys*. 2015 Mar 1;569:26–31.
500. Nowack J, Giroud S, Arnold W, Ruf T. Muscle Non-shivering Thermogenesis and Its Role in the Evolution of Endothermy. *Front Physiol*. 2017 [cited 2020 Jan 9];8.
501. Cohen P, Spiegelman BM. Cell biology of fat storage. *Mol Biol Cell*. 2016 Aug 15;27(16):2523–7.
502. Scherer PE. The Multifaceted Roles of Adipose Tissue—Therapeutic Targets for Diabetes and Beyond: The 2015 Banting Lecture. *Diabetes*. 2016;65(6):1452–61.
503. Cypess AM, Lehman S, Williams G, Tal I, Rodman D, Goldfine AB, et al. Identification and importance of brown adipose tissue in adult humans. *N Engl J Med*. 2009 Apr 9;360(15):1509–17.

504. Hany TF, Gharehpapagh E, Kamel EM, Buck A, Himms-Hagen J, von Schulthess GK. Brown adipose tissue: a factor to consider in symmetrical tracer uptake in the neck and upper chest region. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2002 Oct;29(10):1393–8.
505. Mirbolooki MR, Constantinescu CC, Pan M-L, Mukherjee J. Quantitative assessment of brown adipose tissue metabolic activity and volume using 18F-FDG PET/CT and β 3-adrenergic receptor activation. *EJNMMI Res*. 2011 Dec 1;1:30.
506. Nedergaard J, Bengtsson T, Cannon B. Unexpected evidence for active brown adipose tissue in adult humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2007 Aug;293(2):E444-452.
507. Zhang F, Hao G, Shao M, Nham K, An Y, Wang Q, et al. An Adipose Tissue Atlas: An Image-Guided Identification of Human-like BAT and Beige Depots in Rodents. *Cell Metab*. 2018 Jan 9;27(1):252-262.e3.
508. Scherer PE. Adipose tissue: from lipid storage compartment to endocrine organ. *Diabetes*. 2006 Jun;55(6):1537–45.
509. Betz MJ, Enerbäck S. Human Brown Adipose Tissue: What We Have Learned So Far. *Diabetes*. 2015 Jul;64(7):2352–60.
510. Cannon B, Nedergaard J. Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol Rev*. 2004 Jan;84(1):277–359.
511. Harms M, Seale P. Brown and beige fat: development, function and therapeutic potential. *Nat Med*. 2013 Oct;19(10):1252–63.
512. Wu J, Boström P, Sparks LM, Ye L, Choi JH, Giang A-H, et al. Beige Adipocytes Are a Distinct Type of Thermogenic Fat Cell in Mouse and Human. *Cell*. 2012 Jul 20;150(2):366–76.
513. Aquila H, Link TA, Klingenberg M. The uncoupling protein from brown fat mitochondria is related to the mitochondrial ADP/ATP carrier. Analysis of sequence homologies and of folding of the protein in the membrane. *EMBO J*. 1985 Sep;4(9):2369–76.
514. Bouillaud F, Weissenbach J, Ricquier D. Complete cDNA-derived amino acid sequence of rat brown fat uncoupling protein. *J Biol Chem*. 1986 Feb 5;261(4):1487–90.
515. Heaton GM, Wagenvoord RJ, Kemp A, Nicholls DG. Brown-adipose-tissue mitochondria: photoaffinity labelling of the regulatory site of energy dissipation. *Eur J Biochem*. 1978 Jan 16;82(2):515–21.
516. Ridley RG, Patel HV, Gerber GE, Morton RC, Freeman KB. Complete nucleotide and derived amino acid sequence of cDNA encoding the mitochondrial uncoupling protein of rat brown adipose tissue: lack of a mitochondrial targeting presequence. *Nucleic Acids Res*. 1986 May 27;14(10):4025–35.
517. Lenaz G, Genova ML. Structure and organization of mitochondrial respiratory complexes: a new understanding of an old subject. *Antioxid Redox Signal*. 2010 Apr 15;12(8):961–1008.
518. Nicholls DG, Locke RM. Thermogenic mechanisms in brown fat. *Physiol Rev*. 1984 Jan;64(1):1–64.
519. Bertholet AM, Kirichok Y. UCP1: a transporter for H⁺ and fatty acid anions. *Biochimie*. 2017 Mar;134:28–34.
520. Fedorenko A, Lishko PV, Kirichok Y. Mechanism of Fatty-Acid-Dependent UCP1 Uncoupling in Brown Fat Mitochondria. *Cell*. 2012 Oct 12;151(2):400–13.
521. Chouchani ET, Kazak L, Jedrychowski MP, Lu GZ, Erickson BK, Szpyt J, et al. Mitochondrial ROS regulate thermogenic energy expenditure and sulfenylation of UCP1. *Nature*. 2016 07;532(7597):112–6.
522. Klingenberg M. Wanderings in bioenergetics and biomembranes. *Biochim Biophys Acta BBA - Bioenerg*. 2010 Jun 1;1797(6):579–94.

523. Cannon B, Nedergaard J. The biochemistry of an inefficient tissue: brown adipose tissue. *Essays Biochem.* 1985;20:110–64.
524. Enerbäck S, Jacobsson A, Simpson EM, Guerra C, Yamashita H, Harper ME, et al. Mice lacking mitochondrial uncoupling protein are cold-sensitive but not obese. *Nature.* 1997 May 1;387(6628):90–4.
525. Saito M, Okamatsu-Ogura Y, Matsushita M, Watanabe K, Yoneshiro T, Nio-Kobayashi J, et al. High Incidence of Metabolically Active Brown Adipose Tissue in Healthy Adult Humans. *Diabetes.* 2009 Jul;58(7):1526–31.
526. Virtanen KA, Lidell ME, Orava J, Heglind M, Westergren R, Niemi T, et al. Functional brown adipose tissue in healthy adults. *N Engl J Med.* 2009 Apr 9;360(15):1518–25.
527. Farmer SR. Transcriptional control of adipocyte formation. *Cell Metab.* 2006 Oct;4(4):263–73.
528. Atit R, Sgaier SK, Mohamed OA, Taketo MM, Dufort D, Joyner AL, et al. Beta-catenin activation is necessary and sufficient to specify the dorsal dermal fate in the mouse. *Dev Biol.* 2006 Aug 1;296(1):164–76.
529. Timmons JA, Wennmalm K, Larsson O, Walden TB, Lassmann T, Petrovic N, et al. Myogenic gene expression signature establishes that brown and white adipocytes originate from distinct cell lineages. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007 Mar 13;104(11):4401–6.
530. Seale P, Bjork B, Yang W, Kajimura S, Chin S, Kuang S, et al. PRDM16 controls a brown fat/skeletal muscle switch. *Nature.* 2008 Aug 21;454(7207):961–7.
531. Forner F, Kumar C, Luber CA, Fromme T, Klingenspor M, Mann M. Proteome Differences between Brown and White Fat Mitochondria Reveal Specialized Metabolic Functions. *Cell Metab.* 2009 Oct;10(4):324–35.
532. Kajimura S, Seale P, Spiegelman BM. Transcriptional Control of Brown Fat Development. *Cell Metab.* 2010 Apr 7;11(4):257–62.
533. Seale P, Kajimura S, Yang W, Chin S, Rohas LM, Uldry M, et al. Transcriptional control of brown fat determination by PRDM16. *Cell Metab.* 2007 Jul;6(1):38–54.
534. Puigserver P, Wu Z, Park CW, Graves R, Wright M, Spiegelman BM. A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis. *Cell.* 1998 Mar 20;92(6):829–39.
535. Hallberg M, Morganstein DL, Kiskinis E, Shah K, Kralli A, Dilworth SM, et al. A Functional Interaction between RIP140 and PGC-1 α Regulates the Expression of the Lipid Droplet Protein CIDEA. *Mol Cell Biol.* 2008 Nov;28(22):6785–95.
536. Tseng Y-H, Kokkotou E, Schulz TJ, Huang TL, Winnay JN, Taniguchi CM, et al. New role of bone morphogenetic protein 7 in brown adipogenesis and energy expenditure. *Nature.* 2008 Aug 21;454(7207):1000–4.
537. Seale P, Kajimura S, Spiegelman BM. Transcriptional control of brown adipocyte development and physiological function—of mice and men. *Genes Dev.* 2009 Jan 4;23(7):788–97.
538. Picard F, Géhin M, Annicotte J-S, Rocchi S, Champy M-F, O'Malley BW, et al. SRC-1 and TIF2 control energy balance between white and brown adipose tissues. *Cell.* 2002 Dec 27;111(7):931–41.
539. Ross SE, Hemati N, Longo KA, Bennett CN, Lucas PC, Erickson RL, et al. Inhibition of adipogenesis by Wnt signaling. *Science.* 2000 Aug 11;289(5481):950–3.
540. Cousin B, Cinti S, Morroni M, Raimbault S, Ricquier D, Pénicaud L, et al. Occurrence of brown adipocytes in rat white adipose tissue: molecular and morphological characterization. *J Cell Sci.* 1992 Dec;103 (Pt 4):931–42.

541. Guerra C, Koza RA, Yamashita H, Walsh K, Kozak LP. Emergence of brown adipocytes in white fat in mice is under genetic control. Effects on body weight and adiposity. *J Clin Invest*. 1998 Jul 15;102(2):412–20.
542. Su S, Guntur AR, Nguyen DC, Fakory SS, Doucette CC, Leech C, et al. A Renewable Source of Human Beige Adipocytes for Development of Therapies to Treat Metabolic Syndrome. *Cell Rep*. 2018 11;25(11):3215–3228.e9.
543. Shabalina IG, Petrovic N, de Jong JMA, Kalinovich AV, Cannon B, Nedergaard J. UCP1 in brite/beige adipose tissue mitochondria is functionally thermogenic. *Cell Rep*. 2013 Dec 12;5(5):1196–203.
544. Cederberg A, Grønning LM, Ahrén B, Taskén K, Carlsson P, Enerbäck S. FOXC2 is a winged helix gene that counteracts obesity, hypertriglyceridemia, and diet-induced insulin resistance. *Cell*. 2001 Sep 7;106(5):563–73.
545. Yoshida T, Sakane N, Wakabayashi Y, Umekawa T, Kondo M. Anti-obesity and anti-diabetic effects of CL 316,243, a highly specific beta 3-adrenoceptor agonist, in yellow KK mice. *Life Sci*. 1994;54(7):491–8.
546. Grujic D, Susulic VS, Harper ME, Himms-Hagen J, Cunningham BA, Corkey BE, et al. Beta3-adrenergic receptors on white and brown adipocytes mediate beta3-selective agonist-induced effects on energy expenditure, insulin secretion, and food intake. A study using transgenic and gene knockout mice. *J Biol Chem*. 1997 Jul 11;272(28):17686–93.
547. Mottillo EP, Balasubramanian P, Lee Y-H, Weng C, Kershaw EE, Granneman JG. Coupling of lipolysis and de novo lipogenesis in brown, beige, and white adipose tissues during chronic β 3-adrenergic receptor activation. *J Lipid Res*. 2014 Nov;55(11):2276–86.
548. Lee Y-H, Petkova AP, Mottillo EP, Granneman JG. In vivo identification of bipotential adipocyte progenitors recruited by β 3-adrenoceptor activation and high-fat feeding. *Cell Metab*. 2012 Apr 4;15(4):480–91.
549. Lee Y-H, Mottillo EP, Granneman JG. Adipose tissue plasticity from WAT to BAT and in between. *Biochim Biophys Acta*. 2014 Mar;1842(3):358–69.
550. Seale P, Conroe HM, Estall J, Kajimura S, Frontini A, Ishibashi J, et al. Prdm16 determines the thermogenic program of subcutaneous white adipose tissue in mice. *J Clin Invest*. 2011 Jan;121(1):96–105.
551. Granneman JG, Burnazi M, Zhu Z, Schwamb LA. White adipose tissue contributes to UCP1-independent thermogenesis. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2003 Dec;285(6):E1230–1236.
552. Li P, Zhu Z, Lu Y, Granneman JG. Metabolic and cellular plasticity in white adipose tissue II: role of peroxisome proliferator-activated receptor- α . *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2005 Oct;289(4):E617–626.
553. Mottillo EP, Shen XJ, Granneman JG. Role of hormone-sensitive lipase in beta-adrenergic remodeling of white adipose tissue. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2007 Nov;293(5):E1188–1197.
554. Rim JS, Xue B, Gawronska-Kozak B, Kozak LP. Sequestration of Thermogenic Transcription Factors in the Cytoplasm during Development of Brown Adipose Tissue. *J Biol Chem*. 2004 Jun 11;279(24):25916–26.
555. Chang JS, Fernand V, Zhang Y, Shin J, Jun H-J, Joshi Y, et al. NT-PGC-1 α protein is sufficient to link β 3-adrenergic receptor activation to transcriptional and physiological components of adaptive thermogenesis. *J Biol Chem*. 2012 Mar 16;287(12):9100–11.
556. Uldry M, Yang W, St-Pierre J, Lin J, Seale P, Spiegelman BM. Complementary action of the PGC-1 coactivators in mitochondrial biogenesis and brown fat differentiation. *Cell Metab*. 2006 May;3(5):333–41.

557. Johann K, Cremer AL, Fischer AW, Heine M, Pensado ER, Resch J, et al. Thyroid-Hormone-Induced Browning of White Adipose Tissue Does Not Contribute to Thermogenesis and Glucose Consumption. *Cell Rep*. 2019 Jun 11;27(11):3385-3400.e3.
558. Iwen KA, Oelkrug R, Brabant G. Effects of thyroid hormones on thermogenesis and energy partitioning. *J Mol Endocrinol*. 2018 Apr 1;60(3):R157-70.
559. Fekete C, Lechan RM. Central Regulation of Hypothalamic-Pituitary-Thyroid Axis Under Physiological and Pathophysiological Conditions. *Endocr Rev*. 2014 Apr;35(2):159-94.
560. Pandit R, Beerens S, Adan R a. H. Role of leptin in energy expenditure: the hypothalamic perspective. *Am J Physiol-Regul Integr Comp Physiol*. 2017 Mar 29;312(6):R938-47.
561. Boström P, Wu J, Jedrychowski MP, Korde A, Ye L, Lo JC, et al. A PGC1- α -dependent myokine that drives brown-fat-like development of white fat and thermogenesis. *Nature*. 2012 Jan 11;481(7382):463-8.
562. Keipert S, Ost M, Johann K, Imber F, Jastroch M, van Schothorst EM, et al. Skeletal muscle mitochondrial uncoupling drives endocrine cross-talk through the induction of FGF21 as a myokine. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2014 Mar 1;306(5):E469-482.
563. Tezze C, Romanello V, Sandri M. FGF21 as Modulator of Metabolism in Health and Disease. *Front Physiol*. 2019 Apr 17;10. Available from:
564. Lee P, Brychta RJ, Linderman J, Smith S, Chen KY, Celi FS. Mild cold exposure modulates fibroblast growth factor 21 (FGF21) diurnal rhythm in humans: relationship between FGF21 levels, lipolysis, and cold-induced thermogenesis. *J Clin Endocrinol Metab*. 2013 Jan;98(1):E98-102.
565. Ge X, Chen C, Hui X, Wang Y, Lam KSL, Xu A. Fibroblast growth factor 21 induces glucose transporter-1 expression through activation of the serum response factor/Ets-like protein-1 in adipocytes. *J Biol Chem*. 2011 Oct 7;286(40):34533-41.
566. Moyers JS, Shiyanova TL, Mehrbod F, Dunbar JD, Noblitt TW, Otto KA, et al. Molecular determinants of FGF-21 activity-synergy and cross-talk with PPAR γ signaling. *J Cell Physiol*. 2007 Jan;210(1):1-6.
567. Dharmalingam M, Yamasandhi PG. Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Type 2 Diabetes Mellitus. *Indian J Endocrinol Metab*. 2018;22(3):421-8.
568. Reeves HL, Zaki MYW, Day CP. Hepatocellular Carcinoma in Obesity, Type 2 Diabetes, and NAFLD. *Dig Dis Sci*. 2016 May 1;61(5):1234-45.
569. Cade WT. Diabetes-Related Microvascular and Macrovascular Diseases in the Physical Therapy Setting. *Phys Ther*. 2008 Nov;88(11):1322-35.
570. Bianchini F, Kaaks R, Vainio H. Overweight, obesity, and cancer risk. *Lancet Oncol*. 2002 Sep 1;3(9):565-74.
571. Szoke E, Gerich JE. Role of impaired insulin secretion and insulin resistance in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Compr Ther*. 2005;31(2):106-12.
572. Krssak M, Falk Petersen K, Dresner A, DiPietro L, Vogel SM, Rothman DL, et al. Intramyocellular lipid concentrations are correlated with insulin sensitivity in humans: a ¹H NMR spectroscopy study. *Diabetologia*. 1999 Jan;42(1):113-6.
573. Goudriaan JR, Dahlmans VEH, Teusink B, Ouwens DM, Febbraio M, Maassen JA, et al. CD36 deficiency increases insulin sensitivity in muscle, but induces insulin resistance in the liver in mice. *J Lipid Res*. 2003 Dec;44(12):2270-7.
574. Kim JK, Fillmore JJ, Sunshine MJ, Albrecht B, Higashimori T, Kim D-W, et al. PKC- θ knockout mice are protected from fat-induced insulin resistance. *J Clin Invest*. 2004 Sep;114(6):823-7.

