



**HAL**  
open science

# **A-gustducine intestinale : implication dans l'obésité et le diabète de type 2**

Léa Le Gléau

► **To cite this version:**

Léa Le Gléau. *A-gustducine intestinale : implication dans l'obésité et le diabète de type 2*. Endocrinologie et métabolisme. Sorbonne Université, 2021. Français. NNT : 2021SORUS239 . tel-03481972

**HAL Id: tel-03481972**

**<https://theses.hal.science/tel-03481972v1>**

Submitted on 15 Dec 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.



## Sorbonne Université

Ecole doctorale Physiologie, Physiopathologie et Thérapeutique

*UMRS 1269, INSERM, équipe NutriOmics : Nutrition and Obesities: systemic approaches*

# **$\alpha$ -gustducine intestinale : implication dans l'obésité et le diabète de type 2**

Par Léa Le Gléau

Thèse de doctorat en vue de l'obtention du grade de  
Docteur de Sorbonne Université  
Spécialité : Physiologie, physiopathologie et thérapeutique

Dirigée par les Dr. Agnès Ribeiro et Pr. Patricia Serradas

Présentée et soutenue publiquement le 30 mars 2021 à Paris

Devant un jury composé de :

Pr. Bruno Fève

Président

Dr. Anne-Françoise Burnol

Rapportrice

Dr. Loïc Briand

Rapporteur

Dr. Isabelle Gross

Examinatrice

Dr. Hervé Blottière

Examineur

Dr. Agnès Ribeiro

Co-directrice

Pr. Patricia Serradas

Co-directrice

## Remerciements

Je voudrais adresser mes premiers remerciements aux membres du jury qui ont bien voulu examiner mon travail. Merci au Pr Bruno Fève d'avoir accepté de présider ce jury. Je remercie aussi le Dr Anne-Françoise Burnol qui a suivi mon travail de thèse en tant qu'experte scientifique pendant mes comités de suivi de thèse et qui a accepté d'être rapportrice. Merci également au Dr Loïc Briand de m'accorder de son temps afin d'évaluer mon travail en tant que rapporteur. Je souhaite aussi remercier Dr Isabelle Gross et Dr Hervé Blottière d'avoir accepté d'être examinateurs dans ce jury de thèse.

J'aimerais également remercier le Dr Bertrand Blondeau qui a été mon tuteur tout au long de ma thèse.

Merci aussi à Véronique Douard, qui m'a encadrée lors de mon stage de M2 à l'INRA de Jouy-en-Josas et qui m'a encouragée à passer le concours de l'école doctorale.

Je souhaite remercier tous les membres de l'ex-équipe d'Armelle Leturque aux Cordeliers qui m'ont accueillie au début de ma thèse : Armelle bien-sûr, Véronique, Sylvie, Sophie, Michèle, Alexandra. Merci à Ingrid avec qui nous avons partagé des souris, Sara ma camarade de formation expérimentation animale, Doriane, Barbara, Margaux...

Merci aussi à tous les membres de l'unité NutriOmics de la Pitié Salpêtrière qui m'ont accueillie au début de ma deuxième année de thèse. Je remercie Karine Clément, pour son accueil et ses précieux conseils scientifiques lors de chacune de mes présentations en réunion du lundi.

Un grand merci à mes deux directrices de thèse Agnès et Patricia. Merci pour votre bienveillance, votre gentillesse, votre patience, vos conseils. Ces 3 années et demie ont été une très bonne expérience pour moi, j'ai appris beaucoup de choses grâce à vous et j'en ressors grandie.

Je remercie aussi PROFESSEUR Hédi Soula, pour son aide lorsque je n'arrivais à rien sur R (tous les jours) et pour sa bonne humeur. Merci Christine Rouault pour ton aide, ta disponibilité, tes explications et ta patience. Je souhaite également remercier Fabrizio pour toutes ses idées et propositions qui m'ont permis d'améliorer mon projet initial.

Merci Céline (je sais que tu adores lire les remerciements dans toutes les thèses), tu as été la première à me former sur les manips comme les RT-qPCR, etc. Tu as commencé ta thèse quand nous déménagions à la Pitié Salpêtrière et je te souhaite beaucoup de courage pour les prochains mois qui risquent d'être intenses !

Un immense merci à l'open-space et tous ses membres ! Chloé toujours pleine d'énergie, merci pour tes conseils. Pierre, je te souhaite beaucoup de courage pour mener à bout ta thèse dans ce contexte. Gracias Adela o Rachel (y Elsie) pour ta bonne humeur, tes dessins, tes chansons, ton (petit) grain de folie. Merci Elie (comme promis je te cite avant Clémentine), le petit nouveau et déjà nommé animateur de l'open-space, on se retrouve bientôt sur Among us. Clémentine, petite stagiaire pour le moment, j'espère que tes projets se réaliseront, ce fut un plaisir de me sentir vieille avec toi lorsque je ne comprenais pas le langage des jeunes, tu es le S.

Merci à la team des futurs riches, j'y crois, un jour nous aurons les bons numéros à l'euro millions ! Camille, considérée membre de l'open-space depuis le premier confinement, merci pour ta bonne humeur, tes petites folies, ta confiance pour la garde Sirius ! Tu m'as fait aimer les chats ! Je te souhaite plein de bonnes choses pour ton nouveau départ.

Jean Modestie Bienveillance (si je me souviens bien de tes 2<sup>ème</sup> et 3<sup>ème</sup> prénoms), je te remercie pour toute l'aide que tu m'as apportée ces dernières années, je te dois des tonnes de lasagnes (et quelques kig ha farz), merci surtout pour ton soutien, ta bienveillance (sincèrement). Tu es maintenant le prochain à soutenir (cette année, c'est la bonne !). Je te souhaite bon courage pour la fin et bonne continuation aux uaises. (Et non, je ne reviendrais pas sur la fameuse phrase que tu m'as dite en sortant de l'ascenseur.)