575. Hoeks J, Schrauwen P. Muscle mitochondria and insulin resistance: a human perspective. *Trends Endocrinol Metab*. 2012 Sep;23(9):444–50.
576. Kim JY, Hickner RC, Cortright RL, Dohm GL, Houmard JA. Lipid oxidation is reduced in obese human skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2000 Nov;279(5):E1039-1044.
577. Lowell BB, Shulman GI. Mitochondrial dysfunction and type 2 diabetes. *Science*. 2005 Jan 21;307(5708):384–7.
578. Sparks LM, Xie H, Koza RA, Mynatt R, Hulver MW, Bray GA, et al. A high-fat diet coordinately downregulates genes required for mitochondrial oxidative phosphorylation in skeletal muscle. *Diabetes*. 2005 Jul;54(7):1926–33.
579. Björnholm M, Zierath JR. Insulin signal transduction in human skeletal muscle: identifying the defects in Type II diabetes. *Biochem Soc Trans*. 2005 Apr;33(Pt 2):354–7.
580. Cusi K, Maezono K, Osman A, Pendergrass M, Patti ME, Pratipanawatr T, et al. Insulin resistance differentially affects the PI 3-kinase- and MAP kinase-mediated signaling in human muscle. *J Clin Invest*. 2000 Feb;105(3):311–20.
581. Danielsson A, Ost A, Lystedt E, Kjolhede P, Gustavsson J, Nystrom FH, et al. Insulin resistance in human adipocytes occurs downstream of IRS1 after surgical cell isolation but at the level of phosphorylation of IRS1 in type 2 diabetes. *FEBS J*. 2005 Jan;272(1):141–51.
582. Goodyear LJ, Giorgino F, Sherman LA, Carey J, Smith RJ, Dohm GL. Insulin receptor phosphorylation, insulin receptor substrate-1 phosphorylation, and phosphatidylinositol 3-kinase activity are decreased in intact skeletal muscle strips from obese subjects. *J Clin Invest*. 1995 May;95(5):2195–204.
583. Samuel VT, Shulman GI. Mechanisms for insulin resistance: common threads and missing links. *Cell*. 2012 Mar 2;148(5):852–71.
584. Vollenweider P, Ménard B, Nicod P. Insulin resistance, defective insulin receptor substrate 2-associated phosphatidylinositol-3' kinase activation, and impaired atypical protein kinase C (zeta/lambda) activation in myotubes from obese patients with impaired glucose tolerance. *Diabetes*. 2002 Apr;51(4):1052–9.
585. Schmitz-Peiffer C, Biden TJ. Protein kinase C function in muscle, liver, and beta-cells and its therapeutic implications for type 2 diabetes. *Diabetes*. 2008 Jul;57(7):1774–83.
586. Samuel VT, Liu Z-X, Qu X, Elder BD, Bilz S, Befroy D, et al. Mechanism of hepatic insulin resistance in non-alcoholic fatty liver disease. *J Biol Chem*. 2004 Jul 30;279(31):32345–53.
587. Kumashiro N, Erion DM, Zhang D, Kahn M, Beddow SA, Chu X, et al. Cellular mechanism of insulin resistance in nonalcoholic fatty liver disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 Sep 27;108(39):16381–5.
588. Holland WL, Brozinick JT, Wang L-P, Hawkins ED, Sargent KM, Liu Y, et al. Inhibition of ceramide synthesis ameliorates glucocorticoid-, saturated-fat-, and obesity-induced insulin resistance. *Cell Metab*. 2007 Mar;5(3):167–79.
589. Ussher JR, Koves TR, Cadete VJJ, Zhang L, Jaswal JS, Swyrd SJ, et al. Inhibition of De Novo Ceramide Synthesis Reverses Diet-Induced Insulin Resistance and Enhances Whole-Body Oxygen Consumption. *Diabetes*. 2010 Oct;59(10):2453–64.
590. Cersosimo E, Triplitt C, Solis-Herrera C, Mandarino LJ, DeFronzo RA. Pathogenesis of Type 2 Diabetes Mellitus. In: Feingold KR, Anawalt B, Boyce A, Chrousos G, Dungan K, Grossman A, et al., editors. *Endotext*. South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc.; 2000.
591. Kelley D, Mitrakou A, Marsh H, Schwenk F, Benn J, Sonnenberg G, et al. Skeletal muscle glycolysis, oxidation, and storage of an oral glucose load. *J Clin Invest*. 1988 May;81(5):1563–71.

592. Cline GW, Petersen KF, Krssak M, Shen J, Hundal RS, Trajanoski Z, et al. Impaired glucose transport as a cause of decreased insulin-stimulated muscle glycogen synthesis in type 2 diabetes. *N Engl J Med.* 1999 Jul 22;341(4):240–6.
593. Garvey WT, Maianu L, Zhu JH, Brechtel-Hook G, Wallace P, Baron AD. Evidence for defects in the trafficking and translocation of GLUT4 glucose transporters in skeletal muscle as a cause of human insulin resistance. *J Clin Invest.* 1998 Jun 1;101(11):2377–86.
594. Shulman GI, Rothman DL, Jue T, Stein P, DeFronzo RA, Shulman RG. Quantitation of muscle glycogen synthesis in normal subjects and subjects with non-insulin-dependent diabetes by ¹³C nuclear magnetic resonance spectroscopy. *N Engl J Med.* 1990 Jan 25;322(4):223–8.
595. Zierath JR, He L, Gumà A, Odegaard Wahlström E, Klip A, Wallberg-Henriksson H. Insulin action on glucose transport and plasma membrane GLUT4 content in skeletal muscle from patients with NIDDM. *Diabetologia.* 1996 Oct;39(10):1180–9.
596. Consoli A, Nurjhan N, Reilly JJ, Bier DM, Gerich JE. Mechanism of increased gluconeogenesis in noninsulin-dependent diabetes mellitus. Role of alterations in systemic, hepatic, and muscle lactate and alanine metabolism. *J Clin Invest.* 1990 Dec;86(6):2038–45.
597. Ferrannini E, Barrett EJ, Bevilacqua S, DeFronzo RA. Effect of fatty acids on glucose production and utilization in man. *J Clin Invest.* 1983 Nov;72(5):1737–47.
598. Lam TKT, Carpentier A, Lewis GF, van de Werve G, Fantus IG, Giacca A. Mechanisms of the free fatty acid-induced increase in hepatic glucose production. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2003 May;284(5):E863-873.
599. Nurjhan N, Consoli A, Gerich J. Increased lipolysis and its consequences on gluconeogenesis in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Invest.* 1992 Jan;89(1):169–75.
600. Roden M, Stingl H, Chandramouli V, Schumann WC, Hofer A, Landau BR, et al. Effects of free fatty acid elevation on postabsorptive endogenous glucose production and gluconeogenesis in humans. *Diabetes.* 2000 May;49(5):701–7.
601. Stumvoll M, Perriello G, Nurjhan N, Bucci A, Welle S, Jansson PA, et al. Glutamine and alanine metabolism in NIDDM. *Diabetes.* 1996 Jul;45(7):863–8.
602. Cao H, van der Veer E, Ban MR, Hanley AJG, Zinman B, Harris SB, et al. Promoter polymorphism in PCK1 (phosphoenolpyruvate carboxykinase gene) associated with type 2 diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004 Feb;89(2):898–903.
603. Clore JN, Stillman J, Sugerma H. Glucose-6-phosphatase flux in vitro is increased in type 2 diabetes. *Diabetes.* 2000 Jun;49(6):969–74.
604. Krssak M, Brehm A, Bernroider E, Anderwald C, Nowotny P, Dalla Man C, et al. Alterations in postprandial hepatic glycogen metabolism in type 2 diabetes. *Diabetes.* 2004 Dec;53(12):3048–56.
605. Magnusson I, Rothman DL, Katz LD, Shulman RG, Shulman GI. Increased rate of gluconeogenesis in type II diabetes mellitus. A ¹³C nuclear magnetic resonance study. *J Clin Invest.* 1992 Oct;90(4):1323–7.
606. Trinh KY, O'Doherty RM, Anderson P, Lange AJ, Newgard CB. Perturbation of Fuel Homeostasis Caused by Overexpression of the Glucose-6-phosphatase Catalytic Subunit in Liver of Normal Rats. *J Biol Chem.* 1998 Nov 20;273(47):31615–20.
607. De Souza CT, Frederico MJS, da Luz G, Cintra DE, Ropelle ER, Pauli JR, et al. Acute exercise reduces hepatic glucose production through inhibition of the Foxo1/HNF-4 α pathway in insulin resistant mice. *J Physiol.* 2010 Jun 15;588(Pt 12):2239–53.

608. Abdul-Wahed A, Gautier-Stein A, Casteras S, Soty M, Roussel D, Romestaing C, et al. A link between hepatic glucose production and peripheral energy metabolism via hepatokines. *Mol Metab.* 2014 Aug;3(5):531–43.
609. Mårin P, Högh-Kristiansen I, Jansson S, Krotkiewski M, Holm G, Björntorp P. Uptake of glucose carbon in muscle glycogen and adipose tissue triglycerides in vivo in humans. *Am J Physiol.* 1992 Sep;263(3 Pt 1):E473-480.
610. Hogue J-C, Lamarche B, Tremblay AJ, Bergeron J, Gagné C, Couture P. Evidence of increased secretion of apolipoprotein B-48-containing lipoproteins in subjects with type 2 diabetes. *J Lipid Res.* 2007 Jun;48(6):1336–42.
611. Phillips C, Mullan K, Owens D, Tomkin GH. Intestinal microsomal triglyceride transfer protein in type 2 diabetic and non-diabetic subjects: the relationship to triglyceride-rich postprandial lipoprotein composition. *Atherosclerosis.* 2006 Jul;187(1):57–64.
612. Shojaee-Moradie F, Ma Y, Lou S, Hovorka R, Umpleby AM. Prandial Hypertriglyceridemia in Metabolic Syndrome Is Due to an Overproduction of Both Chylomicron and VLDL Triacylglycerol. *Diabetes.* 2013 Dec;62(12):4063–9.
613. Delarue J, Magnan C. Free fatty acids and insulin resistance. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2007 Mar;10(2):142–8.
614. Hazlehurst JM, Woods C, Marjot T, Cobbold JF, Tomlinson JW. Non-alcoholic fatty liver disease and diabetes. *Metabolism.* 2016 Aug;65(8):1096–108.
615. Williamson RM, Price JF, Glancy S, Perry E, Nee LD, Hayes PC, et al. Prevalence of and risk factors for hepatic steatosis and nonalcoholic Fatty liver disease in people with type 2 diabetes: the Edinburgh Type 2 Diabetes Study. *Diabetes Care.* 2011 May;34(5):1139–44.
616. Gjorgjieva M, Mithieux G, Rajas F. Hepatic stress associated with pathologies characterized by disturbed glucose production. *Cell Stress.* 2019 Jan 28;3(3):86–99.
617. Donnelly KL, Smith CI, Schwarzenberg SJ, Jessurun J, Boldt MD, Parks EJ. Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Invest.* 2005 May;115(5):1343–51.
618. Black PN, Ahowesso C, Montefusco D, Saini N, DiRusso CC. Fatty Acid Transport Proteins: Targeting FATP2 as a Gatekeeper Involved in the Transport of Exogenous Fatty Acids. *MedChemComm.* 2016 Apr 1;7(4):612–22.
619. Mota M, Banini BA, Cazanave SC, Sanyal AJ. Molecular Mechanisms of Lipotoxicity and Glucotoxicity in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Metabolism.* 2016 Aug;65(8):1049–61.
620. Stremmel W, Staffer S, Wannhoff A, Pathil A, Chamulitrat W. Plasma membrane phospholipase A2 controls hepatocellular fatty acid uptake and is responsive to pharmacological modulation: implications for nonalcoholic steatohepatitis. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol.* 2014 Jul;28(7):3159–70.
621. Pan X, Wang P, Luo J, Wang Z, Song Y, Ye J, et al. Adipogenic changes of hepatocytes in a high-fat diet-induced fatty liver mice model and non-alcoholic fatty liver disease patients. *Endocrine.* 2015 Apr;48(3):834–47.
622. Ferré P, Foufelle F. Hepatic steatosis: a role for de novo lipogenesis and the transcription factor SREBP-1c. *Diabetes Obes Metab.* 2010 Oct;12 Suppl 2:83–92.
623. Schwarz J-M, Linfoot P, Dare D, Aghajanian K. Hepatic de novo lipogenesis in normoinsulinemic and hyperinsulinemic subjects consuming high-fat, low-carbohydrate and low-fat, high-carbohydrate isoenergetic diets. *Am J Clin Nutr.* 2003 Jan;77(1):43–50.