Lise, voix de la sagesse ou de la maturité (selon Elie), je te remercie également pour ton aide et surtout pour ta patience, ta gentillesse, ton écoute, ton soutien à chaque fois que j'en ai eu besoin. Merci de m'avoir aidé à retrouver mes affaires à chaque fois qu'elles étaient perdues ou plutôt cachées ... Lorsque je suis arrivée dans l'open-space, nous étions dos à dos, séparées par une jungle qui nous empêchait de nous voir et j'ai eu la chance de terminer en étant ta voisine. (Je compte évidemment sur toi pour la newsletter.)

Je remercie également Florian (mon maître dans l'art de la mal-bouffe), Tiphaine (ma copine de stress, bon courage pour ton oral !), Solia, Geneviève, Sterenn, Marion...

J'ai une pensée particulière pour Licia, hyperactive et toujours de bonne humeur.

Je remercie aussi Florence Deknuydt qui est souvent rentrée tard chez elle à cause de mes manip de tri cellulaires ...

J'aimerais aussi remercier toutes les personnes qui m'ont soutenu de plus loin, Laura, Romain...

Maëva, tu m'as finalement rejointe à Paris et nous avons eu la brillante idée d'instaurer un rituel tous les dimanches soirs ... 2 semaines avant le couvre-feu. La bonne excuse pour oublier de faire les séances de sport que nous avions prévues.

Merci à Marion, Estelle, Audrey pour votre soutien et vos petits messages à distance, on se retrouve bientôt je l'espère autour d'un mojito au Havana. Je n'oublie pas Jefferson que je remercie pour tous les memes qu'il m'envoie via Instagram et qui remontent le moral.

Ευχαριστώ Θεοδώρα ! Ma drama queen préférée, merci à toi qui me supporte et me soutien depuis de longues années. Merci d'être toujours là pour me booster quand il le faut et me remonter le moral si besoin.

Je remercie toutes celles et ceux qui m'ont aidé ou soutenu pendant ma thèse et que j'aurais oublié de citer...

Enfin, j'adresse un immense merci à ma famille, mes parents qui m'ont toujours soutenu et qui endurent mes crises de nerfs ou de stress depuis toujours. Merci à mes frères, merci Florent : tu avais raison, la thèse est une super expérience ! Merci Gautier : mon nouveau conseiller pôle emploi. Je remercie mes belles-sœurs Morgane et Lucie et évidemment ma tribu de neveux et nièces dont les dessins recouvrent chaque mur de mon studio : Simon, Louise, Timothée, Juliette et Ninon. (Simon, tu m'as vu écrire quelques pages de ce manuscrit, tu pourras essayer de les lire quand tu auras terminé Harry Potter ;) ).

## Table des matières

<b>Table des figures</b> .....	<b>7</b>
<b>Abréviations</b> .....	<b>8</b>
<b>Avant-propos</b> .....	<b>13</b>
<b>Introduction</b> .....	<b>16</b>
<b>Partie 1 : Organisation anatomique et fonctionnelle de l'intestin</b> .....	<b>16</b>
<b>A) Anatomie de l'appareil digestif</b> .....	<b>16</b>
1) L'intestin grêle .....	16
2) Le côlon .....	20
<b>B) L'épithélium intestinal</b> .....	<b>20</b>
1) Les cellules souches.....	21
2) Les cellules épithéliales différenciées .....	23
3) Le lignage absorptif et sécréteur.....	26
4) Le lignage entéroendocrine.....	27
<b>Partie 2 : Fonctions de l'intestin</b> .....	<b>31</b>
<b>A) Fonction endocrine de l'intestin</b> .....	<b>31</b>
1) Les différentes entérohormones.....	31
2) Le Glucagon-Like Peptide-1.....	36
a. Biosynthèse, maturation et inactivation du GLP-1.....	36
Transcription du preproglucagon.....	36
Maturation post-traductionnelle du preproglucagon .....	37
La proconvertase 1/3 .....	37
b. Sécrétion du GLP-1 et inactivation .....	39
c. Effets physiologiques du GLP-1 .....	43
<b>B) Absorption des protéines alimentaires</b> .....	<b>45</b>
1) Digestion des protéines alimentaires.....	46
2) Captage des protéines alimentaires.....	47
3) Export des acides aminés des entérocytes .....	49
<b>C) Absorption des lipides</b> .....	<b>49</b>
1) Digestion des lipides.....	50
2) Captage des acides gras .....	52
3) Trafic entérocytaire des acides gras.....	52

4) Formation des chylomicrons .....	53
5) Transit des triglycérides .....	53
<b>D) Absorption des sucres.....</b>	<b>54</b>
<b>Partie 3 : Signalisation du goût sucré dans l'intestin .....</b>	<b>57</b>
<b>A) Structure des glucides et des édulcorants.....</b>	<b>57</b>
1) Les glucides.....	57
2) Les édulcorants.....	60
<b>B) La voie de transduction du goût sucré .....</b>	<b>64</b>
1) Le récepteur du goût sucré .....	64
2) La gustducine : protéine G couplée aux récepteurs du goût sucré .....	66
3) La phospholipase C- $\beta$ 2, l'effecteur de la gustducine .....	68
4) Conséquence d'un défaut de signalisation dans la transduction du goût sucré .....	71
<b>Partie 4 : L'intestin dans les pathologies métaboliques .....</b>	<b>74</b>
<b>A) L'obésité et le diabète de type 2 .....</b>	<b>74</b>
1) L'obésité .....	74
2) Le diabète de type 2.....	78
<b>B) Dysbiose du microbiote .....</b>	<b>79</b>
<b>C) Conséquences des maladies métaboliques sur la fonction endocrine.....</b>	<b>82</b>
1) Dans l'obésité .....	83
2) Dans le diabète de type 2.....	83
<b>D) Thérapeutiques .....</b>	<b>84</b>
1) Traitements du DT2 basés sur l'effet incretine du GLP-1 .....	84
a. Analogue du GLP-1 .....	84
b. Inhibiteur de DPP-4.....	89
2) Chirurgie bariatrique .....	90
<b>Objectifs.....</b>	<b>96</b>
<b>Résultats .....</b>	<b>99</b>
<b>Résultats 1 : Etude de l'expression des gènes de la voie de transduction du goût sucré lors de la mise en place des maladies métaboliques et de la rémission du diabète.....</b>	<b>100</b>
<b>A/ Etude de l'expression des gènes de la voie de transduction du goût sucré dans les cellules entéroendocrines murines lors de la mise en place des maladies métaboliques.</b>	

1) Mise au point d'une méthode de tri cellulaire pour obtenir une population enrichie en cellules entéroendocrines murines.....	101
2) Mise en place des maladies métaboliques .....	104
3) Etude de l'expression des gènes de la transduction du goût sucré dans les cellules entéroendocrines murines.....	106
<b>B/ Etude de l'expression des gènes de la voie de transduction du goût sucré dans les cellules entéroendocrines murines lors de la rémission du diabète. ....</b>	<b>108</b>
1) Amélioration métabolique après remodelage intestinal.....	108
2) Etude de l'Expression de <i>Gnat3</i> dans l'intestin de souris après amélioration métabolique.....	110
<b>Résultats 2 : Etude de l'impact du microbiote intestinal sur l'expression de <i>Gnat3</i> dans le jéjunum de souris. ....</b>	<b>112</b>
A/ Vérification de l'altération du microbiote intestinal par un régime gras. ....	112
B/ Impact du transfert de microbiote des souris donneuses sur le microbiote des souris receveuses .....	114
C/ Le microbiote intestinal a-t-il un rôle dans l'expression de <i>Gnat3</i> ? .....	115
<b>Résultats 3 : Analyse de l'expression des gènes de la voie de transduction du goût sucré dans les cellules entéroendocrines humaines dans un contexte d'obésité avec ou sans diabète de type 2. ....</b>	<b>117</b>
A/ Analyse du profil transcriptomique des cellules entéroendocrines humaines dans les maladies métaboliques .....	118
B/ Expression des gènes de la voie de transduction du goût sucré dans l'intestin dans un contexte d'obésité humaine avec ou sans diabète de type 2. ....	121
<b>Articles correspondant aux résultats .....</b>	<b>124</b>
Article 1 soumis Le Gléau <i>et al</i> , American Journal of Physiology – Endocrinology and Metabolism .....	125
Article 2 publié Osinski <i>et al</i> , 2021, International Journal of Obesity .....	126
<b>Discussion générale, perspectives et conclusion.....</b>	<b>128</b>
<b>Références bibliographiques .....</b>	<b>139</b>
<b>Annexes .....</b>	<b>162</b>
Annexe 1 : Communications orales et affichées, et formations .....	163
Annexe 2 : Article publié Bel Lassen <i>et al</i> , 2020, Obesity .....	165
Annexe 3: Article soumis Ayari <i>et al</i> , Molecular Metabolism.....	166



## Table des figures

Figure 1: Anatomie du système digestif et des organes annexes chez l'Homme.....	17
Figure 2: Structure de la paroi intestinale.....	19
Figure 3: Organisation fonctionnelle de l'épithélium intestinal dans l'intestin grêle.....	22
Figure 4: Principaux facteurs de transcription impliqués dans le lignage des cellules épithéliales intestinales.....	25
Figure 5: Principaux facteurs de transcription impliqués dans la différenciation des cellules entéroendocrines.....	30
Figure 6: Maturation post-traductionnelle tissu spécifique du proglucagon.....	38
Figure 7: Expression du Glucagon-like peptide-1 intestinal.....	40
Figure 8: Mécanismes de la sécrétion du GLP-1 en réponse aux sucres.....	42
Figure 9: Effets physiologiques du GLP-1.....	44
Figure 10: Absorption des acides aminés par les entérocytes.....	48
Figure 11: Absorption des lipides alimentaires par les entérocytes.....	51
Figure 12: Transporteurs du glucose, galactose et fructose dans les entérocytes.....	56
Figure 13: Le récepteur T1R2 et T1R3.....	65
Figure 14: Activation de la protéine hétérotrimérique G.....	67
Figure 15: Mécanismes de transduction du goût sucré.....	70
Figure 16: Caractéristiques des phénotypes « obèses ».....	76
Figure 17: Evolution du microbiote de la naissance à l'âge adulte.....	81
Figure 18: Structure A) du GLP-1 et des analogues du GLP-1 : B) Exenatide, C) Liraglutide, D) Exenatide hebdomadaire, E) Lixisenatide, F) Albiglutide et G) Dulaglutide.....	86
Figure 19: A) Anneau gastrique ajustable, B) Sleeve gastrectomie et C) Bypass gastrique. ...	91
Figure 20: Chirurgie d'entéro-gastro-anastomose.....	94
Figure 21: Expression de marqueurs spécifiques des différentes cellules épithéliales intestinales dans des cellules murines triées.....	103
Figure 22: Mise en place des maladies métaboliques dans un modèle murin.....	105
Figure 23: Expression des gènes de la transduction du goût sucré dans des cellules entéroendocrines murines triées après 3 et 12 semaines de régimes.....	107
Figure 24: Modèle murin d'amélioration métabolique.....	109
Figure 25: Expression de <i>Gnat3</i> dans l'intestin des souris sham et EGA après chirurgie.....	111
Figure 26: Transfert de microbiote dysbiotique chez la souris.....	113
Figure 27: Expression de <i>Gnat3</i> dans l'épithélium jéjunal de souris après transfert de microbiote.....	116
Figure 28: Profil transcriptomique des cellules entéroendocrines chez l'Homme obèse avec ou sans diabète de type 2.....	119
Figure 29: Le diabète dans un contexte d'obésité altère le lignage entéroendocrine et la densité des cellules sécrétrices de GLP-1.....	121
Figure 30 : Etude de la voie de transduction du goût sucré dans les cellules entéroendocrines de sujets obèses avec ou sans diabètes de type 2.....	123