624. Brown MS, Goldstein JL. Selective versus total insulin resistance: a pathogenic paradox. *Cell Metab.* 2008 Feb;7(2):95–6.
625. Shimomura I, Bashmakov Y, Ikemoto S, Horton JD, Brown MS, Goldstein JL. Insulin selectively increases SREBP-1c mRNA in the livers of rats with streptozotocin-induced diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999 Nov 23;96(24):13656–61.
626. Shimomura I, Matsuda M, Hammer RE, Bashmakov Y, Brown MS, Goldstein JL. Decreased IRS-2 and increased SREBP-1c lead to mixed insulin resistance and sensitivity in livers of lipodystrophic and ob/ob mice. *Mol Cell.* 2000 Jul;6(1):77–86.
627. Titchenell PM, Quinn WJ, Lu M, Chu Q, Lu W, Li C, et al. Direct Hepatocyte Insulin Signaling Is Required for Lipogenesis but Is Dispensable for the Suppression of Glucose Production. *Cell Metab.* 2016 Jun 14;23(6):1154–66.
628. Honma M, Sawada S, Ueno Y, Murakami K, Yamada T, Gao J, et al. Selective insulin resistance with differential expressions of IRS-1 and IRS-2 in human NAFLD livers. *Int J Obes* 2005. 2018;42(9):1544–55.
629. Matsumoto M, Ogawa W, Teshigawara K, Inoue H, Miyake K, Sakaue H, et al. Role of the insulin receptor substrate 1 and phosphatidylinositol 3-kinase signaling pathway in insulin-induced expression of sterol regulatory element binding protein 1c and glucokinase genes in rat hepatocytes. *Diabetes.* 2002 Jun;51(6):1672–80.
630. Porstmann T, Santos CR, Griffiths B, Cully M, Wu M, Leever S, et al. SREBP activity is regulated by mTORC1 and contributes to Akt-dependent cell growth. *Cell Metab.* 2008 Sep;8(3):224–36.
631. Li S, Brown MS, Goldstein JL. Bifurcation of insulin signaling pathway in rat liver: mTORC1 required for stimulation of lipogenesis, but not inhibition of gluconeogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010 Feb 23;107(8):3441–6.
632. Ståhlman M, Pham HT, Adiels M, Mitchell TW, Blanksby SJ, Fagerberg B, et al. Clinical dyslipidaemia is associated with changes in the lipid composition and inflammatory properties of apolipoprotein-B-containing lipoproteins from women with type 2 diabetes. *Diabetologia.* 2012 Apr;55(4):1156–66.
633. Hyysalo J, Gopalacharyulu P, Bian H, Hyötyläinen T, Leivonen M, Jaser N, et al. Circulating triacylglycerol signatures in nonalcoholic fatty liver disease associated with the I148M variant in PNPLA3 and with obesity. *Diabetes.* 2014 Jan;63(1):312–22.
634. An J, Muoio DM, Shiota M, Fujimoto Y, Cline GW, Shulman GI, et al. Hepatic expression of malonyl-CoA decarboxylase reverses muscle, liver and whole-animal insulin resistance. *Nat Med.* 2004 Mar;10(3):268–74.
635. Dentin R, Benhamed F, Hainault I, Fauveau V, Foufelle F, Dyck JRB, et al. Liver-specific inhibition of ChREBP improves hepatic steatosis and insulin resistance in ob/ob mice. *Diabetes.* 2006 Aug;55(8):2159–70.
636. Savage DB, Choi CS, Samuel VT, Liu Z-X, Zhang D, Wang A, et al. Reversal of diet-induced hepatic steatosis and hepatic insulin resistance by antisense oligonucleotide inhibitors of acetyl-CoA carboxylases 1 and 2. *J Clin Invest.* 2006 Mar;116(3):817–24.
637. Minehira K, Young SG, Villanueva CJ, Yetukuri L, Oresic M, Hellerstein MK, et al. Blocking VLDL secretion causes hepatic steatosis but does not affect peripheral lipid stores or insulin sensitivity in mice. *J Lipid Res.* 2008 Sep;49(9):2038–44.
638. Benhamed F, Denechaud P-D, Lemoine M, Robichon C, Moldes M, Bertrand-Michel J, et al. The lipogenic transcription factor ChREBP dissociates hepatic steatosis from insulin resistance in mice and humans. *J Clin Invest.* 2012 Jun 1;122(6):2176–94.

639. Ramamonjisoa N, Ratiney H, Mutel E, Guillou H, Mithieux G, Pilleul F, et al. In vivo hepatic lipid quantification using MRS at 7 Tesla in a mouse model of glycogen storage disease type 1a. *J Lipid Res.* 2013 Jul;54(7):2010–22.
640. Yamaguchi K, Yang L, McCall S, Huang J, Yu XX, Pandey SK, et al. Inhibiting triglyceride synthesis improves hepatic steatosis but exacerbates liver damage and fibrosis in obese mice with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology*. 2007 Jun;45(6):1366–74.
641. Brunt EM. Nonalcoholic steatohepatitis: definition and pathology. *Semin Liver Dis.* 2001;21(1):3–16.
642. Mendez-Sanchez N, Cruz-Ramon VC, Ramirez-Perez OL, Hwang JP, Barranco-Fragoso B, Cordova-Gallardo J. New Aspects of Lipotoxicity in Nonalcoholic Steatohepatitis. *Int J Mol Sci.* 2018 Jul 13 ;19(7).
643. Ricchi M, Odoardi MR, Carulli L, Anzivino C, Ballestri S, Pinetti A, et al. Differential effect of oleic and palmitic acid on lipid accumulation and apoptosis in cultured hepatocytes. *J Gastroenterol Hepatol.* 2009 May;24(5):830–40.
644. Kakisaka K, Cazanave SC, Fingas CD, Guicciardi ME, Bronk SF, Werneburg NW, et al. Mechanisms of lysophosphatidylcholine-induced hepatocyte lipoapoptosis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2012 Jan 1;302(1):G77-84.
645. Lauber K, Bohn E, Kröber SM, Xiao Y, Blumenthal SG, Lindemann RK, et al. Apoptotic cells induce migration of phagocytes via caspase-3-mediated release of a lipid attraction signal. *Cell.* 2003 Jun 13;113(6):717–30.
646. Listenberger LL, Han X, Lewis SE, Cases S, Farese RV, Ory DS, et al. Triglyceride accumulation protects against fatty acid-induced lipotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003 Mar 18;100(6):3077–82.
647. Han MS, Park SY, Shinzawa K, Kim S, Chung KW, Lee J-H, et al. Lysophosphatidylcholine as a death effector in the lipoapoptosis of hepatocytes. *J Lipid Res.* 2008 Jan;49(1):84–97.
648. Pathil A, Mueller J, Warth A, Chamulitrat W, Stremmel W. Ursodeoxycholyly lysophosphatidylethanolamide improves steatosis and inflammation in murine models of nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. 2012 May;55(5):1369–78.
649. Yaligar J, Gopalan V, Kiat OW, Sugii S, Shui G, Lam BD, et al. Evaluation of dietary effects on hepatic lipids in high fat and placebo diet fed rats by in vivo MRS and LC-MS techniques. *PloS One.* 2014;9(3):e91436.
650. Chavez JA, Siddique MM, Wang ST, Ching J, Shayman JA, Summers SA. Ceramides and glucosylceramides are independent antagonists of insulin signaling. *J Biol Chem.* 2014 Jan 10;289(2):723–34.
651. Pagadala M, Kasumov T, McCullough AJ, Zein NN, Kirwan JP. Role of ceramides in nonalcoholic fatty liver disease. *Trends Endocrinol Metab.* 2012 Aug;23(8):365–71.
652. Schwabe RF, Brenner DA. Mechanisms of Liver Injury. I. TNF- α -induced liver injury: role of IKK, JNK, and ROS pathways. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2006 Apr;290(4):G583-589.
653. Anjani K, Lhomme M, Sokolovska N, Poitou C, Aron-Wisnewsky J, Bouillot J-L, et al. Circulating phospholipid profiling identifies portal contribution to NASH signature in obesity. *J Hepatol.* 2015 Apr;62(4):905–12.
654. Arguello G, Balboa E, Arrese M, Zanlungo S. Recent insights on the role of cholesterol in non-alcoholic fatty liver disease. *Biochim Biophys Acta.* 2015 Sep;1852(9):1765–78.
655. Gan LT, Van Rooyen DM, Koina ME, McCuskey RS, Teoh NC, Farrell GC. Hepatocyte free cholesterol lipotoxicity results from JNK1-mediated mitochondrial injury and is HMGB1 and TLR4-dependent. *J Hepatol.* 2014 Dec;61(6):1376–84.

656. Pagliassotti MJ, Prach PA, Koppenhafer TA, Pan DA. Changes in insulin action, triglycerides, and lipid composition during sucrose feeding in rats. *Am J Physiol*. 1996 Nov;271(5 Pt 2):R1319-1326.
657. Thresher JS, Podolin DA, Wei Y, Mazzeo RS, Pagliassotti MJ. Comparison of the effects of sucrose and fructose on insulin action and glucose tolerance. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2000 Oct;279(4):R1334-1340.
658. Mozzini C, Garbin U, Stranieri C, Pasini A, Solani E, Tinelli IA, et al. Endoplasmic reticulum stress and Nrf2 repression in circulating cells of type 2 diabetic patients without the recommended glycemic goals. *Free Radic Res*. 2015 Mar;49(3):244-52.
659. Wei Y, Pagliassotti MJ. Hepatospecific effects of fructose on c-jun NH2-terminal kinase: implications for hepatic insulin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2004 Nov;287(5):E926-933.
660. Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM. Adipose expression of tumor necrosis factor- α : direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science*. 1993 Jan 1;259(5091):87-91.
661. Sun K, Kusminski CM, Scherer PE. Adipose tissue remodeling and obesity. *J Clin Invest*. 2011 Jun;121(6):2094-101.
662. Xu H, Barnes GT, Yang Q, Tan G, Yang D, Chou CJ, et al. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J Clin Invest*. 2003 Dec 15;112(12):1821-30.
663. Cinti S, Mitchell G, Barbatelli G, Murano I, Ceresi E, Faloia E, et al. Adipocyte death defines macrophage localization and function in adipose tissue of obese mice and humans. *J Lipid Res*. 2005 Nov;46(11):2347-55.
664. Lumeng CN, Deyoung SM, Bodzin JL, Saltiel AR. Increased inflammatory properties of adipose tissue macrophages recruited during diet-induced obesity. *Diabetes*. 2007 Jan;56(1):16-23.
665. Strissel KJ, Stancheva Z, Miyoshi H, Perfield JW, DeFuria J, Jick Z, et al. Adipocyte death, adipose tissue remodeling, and obesity complications. *Diabetes*. 2007 Dec;56(12):2910-8.
666. Curat CA, Miranville A, Sengenès C, Diehl M, Tonus C, Busse R, et al. From blood monocytes to adipose tissue-resident macrophages: induction of diapedesis by human mature adipocytes. *Diabetes*. 2004 May;53(5):1285-92.
667. Gruen ML, Hao M, Piston DW, Hasty AH. Leptin requires canonical migratory signaling pathways for induction of monocyte and macrophage chemotaxis. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2007 Nov;293(5):C1481-1488.
668. Fujisaka S, Usui I, Iktani M, Aminuddin A, Takikawa A, Tsuneyama K, et al. Adipose tissue hypoxia induces inflammatory M1 polarity of macrophages in an HIF-1 α -dependent and HIF-1 α -independent manner in obese mice. *Diabetologia*. 2013 Jun;56(6):1403-12.
669. Kosteli A, Sugaru E, Haemmerle G, Martin JF, Lei J, Zechner R, et al. Weight loss and lipolysis promote a dynamic immune response in murine adipose tissue. *J Clin Invest*. 2010 Oct;120(10):3466-79.
670. Alemany M. Regulation of adipose tissue energy availability through blood flow control in the metabolic syndrome. *Free Radic Biol Med*. 2012 May 15;52(10):2108-19.
671. Sabater D, Arriarán S, Romero M del M, Agnelli S, Remesar X, Fernández-López JA, et al. Cultured 3T3L1 adipocytes dispose of excess medium glucose as lactate under abundant oxygen availability. *Sci Rep*. 2014 Jan 13;4:3663.
672. Rhee Y-H, Moon JH, Mo J-H, Pham T, Chung P-S. mTOR and ROS regulation by anethole on adipogenic differentiation in human mesenchymal stem cells. *BMC Cell Biol*. 2018 Jul 6;19.
673. Zhang Y, Marsboom G, Toth PT, Rehman J. Mitochondrial respiration regulates adipogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *PLoS One*. 2013;8(10):e77077.

674. Kershaw EE, Flier JS. Adipose tissue as an endocrine organ. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004 Jun;89(6):2548–56.
675. Koh EH, Park J-Y, Park H-S, Jeon MJ, Ryu JW, Kim M, et al. Essential role of mitochondrial function in adiponectin synthesis in adipocytes. *Diabetes.* 2007 Dec;56(12):2973–81.
676. Keuper M. On the role of macrophages in the control of adipocyte energy metabolism. *Endocr Connect.* 2019 May 14;8(6):R105–21.
677. Sörbris R, Nilsson-Ehle P, Monti M, Wadsö I. Differences in heat production between adipocytes from obese and normal weight individuals. *FEBS Lett.* 1979 May 15;101(2):411–4.
678. Yehuda-Shnaidman E, Buehrer B, Pi J, Kumar N, Collins S. Acute stimulation of white adipocyte respiration by PKA-induced lipolysis. *Diabetes.* 2010 Oct;59(10):2474–83.
679. Woo CY, Jang JE, Lee SE, Koh EH, Lee KU. Mitochondrial Dysfunction in Adipocytes as a Primary Cause of Adipose Tissue Inflammation. *Diabetes Metab J.* 2019;43(3):247–56.
680. Achari AE, Jain SK. Adiponectin, a Therapeutic Target for Obesity, Diabetes, and Endothelial Dysfunction. *Int J Mol Sci.* 2017 Jun 21;18(6).
681. Pajvani UB, Hawkins M, Combs TP, Rajala MW, Doebber T, Berger JP, et al. Complex distribution, not absolute amount of adiponectin, correlates with thiazolidinedione-mediated improvement in insulin sensitivity. *J Biol Chem.* 2004 Mar 26;279(13):12152–62.
682. Fruebis J, Tsao TS, Javorschi S, Ebbets-Reed D, Erickson MR, Yen FT, et al. Proteolytic cleavage product of 30-kDa adipocyte complement-related protein increases fatty acid oxidation in muscle and causes weight loss in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001 Feb 13;98(4):2005–10.
683. Jung UJ, Choi M-S. Obesity and Its Metabolic Complications: The Role of Adipokines and the Relationship between Obesity, Inflammation, Insulin Resistance, Dyslipidemia and Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Int J Mol Sci.* 2014 Apr 11;15(4):6184–223.
684. Ceperuelo-Mallafre V, Ejarque M, Serena C, Duran X, Montori-Grau M, Rodríguez MA, et al. Adipose tissue glycogen accumulation is associated with obesity-linked inflammation in humans. *Mol Metab.* 2016 Jan;5(1):5–18.
685. Chun T-H, Hotary KB, Sabeh F, Saltiel AR, Allen ED, Weiss SJ. A pericellular collagenase directs the 3-dimensional development of white adipose tissue. *Cell.* 2006 May 5;125(3):577–91.
686. Khan T, Muise ES, Iyengar P, Wang ZV, Chandalia M, Abate N, et al. Metabolic Dysregulation and Adipose Tissue Fibrosis: Role of Collagen VI. *Mol Cell Biol.* 2009 Mar;29(6):1575–91.
687. O'Hara A, Lim F-L, Mazzatti DJ, Trayhurn P. Microarray analysis identifies matrix metalloproteinases (MMPs) as key genes whose expression is up-regulated in human adipocytes by macrophage-conditioned medium. *Pflugers Arch.* 2009 Oct;458(6):1103–14.
688. Berria R, Wang L, Richardson DK, Finlayson J, Belfort R, Pratipanawatr T, et al. Increased collagen content in insulin-resistant skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2006 Mar;290(3):E560-565.
689. Muona P, Jaakkola S, Zhang RZ, Pan TC, Pelliniemi L, Risteli L, et al. Hyperglycemic glucose concentrations up-regulate the expression of type VI collagen in vitro. Relevance to alterations of peripheral nerves in diabetes mellitus. *Am J Pathol.* 1993 May;142(5):1586–97.
690. Cinti S. Transdifferentiation properties of adipocytes in the adipose organ. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2009 Nov;297(5):E977-986.
691. Giordano A, Smorlesi A, Frontini A, Barbatelli G, Cinti S. White, brown and pink adipocytes: the extraordinary plasticity of the adipose organ. *Eur J Endocrinol.* 2014 May;170(5):R159-171.

692. Kotzbeck P, Giordano A, Mondini E, Murano I, Severi I, Venema W, et al. Brown adipose tissue whitening leads to brown adipocyte death and adipose tissue inflammation. *J Lipid Res.* 2018 May;59(5):784–94.
693. Cencello R, Zingaretti MC, Sarzani R, Ricquier D, Cinti S. Leptin and UCP1 genes are reciprocally regulated in brown adipose tissue. *Endocrinology.* 1998 Nov;139(11):4747–50.
694. Cinti S, Frederich RC, Zingaretti MC, De Matteis R, Flier JS, Lowell BB. Immunohistochemical localization of leptin and uncoupling protein in white and brown adipose tissue. *Endocrinology.* 1997 Feb;138(2):797–804.
695. Yang X, Enerbäck S, Smith U. Reduced expression of FOXC2 and brown adipogenic genes in human subjects with insulin resistance. *Obes Res.* 2003 Oct;11(10):1182–91.
696. Kopecky J, Clarke G, Enerbäck S, Spiegelman B, Kozak LP. Expression of the mitochondrial uncoupling protein gene from the aP2 gene promoter prevents genetic obesity. *J Clin Invest.* 1995 Dec;96(6):2914–23.
697. Cavaghan MK, Ehrmann DA, Polonsky KS. Interactions between insulin resistance and insulin secretion in the development of glucose intolerance. *J Clin Invest.* 2000 Aug 1;106(3):329–33.
698. Polonsky KS, Given BD, Hirsch L, Shapiro ET, Tillil H, Beebe C, et al. Quantitative study of insulin secretion and clearance in normal and obese subjects. *J Clin Invest.* 1988 Feb;81(2):435–41.
699. Kahn SE, Prigeon RL, McCulloch DK, Boyko EJ, Bergman RN, Schwartz MW, et al. Quantification of the relationship between insulin sensitivity and beta-cell function in human subjects. Evidence for a hyperbolic function. *Diabetes.* 1993 Nov;42(11):1663–72.
700. Weyer C, Bogardus C, Mott DM, Pratley RE. The natural history of insulin secretory dysfunction and insulin resistance in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *J Clin Invest.* 1999 Sep 15;104(6):787–94.
701. Del Prato S, Marchetti P, Bonadonna RC. Phasic insulin release and metabolic regulation in type 2 diabetes. *Diabetes.* 2002 Feb;51 Suppl 1:S109-116.
702. Prentki M, Nolan CJ. Islet beta cell failure in type 2 diabetes. *J Clin Invest.* 2006 Jul;116(7):1802–12.
703. Cryer PE. Minireview: Glucagon in the pathogenesis of hypoglycemia and hyperglycemia in diabetes. *Endocrinology.* 2012 Mar;153(3):1039–48.
704. Dunning BE, Gerich JE. The role of alpha-cell dysregulation in fasting and postprandial hyperglycemia in type 2 diabetes and therapeutic implications. *Endocr Rev.* 2007 May;28(3):253–83.
705. Cerasi E, Neshler R, Gadot M, Gross D, Kaiser N. Insulin secretion in obese and non-obese NIDDM. *Diabetes Res Clin Pract.* 1995 Aug;28 Suppl:S27-37.
706. Reaven GM. Compensatory hyperinsulinemia and the development of an atherogenic lipoprotein profile: the price paid to maintain glucose homeostasis in insulin-resistant individuals. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2005 Mar;34(1):49–62.
707. Butler AE, Janson J, Bonner-Weir S, Ritzel R, Rizza RA, Butler PC. Beta-cell deficit and increased beta-cell apoptosis in humans with type 2 diabetes. *Diabetes.* 2003 Jan;52(1):102–10.
708. Del Guerra S, Lupi R, Marselli L, Masini M, Bugliani M, Sbrana S, et al. Functional and molecular defects of pancreatic islets in human type 2 diabetes. *Diabetes.* 2005 Mar;54(3):727–35.
709. Hotamisligil GS. Endoplasmic reticulum stress and the inflammatory basis of metabolic disease. *Cell.* 2010 Mar 19;140(6):900–17.
710. Johnson EL. Glycemic variability in type 2 diabetes mellitus: oxidative stress and macrovascular complications. *Adv Exp Med Biol.* 2012;771:139–54.

711. Ozcan U, Cao Q, Yilmaz E, Lee A-H, Iwakoshi NN, Ozdelen E, et al. Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes. *Science*. 2004 Oct 15;306(5695):457–61.
712. Marchetti P, Bugliani M, Lupi R, Marselli L, Masini M, Boggi U, et al. The endoplasmic reticulum in pancreatic beta cells of type 2 diabetes patients. *Diabetologia*. 2007 Dec;50(12):2486–94.
713. Newsholme P, Haber EP, Hirabara SM, Rebelato ELO, Procopio J, Morgan D, et al. Diabetes associated cell stress and dysfunction: role of mitochondrial and non-mitochondrial ROS production and activity. *J Physiol*. 2007 Aug 15;583(Pt 1):9–24.
714. Del Guerra S, Grupillo M, Masini M, Lupi R, Bugliani M, Torri S, et al. Gliclazide protects human islet beta-cells from apoptosis induced by intermittent high glucose. *Diabetes Metab Res Rev*. 2007 Mar;23(3):234–8.
715. Masini M, Anello M, Bugliani M, Marselli L, Filipponi F, Boggi U, et al. Prevention by metformin of alterations induced by chronic exposure to high glucose in human islet beta cells is associated with preserved ATP/ADP ratio. *Diabetes Res Clin Pract*. 2014 Apr;104(1):163–70.
716. Bernardi P, Rasola A. Calcium and cell death: the mitochondrial connection. *Subcell Biochem*. 2007;45:481–506.
717. El-Assaad W, Buteau J, Peyot M-L, Nolan C, Roduit R, Hardy S, et al. Saturated fatty acids synergize with elevated glucose to cause pancreatic beta-cell death. *Endocrinology*. 2003 Sep;144(9):4154–63.
718. Maedler K, Spinas GA, Dyntar D, Moritz W, Kaiser N, Donath MY. Distinct effects of saturated and monounsaturated fatty acids on beta-cell turnover and function. *Diabetes*. 2001 Jan;50(1):69–76.
719. Maedler K, Oberholzer J, Bucher P, Spinas GA, Donath MY. Monounsaturated fatty acids prevent the deleterious effects of palmitate and high glucose on human pancreatic beta-cell turnover and function. *Diabetes*. 2003 Mar;52(3):726–33.
720. Robertson RP, Harmon J, Tran POT, Poitout V. β -Cell Glucose Toxicity, Lipotoxicity, and Chronic Oxidative Stress in Type 2 Diabetes. *Diabetes*. 2004 Feb 1;53(suppl 1):S119–24.
721. Ježek P, Jabůrek M, Holendová B, Plecítá-Hlavatá L. Fatty Acid-Stimulated Insulin Secretion vs. Lipotoxicity. *Mol J Synth Chem Nat Prod Chem*. 2018 Jun 19;23(6).
722. Dunmore SJ, Brown JEP. The role of adipokines in β -cell failure of type 2 diabetes. *J Endocrinol*. 2013 Jan;216(1):T37–45.
723. Laubner K, Kieffer TJ, Lam NT, Niu X, Jakob F, Seufert J. Inhibition of preproinsulin gene expression by leptin induction of suppressor of cytokine signaling 3 in pancreatic beta-cells. *Diabetes*. 2005 Dec;54(12):3410–7.
724. Arita Y, Kihara S, Ouchi N, Takahashi M, Maeda K, Miyagawa J, et al. Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999 Apr 2;257(1):79–83.
725. Brown JEP, Conner AC, Digby JE, Ward KL, Ramanjaneya M, Randeve HS, et al. Regulation of beta-cell viability and gene expression by distinct agonist fragments of adiponectin. *Peptides*. 2010 May;31(5):944–9.
726. Gu W, Li X, Liu C, Yang J, Ye L, Tang J, et al. Globular adiponectin augments insulin secretion from pancreatic islet beta cells at high glucose concentrations. *Endocrine*. 2006 Oct;30(2):217–21.
727. Pajvani UB, Du X, Combs TP, Berg AH, Rajala MW, Schulthess T, et al. Structure-function studies of the adipocyte-secreted hormone Acrp30/adiponectin. Implications for metabolic regulation and bioactivity. *J Biol Chem*. 2003 Mar 14;278(11):9073–85.
728. Scherer PE, Williams S, Fogliano M, Baldini G, Lodish HF. A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes. *J Biol Chem*. 1995 Nov 10;270(45):26746–9.

729. Holland WL, Miller RA, Wang ZV, Sun K, Barth BM, Bui HH, et al. Receptor-mediated activation of ceramidase activity initiates the pleiotropic actions of adiponectin. *Nat Med.* 2011 Jan;17(1):55–63.
730. Ye R, Holland WL, Gordillo R, Wang M, Wang QA, Shao M, et al. Adiponectin is essential for lipid homeostasis and survival under insulin deficiency and promotes β -cell regeneration. *eLife.* 2014 Oct 23;3.
731. Ye R, Wang M, Wang QA, Scherer PE. Adiponectin-Mediated Antilipotoxic Effects in Regenerating Pancreatic Islets. *Endocrinology.* 2015 Jun;156(6):2019–28.
732. Ritzel RA, Meier JJ, Lin C-Y, Veldhuis JD, Butler PC. Human islet amyloid polypeptide oligomers disrupt cell coupling, induce apoptosis, and impair insulin secretion in isolated human islets. *Diabetes.* 2007 Jan;56(1):65–71.
733. Mithieux G, Misery P, Magnan C, Pillot B, Gautier-Stein A, Bernard C, et al. Portal sensing of intestinal gluconeogenesis is a mechanistic link in the diminution of food intake induced by diet protein. *Cell Metab.* 2005 Nov;2(5):321–9.
734. Soty M, Vily-Petit J, Castellanos-Jankiewicz A, Guzman-Quevedo O, Raffin M, Clark S, et al. Calcitonin gene-related peptide-induced phosphorylation of STAT3 in arcuate neurons is a link in the metabolic benefits of portal glucose. *Neuroendocrinology.* 2020 Jun 9;
735. Zhu JX, Wu XY, Owyang C, Li Y. Intestinal serotonin acts as a paracrine substance to mediate vagal signal transmission evoked by luminal factors in the rat. *J Physiol.* 2001 Feb 1;530(Pt 3):431–42.
736. Delaere F, Duchampt A, Mounien L, Seyer P, Duraffourd C, Zitoun C, et al. The role of sodium-coupled glucose co-transporter 3 in the satiety effect of portal glucose sensing. *Mol Metab.* 2012;2(1):47–53.
737. Delaere F, Akaoka H, De Vadder F, Duchampt A, Mithieux G. Portal glucose influences the sensory, cortical and reward systems in rats. *Eur J Neurosci.* 2013 Nov;38(10):3476–86.
738. Krahn DD, Gosnell BA, Levine AS, Morley JE. Effects of calcitonin gene-related peptide on food intake. *Peptides.* 1984 Oct;5(5):861–4.
739. Penhoat A, Mutel E, Amigo-Correig M, Pillot B, Stefanutti A, Rajas F, et al. Protein-induced satiety is abolished in the absence of intestinal gluconeogenesis. *Physiol Behav.* 2011 Nov 30;105(1):89–93.
740. Pillot B, Soty M, Gautier-Stein A, Zitoun C, Mithieux G. Protein feeding promotes redistribution of endogenous glucose production to the kidney and potentiates its suppression by insulin. *Endocrinology.* 2009 Feb;150(2):616–24.
741. Duraffourd C, De Vadder F, Goncalves D, Delaere F, Penhoat A, Brusset B, et al. Mu-Opioid Receptors and Dietary Protein Stimulate a Gut-Brain Neural Circuitry Limiting Food Intake. *Cell.* 2012 Jul 20;150(2):377–88.
742. Mendeloff AI. Dietary fiber and human health. *N Engl J Med.* 1977 Oct 13;297(15):811–4.
743. Ray TK, Mansell KM, Knight LC, Malmud LS, Owen OE, Boden G. Long-term effects of dietary fiber on glucose tolerance and gastric emptying in noninsulin-dependent diabetic patients. *Am J Clin Nutr.* 1983 Mar;37(3):376–81.
744. Robertson MD, Currie JM, Morgan LM, Jewell DP, Frayn KN. Prior short-term consumption of resistant starch enhances postprandial insulin sensitivity in healthy subjects. *Diabetologia.* 2003 May;46(5):659–65.
745. Robertson MD, Bickerton AS, Dennis AL, Vidal H, Frayn KN. Insulin-sensitizing effects of dietary resistant starch and effects on skeletal muscle and adipose tissue metabolism. *Am J Clin Nutr.* 2005 Sep;82(3):559–67.

746. De Vadder F, Kovatcheva-Datchary P, Goncalves D, Vinera J, Zitoun C, Duchampt A, et al. Microbiota-Generated Metabolites Promote Metabolic Benefits via Gut-Brain Neural Circuits. *Cell*. 2014 Jan 16;156(1):84–96.
747. De Vadder F, Kovatcheva-Datchary P, Zitoun C, Duchampt A, Bäckhed F, Mithieux G. Microbiota-Produced Succinate Improves Glucose Homeostasis via Intestinal Gluconeogenesis. *Cell Metab*. 2016 12;24(1):151–7.
748. De Vadder F, Plessier F, Gautier-Stein A, Mithieux G. Vasoactive intestinal peptide is a local mediator in a gut-brain neural axis activating intestinal gluconeogenesis. *Neurogastroenterol Motil Off J Eur Gastrointest Motil Soc*. 2015 Mar;27(3):443–8.
749. Abad-Guamán R, Carabaño R, Gómez-Conde MS, García J. Effect of type of fiber, site of fermentation, and method of analysis on digestibility of soluble and insoluble fiber in rabbits. *J Anim Sci*. 2015 Jun;93(6):2860–71.
750. Soty M, Penhoat A, Amigo-Correig M, Vinera J, Sardella A, Vullin-Bouilloux F, et al. A gut–brain neural circuit controlled by intestinal gluconeogenesis is crucial in metabolic health. *Mol Metab*. 2014 Dec 26;4(2):106–17.
751. Ritchie H, Roser M. Obesity. *Our World Data*. 2017 Aug 11.
752. Troy S, Soty M, Ribeiro L, Laval L, Migrenne S, Fioramonti X, et al. Intestinal gluconeogenesis is a key factor for early metabolic changes after gastric bypass but not after gastric lap-band in mice. *Cell Metab*. 2008 Sep;8(3):201–11.
753. Vily-Petit J, Soty-Roca M, Silva M, Raffin M, Gautier-Stein A, Rajas F, et al. Intestinal gluconeogenesis prevents obesity-linked liver steatosis and non-alcoholic fatty liver disease. *Gut*. 2020 Mar 23;
754. Nogueiras R, López M, Diéguez C. Regulation of lipid metabolism by energy availability: a role for the central nervous system. *Obes Rev Off J Int Assoc Study Obes*. 2010 Mar;11(3):185–201.
755. Lee SB, Kim HG, Lee JS, Kim WY, Lee MM, Kim YH, et al. Intermittent restraint-induced sympathetic activation attenuates hepatic steatosis and inflammation in a high-fat diet-fed mouse model. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2019 Dec 1;317(6):G811–23.
756. Browning JD, Horton JD. Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury. *J Clin Invest*. 2004 Jul;114(2):147–52.
757. Lu J, Zhao J, Meng H, Zhang X. Adipose Tissue-Resident Immune Cells in Obesity and Type 2 Diabetes. *Front Immunol*. 2019 May 22;10.
758. Lee M-W, Lee M, Oh K-J. Adipose Tissue-Derived Signatures for Obesity and Type 2 Diabetes: Adipokines, Batokines and MicroRNAs. *J Clin Med*. 2019 Jun 14;8(6).
759. Ouchi N, Kihara S, Arita Y, Nishida M, Matsuyama A, Okamoto Y, et al. Adipocyte-derived plasma protein, adiponectin, suppresses lipid accumulation and class A scavenger receptor expression in human monocyte-derived macrophages. *Circulation*. 2001 Feb 27;103(8):1057–63.
760. Yanai H, Yoshida H. Beneficial Effects of Adiponectin on Glucose and Lipid Metabolism and Atherosclerotic Progression: Mechanisms and Perspectives. *Int J Mol Sci*. 2019 Mar 8;20(5).
761. Yokota T, Oritani K, Takahashi I, Ishikawa J, Matsuyama A, Ouchi N, et al. Adiponectin, a new member of the family of soluble defense collagens, negatively regulates the growth of myelomonocytic progenitors and the functions of macrophages. *Blood*. 2000 Sep 1;96(5):1723–32.
762. Cunarro J, Buque X, Casado S, Lugalde J, Vidal A, Mora A, et al. p107 Deficiency Increases Energy Expenditure by Inducing Brown-Fat Thermogenesis and Browning of White Adipose Tissue. *Mol Nutr Food Res*. 2019;63(2):e1801096.