## Abréviations

**5-HT** : 5-hydroxytryptamine

**5-HTP** : 5-hydroxy-L-tryptophane

**ABSI** : A body shape index

**ADN** : Acide desoxyribonucléique

**AMPc** : Adénosine Monophosphate cyclique

**ANSES** : Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail

**APOA4** : Apolipoprotéine A4

**ARN** : Acide ribonucléique

**ATP** : Adénosine triphosphate

**Arx** : Aristaless related homeobox

**CBC** : Crypt base columnar cell

**CCK** : Cholécystokinine

**CD** : control diet

**CD26** : Cluster of differentiation 26

**CHGA** : Chromogranine A

**CRP** : Protéine C réactive

**DAG** : Diacylglycerol

**DAT** : Domaine amino-terminal

**DGAT** : Diacylglycerol acyltransferase

**DJA** : Dose journalière admissible

**DPP-4** : Dupeptidyl peptidase-4

**DRC** : Domaine riche en cystéine

**DT2** : Diabète de type 2

**DSS** : Dextran sulfate sodium

**DTM** : Domaine transmembranaire

**EAAC1** : Excitatory amino-acid carrier 1

**EGA** : Entéro-gastro-anastomose

**FABP<sub>pm</sub>** : plasma membrane Fatty acid-binding protein

**FACS** : Fluorescence activated cell sorting

**FAO** : Food and Agriculture Organisation

**FAT** : Fatty acid transporter

**FATP** : Fatty acid transporter protein

**FoxA1** : Forkhead box A1

**FoxA2** : Forkhead box A2

**GCG** : proglucagon

**GDP** : Guanosine diphosphate

**GEF** : Guanine nucleotide exchange factor

**GFI1** : Growth factor independent-1

**GIP** : Glucose insulintropic peptide

**GLP-1** : Glucagon-like peptide-1

**GLUT2** : Glucose transporter 2

**GLUT5** : Glucose transporter 5

**GNAT3** : Guanine nucleotide-binding protein G(t) subunit alpha-3

**GPR119** : G protein-coupled receptor 119

**GRPP** : Glicentin-related pancreatic peptide

**GTP** : Guanosine triphosphate

**HFD** : High fat diet

**HFD-HF** : High fat diet – high fructose

**IMC** : Indice de masse corporelle

**Incretin** : Intestin secretion insulin

**IP1** : Intervening peptide 1

**IP2** : Intervening peptide 2

**IP2** : Inositol 1,4,5-trisphosphate

**Isl1** : Islet 1

**ITT** : Insulin tolerance test

**LAT** : L amino acid transporter

**LEF** : Lymphoid enhancer binding factor

**LGR5** : Leucine-rich-repeat-containing G protein-coupled receptor

**LRC** : Label-retaining cell

**LYZ** : Lysozyme

**MAG** : monoacylglycerol

**MPF** : Major proglucagon factor

**MTP** : Microsomal triglyceride transfer protein

**NAA** : Neutral amino acid

**NGN3** : Neurogenin-3

**NHE3** : Sodium – hydrogen exchanger

**NT** : Neurotensine

**NTS** : Noyau du tractus solitaire

**Ob** : Obèse

**ObD** : Obèse Diabétique

**OGTT** : Oral glucose tolerance test

**OMS** : Organisation Mondiale de la santé

**PAT1** : Proton-coupled amino acid transporter

**Pax4** : Paired homeobox 4

**Pax6** : Paired homeobox 6

**PC1/3** : Prohormone convertase 1/3

**PC2** : Prohormone convertase 2

**PCTV** : Pre-chylomicron transport vesicle

**Pdx1** : Pancreatic and duodenal homeobox 1

**PEPT1** : Peptide transporter 1

**PI3K** : Phosphoinositide-3-kinase

**PIP2** : Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate

**PNNS** : Programme national nutrition santé

**PPAR  $\beta/\delta$**  : Peroxisome proliferator-activated receptor  $\beta/\delta$

**PS** : Peptide signal

**PYY** : Peptide tyrosine tyrosine  
**RBPJ** : Recombination signal binding protein J  
**RCPG** : Récepteur couplé aux protéines G  
**RYGB** : Roux-en-Y gastric bypass  
**SGLT1** : Sodium glucose co-transporter-1  
**SLC** : Solute carrier family  
**T1R2** : Taste receptor type 1 member 2  
**T1R3** : Taste receptor type 1 member 3  
**TAG** : Triacylglycerol  
**TAT** : T-type amino acid transporter  
**TCF** : T-cell specific transcription factor  
**TCF7L2** : Transcription factor 7 like 2  
**VFT** : Venus flytrap

# Avant-propos

## Avant-propos

J'ai réalisé ma thèse sous la direction des Pr Patricia Serradas et Dr Agnès Ribeiro, d'abord au Centre de Recherche des Cordeliers dans l'équipe « Physiopathologies intestinales : nutrition et fonction de barrière » dirigée par la Dr Armelle Leturque, puis dans l'unité de recherche « NutriOmics – Nutrition and Obesities: systemic approaches » dirigée par la Pr Karine Clément.

L'augmentation de la prévalence des maladies métaboliques telles que l'obésité et le diabète de type 2 est devenue un problème majeur de santé publique dans le monde. Ces maladies chroniques, associées à des dysfonctionnements de l'homéostasie énergétique, représentent des facteurs de risque de maladies cardiovasculaires et augmentent les risques de morbidité et de mortalité. Dans ce contexte, je m'intéresse à l'adaptation de l'intestin et particulièrement des cellules entéroendocrines à l'obésité et au diabète de type 2.

L'intestin constitue un organe central de l'homéostasie énergétique par ses fonctions d'absorption de nutriments et endocrine. L'intestin est considéré comme un organe endocrine majeur de par sa taille et le nombre élevé d'hormones sécrétées par les cellules entéroendocrines. Ces cellules représentent 1% des cellules épithéliales intestinales et sont dispersées tout au long de l'intestin. Elles sécrètent une vingtaine d'hormones, ou entérohormones, qui participent à la digestion et à la régulation de l'homéostasie énergétique par exemple.

Il a été observé chez les patients atteints d'obésité avec ou sans diabète de type 2, une diminution de la concentration plasmatique en entérohormones. Parmi ces entérohormones, le glucagon-like peptide-1 (GLP-1) est connu pour potentialiser la sécrétion d'insuline en réponse à une ingestion de glucose (effet incrétine) et ainsi participer au maintien de l'homéostasie énergétique. Des analogues stables du GLP-1 ou des inhibiteurs de dipeptidylpeptidase-IV, l'enzyme dégradant le GLP-1 dans l'intestin, constituent des outils thérapeutiques privilégiés dans le diabète de type 2.

Dans ce contexte de maladies métaboliques, notre objectif est de comprendre par quels mécanismes la fonction sécrétoire des cellules entéroendocrines est altérée. **J'ai fait l'hypothèse que la voie de transduction du goût sucré pouvait être une des voies clés par**

**laquelle la sécrétion d'entérohormones est diminuée chez les patients atteints d'obésité et/ou de diabète de type 2.**

L'un des principaux stimuli de la sécrétion du GLP-1 est la détection de glucides. Dans l'intestin, les sucres sont absorbés d'une part par les transporteurs (SGLT-1 et GLUT) et d'autre part sont détectés par le récepteur T1R2/T1R3 impliqués dans la transduction du goût sucré.

Le récepteur T1R2/T1R3 est un hétérodimère couplé à une protéine G, la gustducine, composée de trois sous-unités :  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$  codées respectivement par les gènes *GNAT3*, *GNB3* et *GNG13*. L'activation de la signalisation du goût sucré par des glucides ou édulcorants conduit à l'exocytose des vésicules de sécrétion contenant le GLP-1. Cette voie de signalisation a été étudiée essentiellement dans la bouche, au niveau des papilles gustatives et peu dans l'intestin. Pourtant, l'inactivation des gènes codant pour le récepteur du goût sucré ou l' $\alpha$ -gustducine entraîne la perte de sécrétion de GLP-1 en réponse au glucose.

**Dans le cadre de ma thèse, je me suis intéressée à la voie de transduction du goût sucré dans l'intestin, lors de la mise en place des maladies métaboliques et de la rémission du diabète de type 2.**

L'introduction de ce manuscrit détaille les points importants sur lesquels porte mon travail. Je décris notamment l'organisation fonctionnelle de l'intestin grêle, sa fonction endocrine et l'hormone incrétine GLP-1 en particulier, ainsi que l'absorption et la détection des sucres. La voie de signalisation du goût sucré étant centrale pour la sécrétion du GLP-1 en réponse aux sucres, elle fait l'objet d'un chapitre de l'introduction. L'intestin, de par son renouvellement continu, a la capacité de s'adapter à son environnement, qu'il soit physiologique ou pathologique. Je décris dans une dernière partie de l'introduction, l'impact des maladies métaboliques que sont l'obésité et le diabète de type 2 sur le microbiote intestinal ainsi que sur la fonction endocrine de l'intestin. Les résultats de mon travail de thèse font l'objet de deux articles, un que je signe en tant que première auteure (soumis pour publication) et un en seconde auteure déjà publié (Osinski *et al*, 2021), présentés à la fin du chapitre « résultats » de ce manuscrit. Je suis également co-auteure de deux autres articles déjà publiés ou soumis pour publication que je présente dans les annexes de ce manuscrit (Bel Lassen *et al*, 2020 ; Ayari *et al*, 2020). Dans les annexes, je détaille également les congrès auxquels j'ai participé ainsi que les formations que j'ai suivies lors de ma thèse.



# Introduction

## Introduction

### Partie 1 : Organisation anatomique et fonctionnelle de l'intestin

L'intestin est un organe majeur de notre organisme, ce qui lui vaut souvent le surnom de « deuxième cerveau ». Dans cette première partie, je présenterai l'anatomie de l'appareil digestif, principalement de l'intestin grêle et du côlon puis je me focaliserai sur l'épithélium intestinal.