763. Fujimoto Y, Hashimoto O, Shindo D, Sugiyama M, Tomonaga S, Murakami M, et al. Metabolic changes in adipose tissues in response to β_3 -adrenergic receptor activation in mice. *J Cell Biochem.* 2019;120(1):821–35.
764. Wang Y, Bernhardt AJ, Nacson J, Kraus JJ, Tan Y-F, Nicolas E, et al. BRCA1 intronic Alu elements drive gene rearrangements and PARP inhibitor resistance. *Nat Commun.* 2019 Dec 11;10(1):5661.
765. Gu X, Peng C-Y, Lin S-Y, Qin Z-Y, Liang J-L, Chen H-J, et al. P16INK4a played a critical role in exacerbating acute tubular necrosis in acute kidney injury. *Am J Transl Res.* 2019;11(6):3850–61.
766. Bussey CT, Kolka CM, Rattigan S, Richards SM. Adiponectin opposes endothelin-1-mediated vasoconstriction in the perfused rat hindlimb. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2011 Jul;301(1):H79-86.
767. Bjursell M, Gerdin A-K, Lelliott CJ, Egecioglu E, Elmgren A, Törnell J, et al. Acutely reduced locomotor activity is a major contributor to Western diet-induced obesity in mice. *Am J Physiol-Endocrinol Metab.* 2008 Feb 1;294(2):E251–60.
768. Chen KY, Brychta RJ, Abdul Sater Z, Cassimatis TM, Cero C, Fletcher LA, et al. Opportunities and challenges in the therapeutic activation of human energy expenditure and thermogenesis to manage obesity. *J Biol Chem.* 2019 30;
769. van Marken Lichtenbelt WD, Vanhommel JW, Smulders NM, Drossaerts JMAFL, Kemerink GJ, Bouvy ND, et al. Cold-activated brown adipose tissue in healthy men. *N Engl J Med.* 2009 Apr 9;360(15):1500–8.
770. Larson CJ. Translational Pharmacology and Physiology of Brown Adipose Tissue in Human Disease and Treatment. *Handb Exp Pharmacol.* 2019;251:381–424.
771. Whittle A, Relat-Pardo J, Vidal-Puig A. Pharmacological strategies for targeting BAT thermogenesis. *Trends Pharmacol Sci.* 2013 Jun;34(6):347–55.
772. Utzschneider KM, Kahn SE. The Role of Insulin Resistance in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006 Dec 1;91(12):4753–61.
773. Püschel GP. Control of hepatocyte metabolism by sympathetic and parasympathetic hepatic nerves. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol.* 2004 Sep;280(1):854–67.
774. Matsuzaka T, Shimano H. Molecular mechanisms involved in hepatic steatosis and insulin resistance. *J Diabetes Investig.* 2011 Jun 5;2(3):170–5.
775. Hoeke G, Kooijman S, Boon MR, Rensen PCN, Berbée JFP. Role of Brown Fat in Lipoprotein Metabolism and Atherosclerosis. *Circ Res.* 2016 Jan 8;118(1):173–82.
776. Yuan X, Wei G, You Y, Huang Y, Lee HJ, Dong M, et al. Rutin ameliorates obesity through brown fat activation. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol.* 2017;31(1):333–45.
777. Funahashi T, Nakamura T, Shimomura I, Maeda K, Kuriyama H, Takahashi M, et al. Role of adipocytokines on the pathogenesis of atherosclerosis in visceral obesity. *Intern Med Tokyo Jpn.* 1999 Feb;38(2):202–6.
778. Polyzos SA, Kountouras J, Zavos C, Tsiaousi E. The role of adiponectin in the pathogenesis and treatment of non-alcoholic fatty liver disease. *Diabetes Obes Metab.* 2010 May;12(5):365–83.
779. Fukushima J, Kamada Y, Matsumoto H, Yoshida Y, Ezaki H, Takemura T, et al. Adiponectin prevents progression of steatohepatitis in mice by regulating oxidative stress and Kupffer cell phenotype polarization. *Hepatol Res Off J Jpn Soc Hepatol.* 2009 Jul;39(7):724–38.
780. Xu A, Wang Y, Keshaw H, Xu LY, Lam KSL, Cooper GJS. The fat-derived hormone adiponectin alleviates alcoholic and nonalcoholic fatty liver diseases in mice. *J Clin Invest.* 2003 Jul;112(1):91–100.

781. Pereira MMA, Mahú I, Seixas E, Martínéz-Sánchez N, Kubasova N, Pirzgalska RM, et al. A brain-sparing diphtheria toxin for chemical genetic ablation of peripheral cell lineages. *Nat Commun.* 2017 03;8:14967.
782. Cao Q, Jing J, Cui X, Shi H, Xue B. Sympathetic nerve innervation is required for beigeing in white fat. *Physiol Rep.* 2019;7(6):e14031.
783. Vaughan CH, Zarebidaki E, Ehlen JC, Bartness TJ. Analysis and measurement of the sympathetic and sensory innervation of white and brown adipose tissue. *Methods Enzymol.* 2014;537:199–225.

ANNEXE

Metabolic benefits of gastric bypass surgery in the mouse: The role of fecal losses



Aude Barataud^{1,2,3}, Justine Vily-Petit^{1,2,3}, Daisy Goncalves^{1,2,3}, Carine Zitoun^{1,2,3}, Adeline Duchamp^{1,2,3}, Erwann Philippe^{1,2,3}, Amandine Gautier-Stein^{1,2,3}, Gilles Mithieux^{1,2,3,*}

ABSTRACT

Objective: Roux-en-Y gastric surgery (RYGB) promotes a rapid and sustained weight loss and amelioration of glucose control in obese patients. A high number of molecular hypotheses were previously tested using duodenal-jejunal bypass (DJB) performed in various genetic models of mice with knockouts for various hormones or receptors. The data were globally negative or inconsistent. Therefore, the mechanisms remained elusive. Intestinal gluconeogenesis is a gut function that has been suggested to contribute to the metabolic benefits of RYGB in obese patients.

Methods: We studied the effects of DJB on body weight and glucose control in obese mice fed a high fat-high sucrose diet. Wild type mice and mice with a genetic suppression of intestinal gluconeogenesis were studied in parallel using glucose- and insulin-tolerance tests. Fecal losses, including excretion of lipids, were studied from the feces recovered in metabolic cages.

Results: DJB induced a dramatic decrease in body weight and improvement in glucose control (glucose- and insulin-tolerance) in obese wild type mice fed a high calorie diet, for 25 days after the surgery. The DJB-induced decrease in food intake was transient and resumed to normal in 7–8 days, suggesting that decreased food intake could not account for the benefits. Total fecal losses were about 5 times and lipid losses 7 times higher in DJB-mice than in control (sham-operated and pair-fed) mice, and could account for the weight loss of mice. The results were comparable in mice with suppression of intestinal gluconeogenesis. There was no effect of DJB on food intake, body weight or fecal loss in lean mice fed a normal chow diet.

Conclusions: DJB in obese mice fed a high calorie diet promotes dramatic fecal loss, which could account for the dramatic weight loss and metabolic benefits observed. This could dominate the effects of the mouse genotype/phenotype. Thus, fecal energy loss should be considered as an essential process contributing to the metabolic benefits of DJB in obese mice.

© 2019 The Author(s). Published by Elsevier GmbH. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Keywords Gastric bypass surgery; Metabolic disease; Fecal energy loss; Steatorrhea; Intestinal gluconeogenesis

1. INTRODUCTION

Over the past several decades, obesity has become a major health concern affecting hundreds of millions of people [1]. The rise in the prevalence of obesity is associated with increased prevalence of metabolic disorders that are associated with excess body weight, in particular type 2 diabetes mellitus (T2DM). The primary therapy for obese patients who have T2DM is to induce weight loss, which improves major parameters involved in the pathogenesis of T2DM [2]. However, most patients fail to achieve successful weight loss and adequate glycemic control from medical therapy. In contrast, bariatric surgeries have emerged as an effective treatment for obesity and T2DM [3,4]. The Roux-en-Y gastric bypass (RYGB) procedure is one of the most efficient bariatric surgeries, including a gastrointestinal rearrangement combined with a stomach volume restriction. RYGB induces a substantial and sustained weight loss of up to 30% of

starting body weight associated with enhanced postprandial satiation [5,6] and rapid improvement in T2DM, before any weight loss has occurred [7,8]. A lot of work has been undergone to understand the underlying mechanisms of RYGB, especially in relation with the roles of intestinal glucose metabolism, gastrointestinal hormones or gastrointestinal innervation [9–20]. However, the results were often negative and/or globally inconsistent (see “Discussion”), which makes that the mechanisms of the benefits of RYGB in energy homeostasis have remained elusive.

One mechanism proposed and documented by several groups to account for the metabolic benefits of RYGB relates to the activation of intestinal gluconeogenesis (IGN) [21–24]. Basically, an increased IGN was proven to induce beneficial effects on glucose control and energy metabolism. Glucose deriving from IGN is released into the portal vein and sensed by a portal glucose sensor, which initiates a gut-brain-liver neural circuit inducing satiety, an increase in hepatic insulin sensitivity

¹Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, U1213, Lyon, F-69008, France ²Université de Lyon, Lyon, F-69008, France ³Université Lyon 1, Villeurbanne, F-69622, France

*Corresponding author. Inserm 1213 Université Lyon I Laennec, 7-11, Rue Guillaume Paradin, 69372, Lyon cedex 8, France. E-mail: gilles.mithieux@inserm.fr (G. Mithieux).

Abbreviations: DJB, Duodenal-jejunal bypass; T2DM, Type 2 diabetes mellitus; RYGB, Roux-en-Y gastric bypass; IGN, Intestinal gluconeogenesis; EGA, Enterogastric anastomosis; WT, Wild type; HF-HS, High-fat high-sucrose; PF, Pair-fed; GTT, Glucose tolerance test; ITT, insulin tolerance test; AUC, Area under the curve; MC4R, Melanocortin-4 receptor; GLP-1, Glucagon-like peptide 1

Received September 26, 2019 • Revision received November 1, 2019 • Accepted November 1, 2019 • Available online 9 November 2019

<https://doi.org/10.1016/j.molmet.2019.11.006>

and a decrease in hepatic glucose production [for a review, see [25]]. In fact, IGN is increased and hepatic glucose production decreased in two models of RYGB, *i.e.* duodenal-jejunal bypass (DJB) in rats [21,22,24] and enterogastric anastomosis (EGA) in mice [23]. Interestingly, IGN takes place after RYGB in Human [26–28]. Moreover, the metabolic outcomes of RYGB in obese patients are all the better as IGN is high at the time of surgery [29].

Given the putative importance of IGN in RYGB, the initial aim of this work was thus to assess its causal role in the metabolic benefits deriving from this surgery. To address this question, we performed DJB in wild-type mice and in mice with a genetically induced deletion of IGN. Duodenal-jejunal bypass, which is equivalent to RYGB without size restriction of the stomach, is usually not done in Humans. It was chosen here as a surgical procedure since it reproduces the intestinal anatomy rearrangement of RYGB and permits to evaluate the effects on food intake in absence of mechanical constraints [30]. Interestingly, RYGB in obese human patients is usually not considered as a malabsorptive procedure relating to macronutrients. However, energy malabsorption, very variable according to patients and of lesser importance compared to the decrease in food intake, was reported after RYGB [31]. In the course of this work, we were led to raise the question of eventual macronutrient malabsorption in DJB-mice.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Animals and diets

All the experiments were carried out in accordance with the principles and guidelines established by the European Convention for the Protection of Laboratory Animals and approved by our regional animal care committee (C2EA-55, Université Lyon 1, Lyon) and the Ministry of Higher Education and Research (Agreement project number: Apafis#11929–2017102421331413 v1).

Male C57Bl/6J wild-type mice (WT) were purchased from Charles River Laboratories at 4 weeks of age. Mice with an intestine-specific disruption of the catalytic subunit (*G6pc*) of glucose-6 phosphatase, the key enzyme in endogenous glucose production (I-G6pc^{-/-} mice), were generated as described previously [32]. All mice were housed in the animal facility of Lyon 1 University under controlled temperature (22 ± 2 °C) and lighting (12 h light/dark cycle with light at 7 a.m.) with free access to food and water.

To induce obesity, 4-weeks old WT and I-G6pc^{-/-} mice were placed on high-fat/high-sucrose (HF-HS) diet for 20 weeks prior to surgery. HF-HS diet, consisting of 36.1% fat, 35% carbohydrates (50% maltodextrin + 50% sucrose) and 19.8% proteins, was produced by the Unité de Préparation des Aliments Expérimentaux (INRA, UE0300, Jouy-en-Josas, France). For experiments in lean animals, WT and I-G6pc^{-/-} mice were maintained on standard diet (SAFE A04, Augis, France) and surgery was performed at 24-weeks old. All the animals were maintained on their respective diet after surgery.

For each genotype (WT and I-G6pc^{-/-}), two groups were constituted at the day of surgery in mice fed a standard diet: DJB-treated mice and sham-operated mice (sham). Experiments on obese mice involved a third group: sham-operated pair-fed mice (sham-PF). Sham-PF mice received sham surgery and were pair-fed to match the daily food intake of DJB mice.

2.2. Surgical procedures

Duodenal-jejunal bypass surgery was performed under controlled anesthesia as described in details previously [30]. Briefly, the small intestine was cut 3–4 cm distal to the ligament of Treitz. The proximal intestine was anastomosed 5–6 cm further to the distal intestine in an

and-to-side fashion using a running suture to form the “biliary loop”. Then, the distal intestine was anastomosed to the glandular stomach with a 8–0 nylon running suture (Ethicon) to form the “alimentary loop”. This surgery resulted in the creation of 3 intestinal limbs: alimentary and biliopancreatic limbs of approximately 6 cm each and common limb of nearly 20 cm. Sham operations consisted of a laparotomy and repair. Analgesia was provided by ketoprofen (5 mg/kg) and buprenorphine (0.05 mg/kg) injection before the surgery and during 5 days post-surgery. A subcutaneous injection of glucose 10% solution was performed to avoid dehydration at the end of surgery and during 2–3 days post-surgery. In mice intended for inactivation of the portal gastrointestinal system, a gauze compress moistened with NaCl 0.9% (sham) or 80 µl of a solution of capsaicin (10 mg/ml in water:ethanol:tween (8:1:1; vol/vol)) was applied for 10 min around the portal vein during the DJB procedure, as previously described [23].

The first week after surgery mice were individually housed and put on heating pad set at 28 °C to improve healing and recovery and then mice were group-housed (2–4 mice per cage). After the surgery, mice were given *ad libitum* access to glucose 1% solution but were deprived of food for 24 h. From the second post-operative day, mice were fed with liquid diet (Ensure), and from the 6th day the appropriate diet (HF-HS or standard diet) was given to mice *ad libitum*, except for sham-PF mice.

2.3. Glucose and insulin tolerance tests

Glucose tolerance test (GTT) and insulin tolerance test (ITT) were carried out 2 and 3 weeks after the surgery, respectively. Animals were fasted for 16 h (GTT) or 6 h (ITT) and then received an intraperitoneal injection of glucose (1 g/kg) or insulin (0.75 IU/kg for obese mice and 0.5 IU/kg for lean mice). Blood glucose was monitored for 120 (GTT) or 90 min (ITT) using a glucometer (Accu-Check, Roche) on samples collected from the tip of the tail vein.

2.4. Body weight, food intake, metabolic cage and fecal fat content

Body weight and food intake was monitored daily during 25 days. On postoperative days 25–28, mice were placed on metabolic cages during 48 h. Food intake and water consumption were measured and urine and stools were collected at the end of the 48 h experiment. Stool was weighed and stored at –80 °C. Dry weight was determined after drying for one night at 65 °C, as previously described [33]. Fecal fat content was determined using acid steatocrit method. Briefly, frozen stool samples were powdered and mixed with 1N perchloric acid and 0.5% oil red O. The homogenates were placed in a capillary tube and centrifuged and the length of the different layers was measured under a microscope. Steatocrit was calculated as 100x [length of fatty layer/ (length of solid layer + length of fatty layer)]. Fecal fat excretion was calculated as acid steatocrit (%) x 24 h stool weight.

2.5. Tissue sampling and metabolic studies

Thirty days after surgery, 6 h-fasted mice were killed by cervical dislocation. The different limbs of the intestine of DJB mice were measured and rinsed using saline solution and rapidly frozen at liquid nitrogen temperature to be stored at –80 °C until use. For sham mice, intestine was cut in fragments reproducing the length of the limbs of DJB mice. G6Pase activity was assayed under maximal velocity conditions, as previously described [34,35].