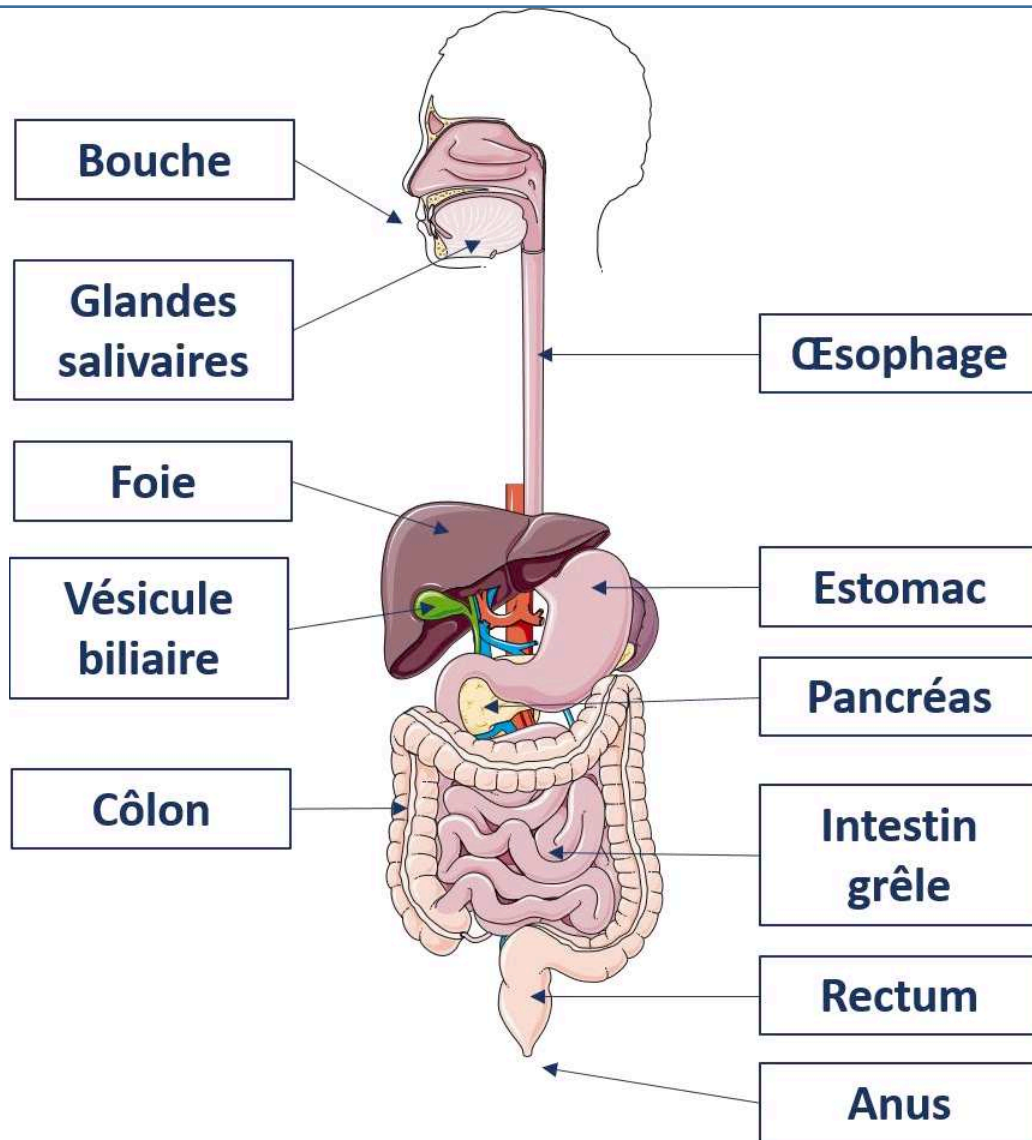
#### A) Anatomie de l'appareil digestif

L'appareil digestif est un ensemble d'organes permettant la digestion des aliments, l'absorption des nutriments et l'évacuation des selles. Ces fonctions sont assurées par la bouche avec la langue, les dents et la salive puis l'œsophage, l'estomac, l'intestin grêle, le côlon, le rectum et l'anus. Des organes annexes tels que le foie, la vésicule biliaire et le pancréas exocrine interviennent également lors de la digestion et l'absorption des nutriments (figure 1) (Amerongen, 2018).

La digestion commence dans la bouche. Les aliments sont broyés lors de la mastication et soumis à l'action des enzymes salivaires. Après la déglutition, le bol alimentaire traverse l'œsophage qui mesure environ 20 cm chez l'Homme (Meyer *et al.*, 1986) pour aboutir dans l'estomac. Les aliments y sont brassés et transformés en chyme. Les contractions péristaltiques de l'estomac entraînent un passage contrôlé du chyme dans l'intestin grêle via le sphincter pylorique situé sur la partie distale de l'estomac (Ramkumar and Schulze, 2005). Les enzymes pancréatiques et les acides biliaires permettent la transformation des aliments en nutriments qui sont alors absorbés par les entérocytes de l'intestin grêle. La partie du chyme non absorbée atteint le côlon où sont absorbés l'eau et certains minéraux. Le reste forme les fèces évacuées par l'anus (Carlson, 2019).

#### 1) L'intestin grêle

L'intestin grêle s'étend du pylore à la valvule iléo-caecale.



**Figure 1: Anatomie du système digestif et des organes annexes chez l'Homme**

L'appareil digestif est composé de la bouche, de l'œsophage, de l'estomac, de l'intestin grêle (duodénum, jéjunum, iléon), du côlon (ascendant, transverse, descendant, sigmoïde), du rectum et de l'anus. Les organes annexes tels que les glandes salivaires, le foie, la vésicule biliaire et le pancréas participent à la digestion des aliments.