2.6. Statistical analysis

The results were expressed as mean ± SEM. Areas under the curves (AUC) were calculated by trapezoidal integration. Unpaired Student's *t* test was used for two-group comparisons. One-way ANOVA followed

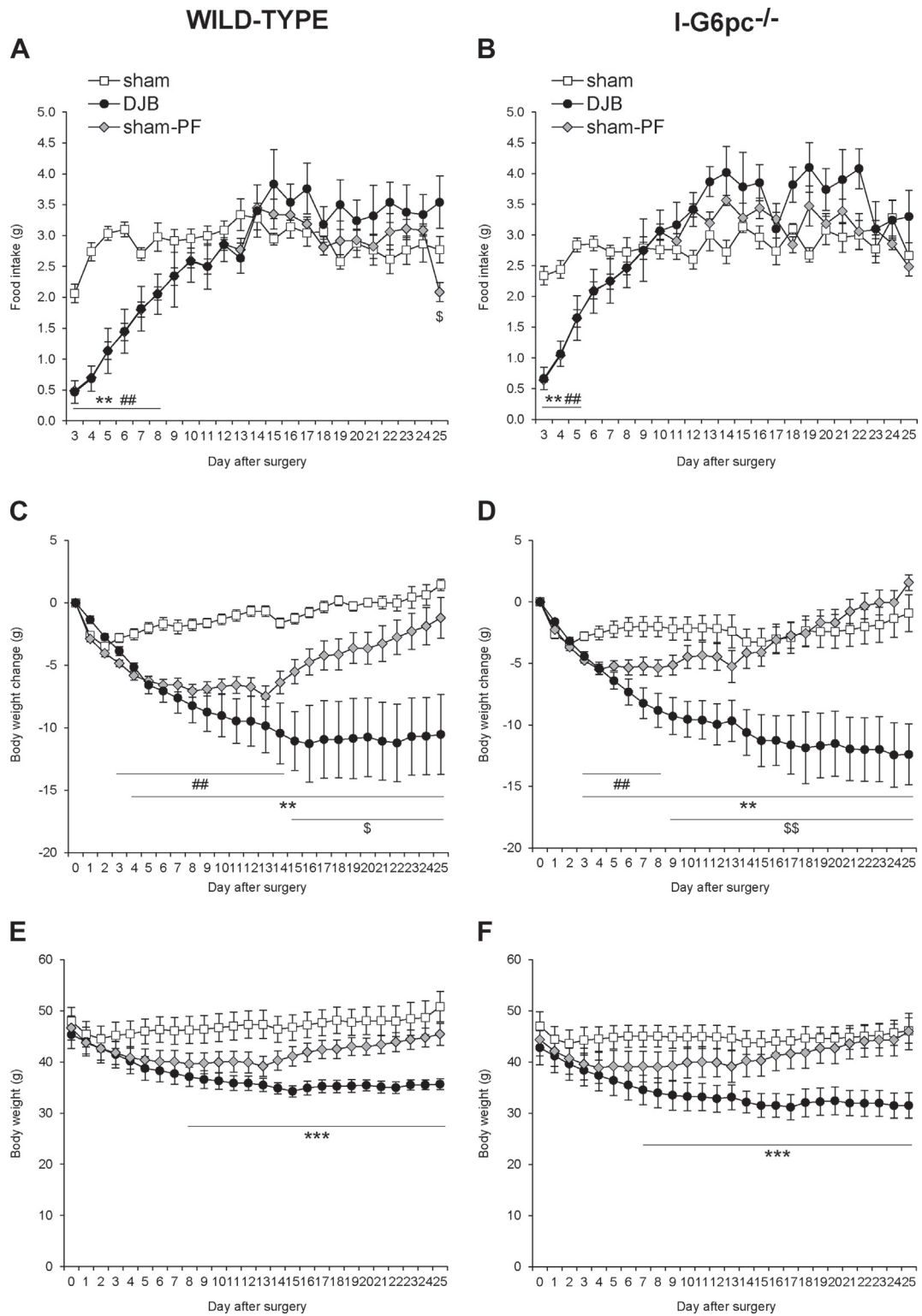


Figure 1: Effects of duodenal-jejunal bypass on food intake and body weight in obese mice. A-B Time course of food intake, **C-D** body weight change and **E-F** body weight of WT and I-G6pc^{-/-} obese mice fed a HF-HS diet after DJB (black circles), sham- (white squares) or sham-PF surgery (grey diamonds). n = 8 for WT sham group, n = 6 for WT DJB group, n = 8 for WT sham-PF, n = 8 for I-G6pc^{-/-} sham group, n = 6 for I-G6pc^{-/-} DJB group, n = 7 for I-G6pc^{-/-} sham-PF group; *p < 0.05, **p < 0.01 for DJB vs sham group; ##p < 0.01 for sham-PF vs sham group; \$ p < 0.05 and \$\$ p < 0.01 for DJB vs sham-PF group.

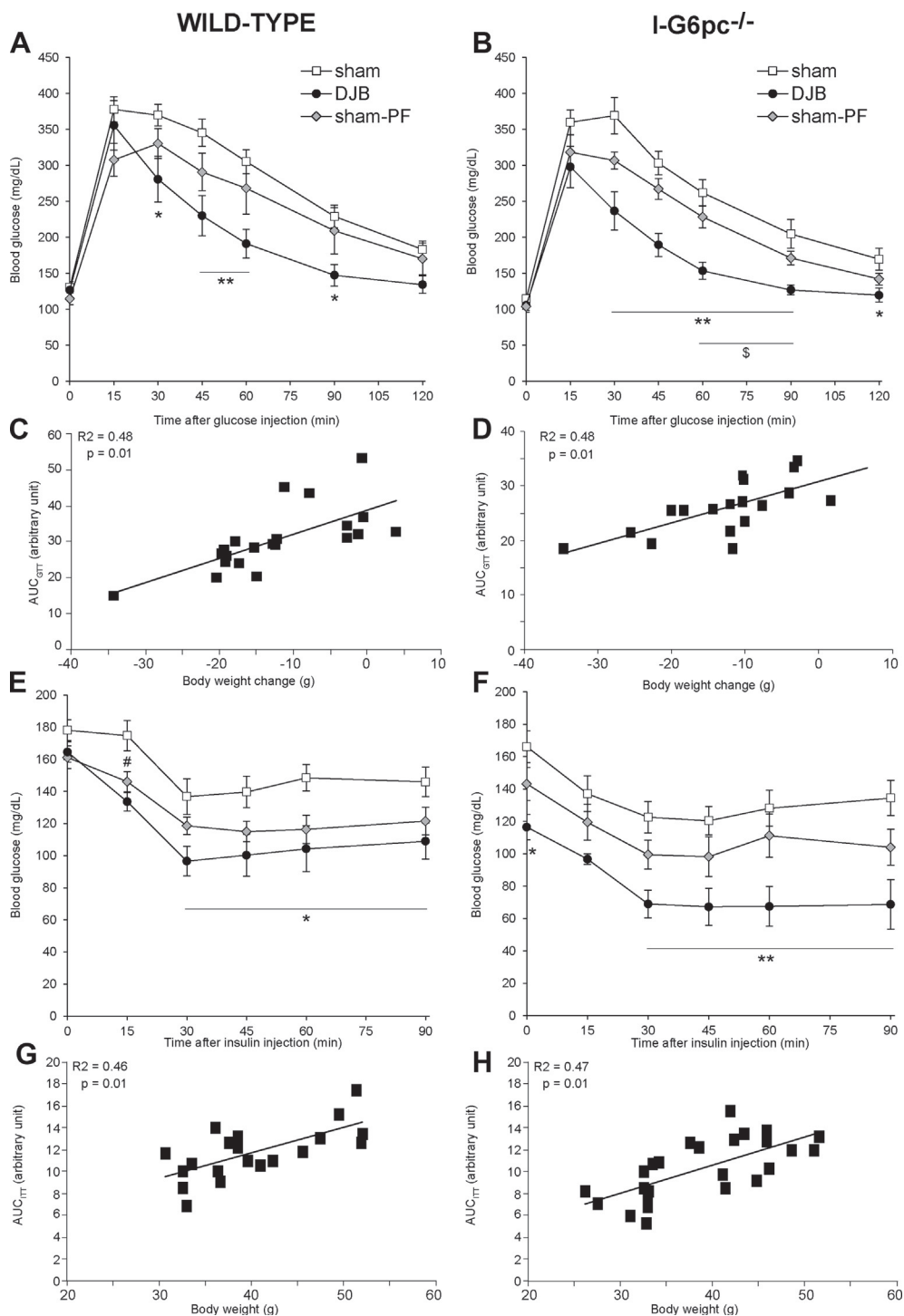


Figure 2: Effects of duodenal-jejunal bypass on glucose homeostasis in obese mice. **A-B** Time course of plasma glucose during glucose tolerance test performed 2 weeks after surgery, **C-D** Scatter plots of the values of the area under the curve of GTT vs body weight change for each mice of panels **A** and **B**, respectively. **E-F** Time course of glucose during insulin tolerance test performed 3 weeks after surgery in WT and I-G6pc^{-/-} obese mice fed a HF-HS diet after DJB (black circles), sham- (white squares) or sham-PF surgery (grey diamonds). **G-H** Scatter plots of the values of the area under the curve of ITT vs body weight for each mice of panels **E** and **F**, respectively. n = 8 for WT sham group, n = 6 for WT DJB group, n = 8 for WT sham-PF group, n = 8 for I-G6pc^{-/-} sham group, n = 6 for I-G6pc^{-/-} DJB group, n = 7 for I-G6pc^{-/-} sham-PF group; **p* < 0.05 and ***p* < 0.01 for DJB vs sham group; \$ *p* < 0.05 for DJB vs sham-PF group.

by Tukey's post-hoc test was used for three-group comparisons. $P < 0.05$ was considered significant.

3. RESULTS

3.1. Duodenal-jejunal bypass results in transient reduction in food intake and substantial weight loss in obese mice

In obese WT mice fed a HF-HS diet, DJB resulted in a transient decrease in food intake from post-operative day 3 to postoperative day 8 (Figure 1A). Then, food intake of DJB-WT mice resumed the level as that of sham WT mice until the end of the experiment. In obese I-G6pc^{-/-} mice, DJB induced a similar effect on food intake as in WT mice, except that the hypophagic period was slightly shorter (Figure 1B). Regardless of the genotype, DJB resulted in a rapid and substantial weight loss (WT mice, Figure 1C and I-G6pc^{-/-} mice, Figure 1D) of about 12 g in 2 weeks, representing about 25% of initial body weight. Then, both WT-DJB and I-G6pc^{-/-}-DJB mice stabilized body weight (Figure 1E,F). To distinguish the specific effects of DJB surgery from those related to the transient decrease in food intake, a group of sham-operated mice pair-fed with DJB mice was studied (sham-PF, grey diamond, Figure 1). Weight loss upon pair-feeding was markedly less important than after DJB in both WT (Figure 1C) and I-G6pc^{-/-} mice (Figure 1D). Above all, both groups of sham-PF mice rapidly exhibited weight regain so that their body weight was not significantly different from that of sham mice throughout the experiment (Figure 1E,F).

Thus, these data reveal that, in obese mice: 1) DJB promotes a transient decrease only in food intake, but a lasting decrease in body weight; 2) the dramatic weight loss induced by DJB is only partly dependent on the initial decrease in food intake; 3) the diminutions in body weight after DJB surgery in obese mice are comparable in absence or presence of IGN.

3.2. Glucose tolerance and insulin sensitivity are improved in obese mice after duodenal-jejunal bypass

DJB in WT mice induced a marked improvement in glucose tolerance compared to sham WT mice, whereas pair-feeding did not result in a significant improvement in glucose tolerance compared to sham mice (Figure 2A). Similar results were observed in I-G6pc^{-/-} DJB and sham-PF mice compared to I-G6pc^{-/-} sham mice (Figure 2B). These findings were corroborated from total areas under the curve of glucose tolerance test (Figure 2C,D). Results from insulin tolerance test showed that DJB-WT mice displayed a substantial improvement in insulin sensitivity compared to sham-WT mice (Figure 2E). As for glucose tolerance, sham-PF WT mice exhibited no significant improvement in insulin sensitivity (Figure 2E). Comparable outcomes about insulin sensitivity were observed in I-G6pc^{-/-} mice (Figure 2F). It is noteworthy that there was a strong positive correlation between the individual area under the curve (AUC) of GTT and body weight loss in WT and I-G6pc^{-/-} mice (Figure 2 C and D). A comparable observation was made between the AUC of ITT and body weight (Figure 2 G and H). This suggests that the amelioration of glucose control after DJB in either WT or I-G6pc^{-/-} mice was mainly dependent on body weight loss.

Together, these results highlight that the initial blunting in food intake after DJB could not explain the marked improvement in glucose homeostasis at the end of the study period. These findings also show that DJB in both WT and I-G6pc^{-/-} obese mice resulted in similar improvements in glucose tolerance and insulin sensitivity, suggesting that the metabolic benefits of DJB should have a cause stronger than, and capable of masking, the benefits linked to IGN.

3.3. Duodenal-jejunal bypass induces gluconeogenic capacity in gut limbs receiving nutrients in obese WT mice

Face to the intriguing data above, we checked whether the modifications in gluconeogenic capacity took place in mice with DJB as previously observed in rats [21,22,24] or mice with gastroenteroanastomosis [23]. As expected, G6Pase activity was markedly increased in the alimentary limb and the common limb after DJB, *i.e.* the limbs receiving nutrients (Supplemental figure 1a, showing G6Pase activities determined in the 3 limbs after DJB and the corresponding intestinal parts in sham- and sham-PF mice), as previously described [21–24]. These changes in G6Pase enzymatic activity were associated with marked hypertrophy in both nutrient-receiving limbs after DJB, which is a well-known effect of gastric bypass surgery [36] (Supplemental figure 1b, showing the weight of the 3 limbs reported to length and compared with the corresponding parts in sham- and sham-PF mice).

Together, these data highlight that intestinal gluconeogenic capacity was increased after DJB in obese mice.

3.4. A substantial energy loss in feces is promoted by duodenal-jejunal bypass in obese mice

Since the dramatic DJB-induced weight loss in either WT or I-G6pc^{-/-} mice could not be ascribed to decreased food intake, we then assessed the question of a possible malabsorption of nutrients consecutive to the surgery process. Data obtained from 48 h-studies in WT obese mice placed in metabolic cages showed that food intake, water consumption and urinary volume were similar in sham, DJB and sham-PF mice (Figure 3A–C). However, the total weight of stools in DJB WT mice was approximately 5-fold higher than that in their counterparts sham or sham-PF mice (Figure 3D). This was associated with substantial fat malabsorption, since total lipid amount in feces was on average 7 times higher in DJB-WT mice than that in their counterparts sham or sham-PF mice (Figure 3E). Interestingly, the droppings from DJB mice were bigger and lighter in color than those from their counterparts. Moreover, all were equivalent in terms of water content (Supplemental figure 3). These findings therefore suggest that DJB in obese mice fed HF-HS diet promotes substantial malabsorption of nutrients and loss of lipids in feces.

In control mice after EGA [23], the weight loss observed was fully explained by a dramatic decrease in food intake and not by lipid malabsorption. Both food intake and weight loss were canceled in EGA-mice after capsaicin-denervation of the gastrointestinal nervous system surrounding the portal vein, a treatment that suppresses the benefits of IGN [23]. Thus, we raised the question to know whether capsaicin denervation of the periportal gastrointestinal nervous system could influence the loss of fecal matter, lipid malabsorption and weight loss in obese DJB-WT mice. Moreover, we also assessed whether fecal loss and lipid malabsorption could account for the observed weight loss in DJB-I-G6pc^{-/-} mice fed a high calorie diet. In both cases, again a marked increase in stool weight/lipid loss in feces took place in capsaicin-treated DJB-WT mice and DJB-I-G6pc^{-/-} mice and not in their counterparts sham or sham-PF mice (Supplemental figure 2a and b).

Altogether, these data suggest that fecal energy losses could be a common feature of DJB in mice, irrespective of the genotype or the integrity of the periportal gastrointestinal system.

3.5. No effect of duodenal-jejunal bypass on body weight in lean mice

To evaluate further the importance of fecal/lipid loss in faeces in DJB, we studied the metabolic effects of DJB in lean mice fed a standard

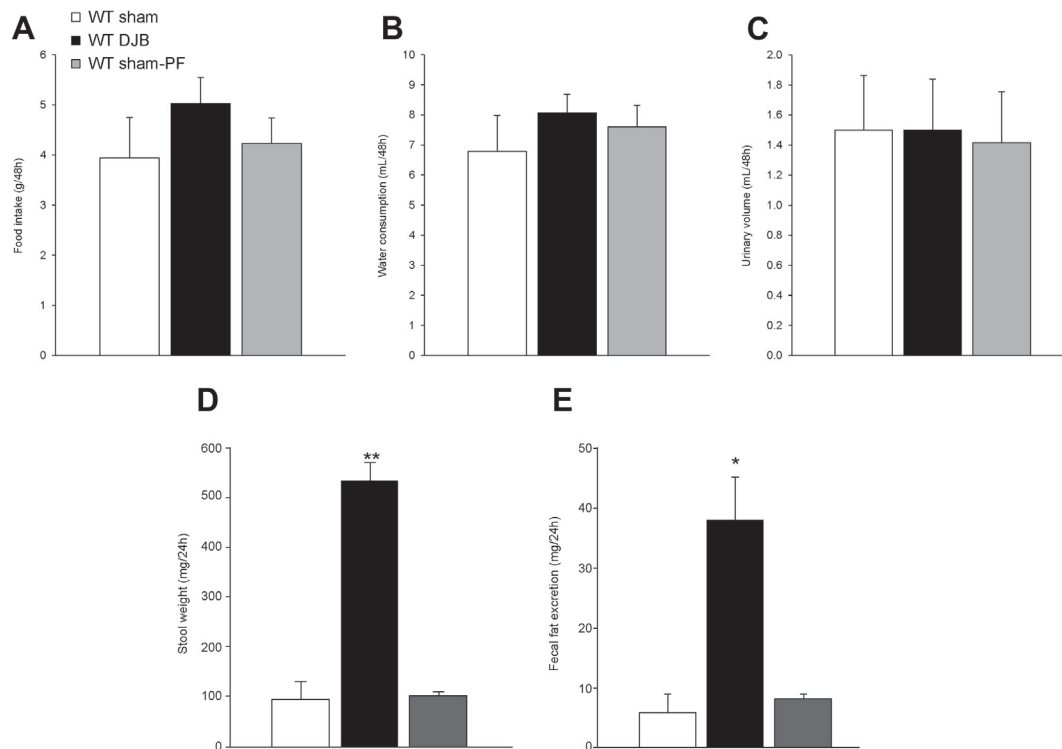


Figure 3: Stool features in wild-type obese mice after duodenal-jejunal bypass. Food intake (panel A), water intake (panel B), urinary volume (panel C), stool weight (panel D) and fecal fat content (panel E) were measured for 48 h in metabolic cages in WT obese mice after DJB (black column), sham- (white column) or sham-PF surgery (grey column). Data are reported to that quantified in sham-operated mice. $n = 6$ for sham-group, $n = 5$ for DJB group, $n = 6$ for sham-PF group; * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ for DJB vs both sham and sham-PF groups.

diet that contains a low proportion of energy as lipids (about 3%). In agreement with previous data from us [30] and others [37,38], DJB caused only a very transient effect on food intake in either WT or $I-G6pc^{-/-}$ mice (Figure 4 A and B), which rapidly resumed to that of sham-operated mice, and virtually no effect on body weight (Figure 4 C and D). Importantly, no difference in the mass of feces or lipid malabsorption was observed in lean DJB mice fed a standard diet, as demonstrated from the results from metabolic cages studies (data not shown).

These data highlight that in lean mice fed a standard diet, DJB induces a transient mitigation in food intake, rapidly resumed to normal, but neither nutrient malabsorption nor weight loss.

4. DISCUSSION

Since the spectacular emergence of gastric bypass surgeries as successful treatment of morbid obesity associated or not with diabetes, a huge amount of work has been undertaken in various rodent models with the aim to understand the mechanisms underlying the metabolic benefits. Mice are often preferred to rats due to the ease of assess the possible causal role of e.g. specific hormones or receptors, in relevant gene-knockout models. For example, the study of mice with a knockout of melanocortin-4 receptor (MC4R) indicated that signaling via melanocortin-4 receptor could be involved in the effect of gastric bypass in mice [15]. This seems consistent with the crucial role of hypothalamic MC4R in the control of energy homeostasis. However, what appears striking about the examination of this literature is the high proportion of contradictory or negative results. For example, the role of the melanocortin system was questioned later [18]. This also

relates to the eventual implications of various hormones (including gastrointestinal ones but not only) as fibroblast growth factor 21, peptide YY or glucagon-like peptide 1 (GLP-1), or their receptors as leptin receptor, serotonin 2C receptor, GLP-1 receptor, Y2 receptor [9–14,16,17,19,20,39], or other receptors putatively involved in RYGB beneficial effects as the bile acid receptor TGR5 or mu-opioid receptors [14,30] that all concluded that the tested hormone or receptor is dispensable for the metabolic effects of gastric bypass in mice.

Here, we tested the hypothesis that IGN could be causally involved in the benefits of DJB, using a mouse model ($I-G6pc^{-/-}$) in which IGN is suppressed via the intestine-targeted deletion of the catalytic unit of G6Pase, the enzyme operating the final reaction of gluconeogenesis [32]. Several papers previously indicated that increased IGN is associated with the metabolic benefits of various models of RYGB in various models of obese rodents [21–23] and in obese patients [26,29]. However, we observed that IGN seems dispensable for the beneficial effects of DJB in mice.

Face to these intriguing results, we were led to raise the question of an eventual fecal loss of energy to account for the prolonged body weight loss in absence of prolonged decrease in food intake and its maintenance during food recovery, as observed in ours [30] and others [9–14,16,17,19,20,39] studies. Indeed, another common feature of the literature on gastric bypass in mice is that the surgery induces a strong decrease in body weight under high calorie diets, but is pretty ineffective under standard diet conditions [30,37,38]. The question of eventual fecal or lipid loss is most often overlooked in gastric bypass surgery research. When sometimes, fecal lipid loss was studied and evidenced, this was not considered as a possible important cause of observed body weight loss, perhaps because

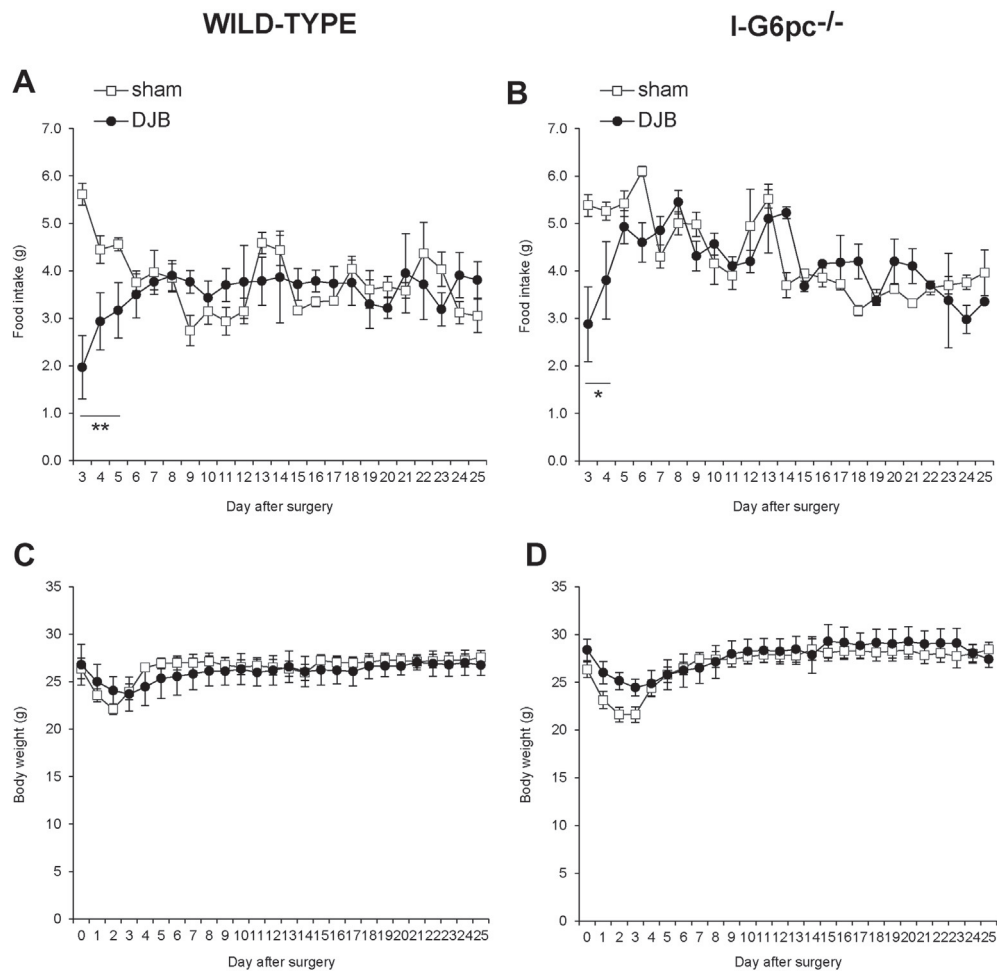


Figure 4: Effects of duodenal-jejunal bypass on food intake, body weight and glucose tolerance in lean mice. A-B Time course of food intake, **C-D** Time course of body weight in WT and I-G6pc^{-/-} lean mice fed a standard diet after DJB (black circles) or sham surgery (white squares). n = 6 for WT sham group, n = 4 for WT DJB group, n = 5 for I-G6pc^{-/-} sham group, n = 4 for I-G6pc^{-/-} DJB group; *p < 0.05 and **p < 0.01 vs sham group.

other processes, e.g. energy expenditure or gut microbiota, were the main focus of the paper [40,41]. However, a comprehensive study involving several mouse strains and a high number of dietary regimen of various compositions in macronutrients has recently established that assimilated lipid is the main driver of body weight gain [42]. In this case, lipid malabsorption in absence of compensation by increased food intake, as is the case after DJB in mice (see above), is expected to promote important weight loss. For instance, mice with a knockout of the peptide transporter PepT1 exhibit a marked resistance to body weight gain under a high fat diet, with an increase of about 20% only in energy loss (exclusively under the form of lipid) in feces [43]. Here, we determined that fecal lipid loss might be dramatically higher, i.e. about 600% in DJB-mice compared to sham or sham-PF mice. It is therefore likely that fecal energy losses could be a major determinant of body weight loss and inability to regain weight during food recovery in DJB mice. Irrespective of the substantial lipid loss (around 40 mg per day, see Figure 3E), it is noteworthy that the cumulative amount of excess stool in DJB-mice compared to sham- or sham-PF mice (around 500 mg per day, see Figure 3D) globally matches the weight loss observed during the 25 days of the study (around 12 g, refer to paragraph 3.1). There was no compensation on food intake, water intake and urinary volume,

which suggests that a substantial loss of all macronutrients takes place and may account for the energy deficit in DJB-mice. Moreover, one cannot exclude that malabsorption of micronutrients, such as vitamin or salt, could also concur to the phenotype observed. Malabsorption was studied and evidenced at the end of the 25 days period of experiment, i.e. at a time where body weight of mice tended to stop decreasing and plateau, which could appear surprising. However, such a feature is well known during caloric restriction aimed to weight loss. The energy requirement of the body being positively correlated with body weight, it decreases as body weight decreases. As a consequence, weight loss ceases once the energy requirement of the body (decreased) is fulfilled by the amount of food ingested (decreased in the case of caloric restriction, malabsorbed here). DJB-induced fecal losses appears independent of the periportal nerve integrity, which is in line with previous data on the absence of (or very transient and slight only) implication of the vagal nerves in the effects of gastric bypass in mice [13,19]. It is also noteworthy that fecal/lipid loss and improvement of glucose control were comparable in both DJB-WT and DJB-I-G6pc^{-/-} mice while the latter exhibit impaired glucose control [44]. This suggests that fecal losses could be a determinant of weight loss that dominates the metabolic effects deriving from the mouse genotype/phenotype. This could explain the

high number of negative results from genetically modified mice already reported in the field.

It may appear surprising that fecal losses could be essential in DJB-induced weight loss in mice, since RYGB is usually not considered as malabsorptive relating to macronutrients in Humans. However, a weak energy malabsorption, very variable according to patient and of lesser importance in front of the decrease in food intake, was suggested to be mainly dependent on the patient's diet [31]. It is noteworthy that malabsorption was suggested to correlate with the lipid content of the diet [31]. In addition, a key feature of RYGB is the rapid disgusting for high calorie food in both human patients and laboratory rodents [45–47]. This leads human patients to adopt healthier regimen, especially depleted in fat, very rapidly [45–47]. In this case, it seems consistent with our data herein that they do not suffer important fecal (lipid) loss. This is very different from the situation of rodents in experimental studies in relation with RYGB. Operated animals are given the same food (calorie-rich) before and after the operation, which makes them prone to fecal losses during the post-operative period. Consistently, there is neither fecal loss/steatorrhea nor weight loss in mice fed a normal diet (see paragraph 3.5). It is noteworthy that, as human patients, rodents rapidly abandon high-fat food whenever standard (starch-based, low fat) food is proposed concomitantly [46,48].

Another notable discrepancy between the outcomes of gastric bypass in mice and humans relates to energy expenditure. Energy expenditure is often reported slightly elevated in bypass mice [9,10,14,17,41]. This is surprising. Indeed, energy expenditure is positively correlated with body weight. Consistently, a decrease in energy expenditure is observed after RYGB-induced weight loss in Humans [49–51]. There is no clear explanation for such a discrepancy. We could speculate that the mouse is a very small animal, weakly insulated compared to obese Humans. Thus, increasing energy expenditure could be an adaptation to maintain body temperature despite the dramatic adipose tissue loss that occurs after DJB. Whatever the reason, combined with fecal loss/steatorrhea, this concurs to the idea that the obese mouse fed a high calorie diet is probably not a good model to understand the mechanisms of the lasting body weight loss and metabolic benefits occurring after RYGB in Human.

5. CONCLUSION

To conclude, we report here that DJB induces dramatic loss of fecal matter in obese mice fed a HF-HS diet. This does not take place in lean mice fed a control starch diet. In obese mice, this could be sufficient to explain the lasting weight loss and associated improvements in glucose control associated with DJB. Since this could dominate the metabolic features linked to the mouse genotype/phenotype, we conclude that fecal energy loss should no longer be underestimated in bypass surgery studies in the mouse and should even be considered as a key integral component of the mechanism underlying the metabolic benefits of bypass surgeries in the mouse. These results also suggest that fecal energy loss could be a component of the weight loss and associated metabolic benefits associated with RYGB in Humans.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank the French « Fondation Francophone pour la Recherche sur le Diabète » (2015) and the French « Agence Nationale pour la Recherche » (ANR11-BSV1-016-01 and ANR17-CE14-0007) for funding their work. The authors are grateful to the members of the animal house ALECS for housing the mice before the

operations, and to Catherine Vogt and Damien Gervasoni for helpful advising about the procedures of gastric bypass surgery and of mouse caring post-surgery.

CONFLICTS OF INTEREST

None declared.

APPENDIX A. SUPPLEMENTARY DATA

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2019.11.006>.