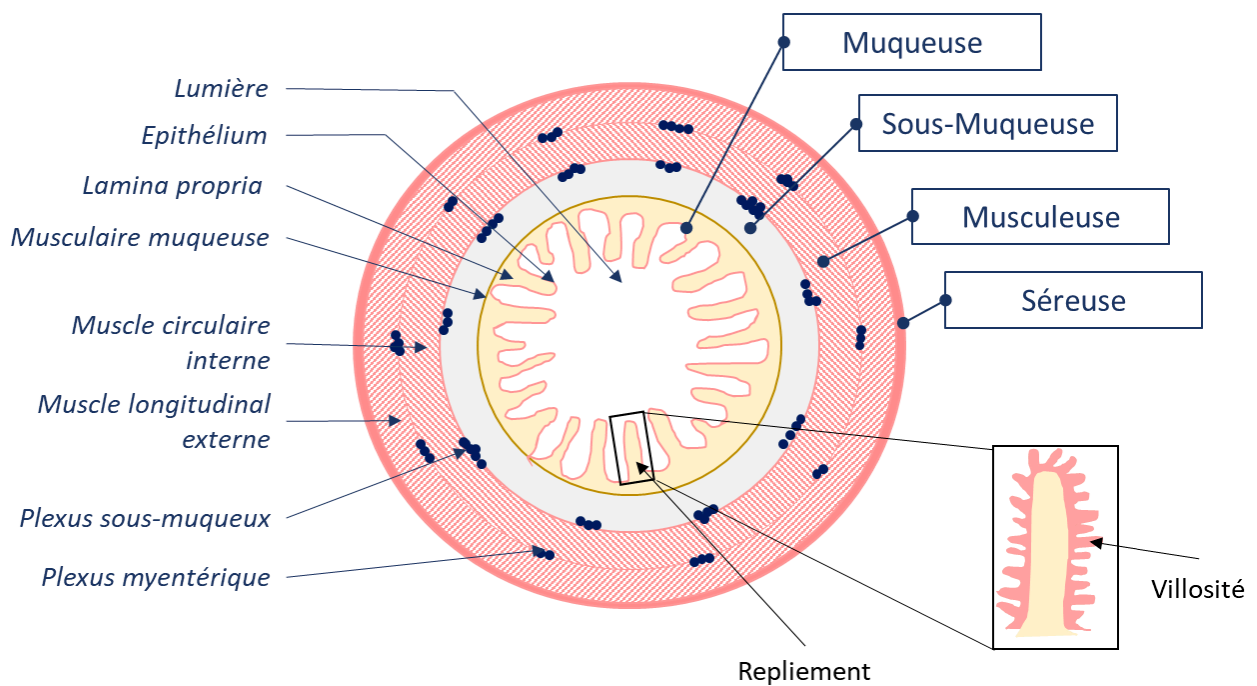
*D'après Amerongen et al, 2015*

Histologiquement, l'intestin grêle se compose de quatre tuniques. La plus externe est la **séreuse** (ou adventice). Elle est composée d'un tissu conjonctif appelé chorion et d'un mésothélium (Amerongen, 2018; Carlson, 2019). La tunique adjacente est la **musculeuse** (ou musculaire) qui assure le péristaltisme faisant avancer le bol alimentaire le long de l'intestin. Elle est composée de deux couches de cellules musculaires lisses : une couche longitudinale et une couche circulaire. Cette musculeuse entoure la **sous-muqueuse** dans laquelle se trouvent des vaisseaux sanguins et lymphatiques. La tunique la plus interne est la **muqueuse**, composée de trois couches. Au contact de la lumière intestinale se trouve la première couche, un épithélium monostratifié formé des villosités et de cryptes. Cet épithélium est soutenu par la seconde couche, la *lamina propria*. Il s'agit d'une fine couche de tissu conjonctif dans lequel se déploient des cellules du système immunitaire périphérique et d'un réseau de vaisseaux sanguins et lymphatiques permettant le transport des nutriments absorbés ainsi que les hormones sécrétées dans l'intestin (Holstein *et al.*, 1996). Sous la *lamina propria*, se trouve la dernière couche : la musculaire muqueuse (ou *muscularis mucosae*) (figure 2).

De nombreuses structures de repliement permettent à l'épithélium d'augmenter considérablement sa surface d'échange avec la lumière intestinale. En effet, la paroi intestinale forme plusieurs plis appelés valvules conniventes qui présentent également des villosités (figure 2). Les cellules épithéliales intestinales elles-mêmes sont composées de microvillosités à leur pôle apical (Carlson, 2019; Xu *et al.*, 2020).

L'intestin est qualifié de « deuxième cerveau » de par le grand nombre de cellules nerveuses qu'il contient. Ce système nerveux est composé du plexus sous-muqueux (ou de Meissner) sous la muqueuse et du plexus myentérique (ou d'Auerbach) entre les deux couches de cellules musculaires de la musculeuse. Ce large réseau de neurones assure la motilité intestinale et une partie de la régulation des fonctions digestives (Carlson, 2019).

L'intestin grêle présente la même structure chez tous les mammifères mais diffère principalement par la longueur. Chez l'Homme, l'intestin grêle mesure environ 6m de long pour environ 2cm de diamètre et se fragmente en 3 segments : le duodénum mesurant environ 25cm, suivi du jéjunum qui mesure environ 2,5m puis l'iléon mesurant 3,5m. Chez le porc, l'intestin grêle mesure entre 16 et 21m de longs (Lewis and Southern, 2000), et environ 50cm chez la souris (Panthier, Aubin Houzelstein and Bellier, 2006). **Dans le cadre de ma thèse, c'est essentiellement le modèle murin que j'ai utilisé.**



**Figure 2: Structure de la paroi intestinale**

Le tube digestif se compose de 4 tuniques tissulaires concentriques. De la plus externe à la plus interne se succèdent la séreuse, la musculeuse, la sous-muqueuse et la muqueuse présentant des repliements couverts de villosités dans l'intestin grêle.

D'après Amerongen *et al*, 2015.

## 2) Le côlon

Comme l'intestin grêle, le côlon est composé des mêmes quatre tuniques, de la séreuse à la muqueuse (Amerongen, 2018). Toutefois, l'épithélium du côlon, contrairement à celui de l'intestin grêle ne comprend pas de villosités mais un épithélium de surface et des cryptes de Lieberkühn, que l'on appelle couramment « cryptes du côlon ». Le côlon a un rôle de stockage et d'élimination des déchets sous forme de fèces. De plus, il permet l'absorption de l'eau, des électrolytes et vitamines (Carlson, 2019).