REFERENCES

- [1] Ng, M., Fleming, T., Robinson, M., Thomson, B., Graetz, N., Margono, C., et al., 2014. 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. *Lancet* 384(9945):766–781. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)60460-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)60460-8).
- [2] Vetter, M.L., Amaro, A., Volger, S., 2014. Nutritional management of type 2 diabetes mellitus and obesity and pharmacologic therapies to facilitate weight loss. *Postgraduate Medicine* 126(1):139–152. <https://doi.org/10.3810/pgm.2014.01.2734>.
- [3] Rubino, F., 2013. From bariatric to metabolic surgery: definition of a new discipline and implications for clinical practice. *Current Atherosclerosis Reports* 15(12):369. <https://doi.org/10.1007/s11883-013-0369-x>.
- [4] Sjöström, L., Lindroos, A.-K., Peltonen, M., Torgerson, J., Bouchard, C., Carlsson, B., et al., 2004. Lifestyle, diabetes, and cardiovascular risk factors 10 years after bariatric surgery. *New England Journal of Medicine* 351(26):2683–2693. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa035622>.
- [5] Le Roux, C.W., Aylwin, S.J.B., Batterham, R.L., Borg, C.M., Coyle, F., Prasad, V., et al., 2006. Gut hormone profiles following bariatric surgery favor an anorectic state, facilitate weight loss, and improve metabolic parameters. *Annals of Surgery* 243(1):108–114.
- [6] Sjöström, L., 2013. Review of the key results from the Swedish Obese Subjects (SOS) trial - a prospective controlled intervention study of bariatric surgery. *Journal of Internal Medicine* 273(3):219–234. <https://doi.org/10.1111/joim.12012>.
- [7] Pories, W.J., Swanson, M.S., MacDonald, K.G., Long, S.B., Morris, P.G., Brown, B.M., et al., 1995. Who would have thought it? An operation proves to be the most effective therapy for adult-onset diabetes mellitus. *Annals of Surgery* 222(3):339–350 discussion 350–2.
- [8] Wickremesekera, K., Miller, G., Naotunne, T.D., Knowles, G., Stubbs, R.S., 2005. Loss of insulin resistance after Roux-en-Y gastric bypass surgery: a time course study. *Obesity Surgery* 15(4):474–481. <https://doi.org/10.1381/0960892053723402>.
- [9] Boland, B., Mumphrey, M.B., Hao, Z., Gill, B., Townsend, R.L., Yu, S., et al., 2019. The PYY/Y2R-deficient mouse responds normally to high-fat diet and gastric bypass surgery. *Nutrients* 11(3):585. <https://doi.org/10.3390/nu11030585>.
- [10] Boland, B.B., Mumphrey, M.B., Hao, Z., Townsend, R.L., Gill, B., Oldham, S., et al., 2019. Combined loss of GLP-1R and Y2R does not alter progression of high-fat diet-induced obesity or response to RYGB surgery in mice. *Molecular Metabolism* 25:64–72. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2019.05.004>.
- [11] Carmody, J.S., Ahmad, N.N., Machineni, S., Lajoie, S., Kaplan, L.M., 2015. Weight loss after RYGB is independent of and complementary to serotonin 2C receptor signaling in male mice. *Endocrinology* 156(9):3183–3191. <https://doi.org/10.1210/en.2015-1226>.

Brief Communication

- [12] Chandarana, K., Gelegen, C., Karra, E., Choudhury, A.I., Drew, M.E., Fauveau, V., et al., 2011. Diet and gastrointestinal bypass-induced weight loss: the roles of ghrelin and peptide YY. *Diabetes* 60(3):810–818. <https://doi.org/10.2337/db10-0566>.
- [13] Hao, Z., Townsend, R.L., Mumphrey, M.B., Patterson, L.M., Ye, J., Berthoud, H.-R., 2014. Vagal innervation of intestine contributes to weight loss after Roux-en-Y gastric bypass surgery in rats. *Obesity Surgery* 24(12):2145–2151. <https://doi.org/10.1007/s11695-014-1338-3>.
- [14] Hao, Z., Leigh Townsend, R., Mumphrey, M.B., Gettys, T.W., Yu, S., Münzberg, H., et al., 2018. Roux-en-Y gastric bypass surgery-induced weight loss and metabolic improvements are similar in TGR5-deficient and wildtype mice. *Obesity Surgery* 28(10):3227–3236. <https://doi.org/10.1007/s11695-018-3297-6>.
- [15] Hatoum, I.J., Stylopoulos, N., Vanhoose, A.M., Boyd, K.L., Yin, D.P., Ellacott, K.L.J., et al., 2012. Melanocortin-4 receptor signaling is required for weight loss after gastric bypass surgery. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 97(6):E1023–E1031. <https://doi.org/10.1210/jc.2011-3432>.
- [16] Meirelles, K., Ahmed, T., Culnan, D.M., Lynch, C.J., Lang, C.H., Cooney, R.N., 2009. Mechanisms of glucose homeostasis after roux-en-Y gastric bypass surgery in the obese, insulin-resistant Zucker rat. *Annals of Surgery* 249(2):277–285. <https://doi.org/10.1097/SLA.0b013e3181904af0>.
- [17] Morrison, C.D., Hao, Z., Mumphrey, M.B., Townsend, R.L., Münzberg, H., Ye, J., et al., 2016. Roux-en-Y gastric bypass surgery is effective in fibroblast growth factor-21 deficient mice. *Molecular Metabolism* 5(10):1006–1014. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2016.08.005>.
- [18] Mumphrey, M.B., Hao, Z., Townsend, R.L., Patterson, L.M., Morrison, C.D., Münzberg, H., et al., 2014. Reversible hyperphagia and obesity in rats with gastric bypass by central MC3/4R blockade. *Obesity* 22(8):1847–1853. <https://doi.org/10.1002/oby.20773>.
- [19] Shin, A.C., Zheng, H., Berthoud, H.-R., 2012. Vagal innervation of the hepatic portal vein and liver is not necessary for Roux-en-Y gastric bypass surgery-induced hypophagia, weight loss, and hypermetabolism. *Annals of Surgery* 255(2):294–301. <https://doi.org/10.1097/SLA.0b013e31823e71b7>.
- [20] Ye, J., Hao, Z., Mumphrey, M.B., Townsend, R.L., Patterson, L.M., Stylopoulos, N., et al., 2014. GLP-1 receptor signaling is not required for reduced body weight after RYGB in rodents. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 306(5):R352–R362. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00491.2013>.
- [21] Kim, M., Son, Y.G., Kang, Y.N., Ha, T.K., Ha, E., 2015. Changes in glucose transporters, gluconeogenesis, and circadian clock after duodenal-jejunal bypass surgery. *Obesity Surgery* 25(4):635–641. <https://doi.org/10.1007/s11695-014-1434-4>.
- [22] Sun, D., Wang, K., Yan, Z., Zhang, G., Liu, S., Liu, F., et al., 2013. Duodenal-jejunal bypass surgery up-regulates the expression of the hepatic insulin signaling proteins and the key regulatory enzymes of intestinal gluconeogenesis in diabetic Goto-Kakizaki rats. *Obesity Surgery* 23(11):1734–1742. <https://doi.org/10.1007/s11695-013-0985-0>.
- [23] Troy, S., Soty, M., Ribeiro, L., Laval, L., Migrenne, S., Fioramonti, X., et al., 2008. Intestinal gluconeogenesis is a key factor for early metabolic changes after gastric bypass but not after gastric lap-band in mice. *Cell Metabolism* 8(3):201–211. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2008.08.008>.
- [24] Yan, Y., Zhou, Z., Kong, F., Feng, S., Li, X., Sha, Y., et al., 2016. Roux-en-Y gastric bypass surgery suppresses hepatic gluconeogenesis and increases intestinal gluconeogenesis in a T2DM rat model. *Obesity Surgery* 26(11):2683–2690. <https://doi.org/10.1007/s11695-016-2157-5>.
- [25] Soty, M., Gautier-Stein, A., Rajas, F., Mithieux, G., 2017. Gut-brain glucose signaling in energy homeostasis. *Cell Metabolism* 25(6):1231–1242. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2017.04.032>.
- [26] Hayes, M.T., Foo, J., Besic, V., Tychinskaya, Y., Stubbs, R.S., 2011. Is intestinal gluconeogenesis a key factor in the early changes in glucose homeostasis following gastric bypass? *Obesity Surgery* 21(6):759–762. <https://doi.org/10.1007/s11695-011-0380-7>.
- [27] Immonen, H., Hannukainen, J.C., Iozzo, P., Soinio, M., Salminen, P., Saunavaara, V., et al., 2014. Effect of bariatric surgery on liver glucose metabolism in morbidly obese diabetic and non-diabetic patients. *Journal of Hepatology* 60(2):377–383. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2013.09.012>.
- [28] Mithieux, G., 2012. Comment about intestinal gluconeogenesis after gastric bypass in human in relation with the paper by Hayes et al. *Obesity Surgery* 22(12). <https://doi.org/10.1007/s11695-012-0755-4>, 1920–2; author reply 1923–4.
- [29] Gutierrez-Repiso, C., Garcia-Serrano, S., Moreno-Ruiz, F.J., Alcain-Martinez, G., Rodriguez-Pacheco, F., Garcia-Fuentes, E., 2017. Jejunal gluconeogenesis associated with insulin resistance level and its evolution after Roux-en-Y gastric bypass. *Surgery for Obesity and Related Diseases: Official Journal of the American Society for Bariatric Surgery* 13(4):623–630. <https://doi.org/10.1016/j.soard.2016.11.021>.
- [30] Barataud, A., Goncalves, D., Vintera, J., Zitoun, C., Duchamp, A., Gautier-Stein, A., et al., 2017. Absence of role of dietary protein sensing in the metabolic benefits of duodenal-jejunal bypass in the mouse. *Scientific Reports* 7. <https://doi.org/10.1038/srep44856>.
- [31] Odstrcil, E.A., Martinez, J.G., Santa Ana, C.A., Xue, B., Schneider, R.E., Steffer, K.J., et al., 2010. The contribution of malabsorption to the reduction in net energy absorption after long-limb Roux-en-Y gastric bypass. *American Journal of Clinical Nutrition* 92(4):704–713. <https://doi.org/10.3945/ajcn.2010.29870>.
- [32] Penhoat, A., Mutel, E., Amigo-Correig, M., Pillot, B., Stefanutti, A., Rajas, F., et al., 2011. Protein-induced satiety is abolished in the absence of intestinal gluconeogenesis. *Physiology & Behavior* 105(1):89–93. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2011.03.012>.
- [33] Li, Z.S., Schmauss, C., Cuenca, A., Ratcliffe, E., Gershon, M.D., 2006. Physiological modulation of intestinal motility by enteric dopaminergic neurons and the D2 receptor: analysis of dopamine receptor expression, location, development, and function in wild-type and knock-out mice. *Journal of Neuroscience* 26(10):2798–2807. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4720-05.2006>.
- [34] Mithieux, G., Daniele, N., Payrastra, B., Zitoun, C., 1998. Liver microsomal glucose-6-phosphatase is competitively inhibited by the lipid products of phosphatidylinositol 3-kinase. *Journal of Biological Chemistry* 273(1):17–19.
- [35] Rajas, F., Bruni, N., Montano, S., Zitoun, C., Mithieux, G., 1999. The glucose-6-phosphatase gene is expressed in human and rat small intestine: regulation of expression in fasted and diabetic rats. *Gastroenterology* 117(1):132–139.
- [36] Le Roux, C.W., Borg, C., Wallis, K., Vincent, R.P., Bueter, M., Goodlad, R., et al., 2010. Gut hypertrophy after gastric bypass is associated with increased glucagon-like peptide 2 and intestinal crypt cell proliferation. *Annals of Surgery* 252(1):50–56. <https://doi.org/10.1097/SLA.0b013e3181d3d21f>.
- [37] Liu, W., Zassoko, R., Mele, T., Luke, P., Sun, H., Liu, W., et al., 2008. Establishment of duodenojejunal bypass surgery in mice: a model designed for diabetic research. *Microsurgery* 28(3):197–202. <https://doi.org/10.1002/micr.20454>.
- [38] Woods, M., Lan, Z., Li, J., Wheeler, M.B., Wang, H., Wang, R., 2011. Anti-diabetic effects of duodenojejunal bypass in an experimental model of diabetes induced by a high-fat diet. *British Journal of Surgery* 98(5):686–696. <https://doi.org/10.1002/bjs.7400>.
- [39] Mokadem, M., Zechner, J.F., Margolskee, R.F., Drucker, D.J., Aguirre, V., 2014. 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. *Molecular Metabolism* 3(2):191–201. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2013.11.010>.
- [40] Liou, A.P., Paziuk, M., Luevano, J.-M., Machineni, S., Turnbaugh, P.J., Kaplan, L.M., 2013. Conserved shifts in the gut microbiota due to gastric

- bypass reduce host weight and adiposity. *Science Translational Medicine* 5(178):178ra41. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3005687>.
- [41] Nestoridi, E., Kvas, S., Kucharczyk, J., Stylopoulos, N., 2012. Resting energy expenditure and energetic cost of feeding are augmented after Roux-en-Y gastric bypass in obese mice. *Endocrinology* 153(5):2234–2244. <https://doi.org/10.1210/en.2011-2041>.
- [42] Hu, S., Wang, L., Yang, D., Li, L., Togo, J., Wu, Y., et al., 2018. Dietary fat, but not protein or carbohydrate, regulates energy intake and causes adiposity in mice. *Cell Metabolism* 28(3):415–431. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2018.06.010>.
- [43] Kolodziejczak, D., Spanier, B., Pais, R., Kraiczky, J., Stelzl, T., Gedrich, K., et al., 2013. Mice lacking the intestinal peptide transporter display reduced energy intake and a subtle maldigestion/malabsorption that protects them from diet-induced obesity. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology* 304(10):G897–G907. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00160.2012>.
- [44] Soty, M., Penhoat, A., Amigo-Correig, M., Vinera, J., Sardella, A., Vullin-Bouilloux, F., et al., 2014. A gut–brain neural circuit controlled by intestinal gluconeogenesis is crucial in metabolic health. *Molecular Metabolism* 4(2): 106–117. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2014.12.009>.
- [45] Mathes, C.M., Spector, A.C., 2012. Food selection and taste changes in humans after Roux-en-Y gastric bypass surgery: a direct-measures approach. *Physiology & Behavior* 107(4):476–483. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2012.02.013>.
- [46] Le Roux, C.W., Bueter, M., Theis, N., Werling, M., Ashrafian, H., Löwenstein, C., et al., 2011. Gastric bypass reduces fat intake and preference. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 301(4):R1057–R1066. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00139.2011>.
- [47] Schultes, B., Ernst, B., Wilms, B., Thurnheer, M., Hallschmid, M., 2010. Hedonic hunger is increased in severely obese patients and is reduced after gastric bypass surgery. *American Journal of Clinical Nutrition* 92(2):277–283. <https://doi.org/10.3945/ajcn.2009.29007>.
- [48] Goncalves, D., Barataud, A., De Vadder, F., Vinera, J., Zitoun, C., Duchamp, A., et al., 2015. Bile routing modification reproduces key features of gastric bypass in rat. *Annals of Surgery* 262(6):1006–1015. <https://doi.org/10.1097/SLA.0000000000001121>.
- [49] Moehlecke, M., Andriatta Blume, C., Rheinheimer, J., Trindade, M.R.M., Crispim, D., Leitão, C.B., 2017. Early reduction of resting energy expenditure and successful weight loss after Roux-en-Y gastric bypass. *Surgery for Obesity and Related Diseases: Official Journal of the American Society for Bariatric Surgery* 13(2):204–209. <https://doi.org/10.1016/j.soard.2016.08.027>.
- [50] Tam, C.S., Rigas, G., Heilbronn, L.K., Matisan, T., Probst, Y., Talbot, M., 2016. Energy adaptations persist 2 Years after sleeve gastrectomy and gastric bypass. *Obesity Surgery* 26(2):459–463. <https://doi.org/10.1007/s11695-015-1972-4>.
- [51] Browning, M.G., Franco, R.L., Cyrus, J.C., Celi, F., Evans, R.K., 2016. Changes in resting energy expenditure in relation to body weight and composition following gastric restriction: a systematic review. *Obesity Surgery* 26(7): 1607–1615. <https://doi.org/10.1007/s11695-016-2184-2>.