Chez l'Homme, le côlon mesure 1,5 m de long pour un diamètre de 4 à 8 cm environ. Il commence au cæcum et se poursuit avec le côlon ascendant, le côlon transverse, le côlon sigmoïde puis le rectum qui débouche sur l'anus. La souris possède un cæcum très développé qui précède un côlon mesurant environ 10 cm (Panthier, Aubin Houzelstein and Bellier, 2006). Celui-ci n'est pas organisé en côlon ascendant, transverse et descendant comme chez l'Homme mais simplement côlon proximal et côlon distal (Kararli, 1995).

### B) L'épithélium intestinal

L'épithélium intestinal forme une barrière entre le milieu extérieur et l'organisme. De plus, il assure une fonction immune ainsi que des fonctions d'absorption et de sécrétion permettant la digestion. L'intégrité de l'épithélium intestinal dépend de la coordination précise, dans le temps et l'espace, des processus de prolifération, de différenciation et d'élimination des cellules par anoïkis, un mécanisme d'apoptose activé par la perte d'adhésion cellulaire. L'épithélium intestinal est entièrement renouvelé tous les 4 à 5 jours en moyenne chez l'Homme (Nigro *et al.*, 2018). Ce renouvellement est possible grâce aux cellules souches présentes dans les cryptes.

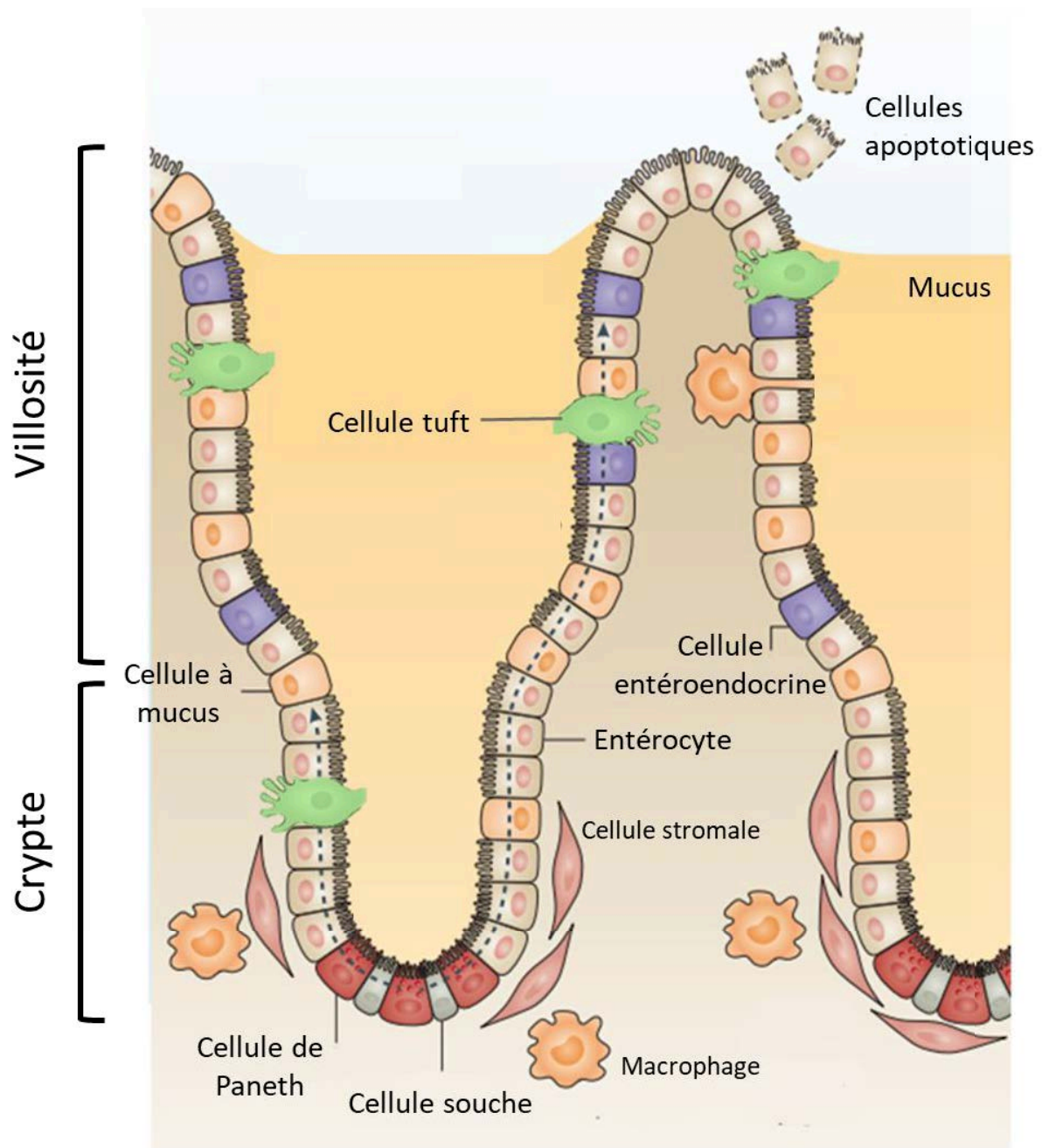
L'épithélium intestinal est une monocouche cellulaire qui s'étend vers le lumen en formant des villosités et présente des invaginations appelées cryptes. Les cryptes sont composées de cellules souches et d'un type de cellules différenciées, les cellules de Paneth. Les villosités contiennent les autres types de cellules différenciées : les entérocytes, les cellules entéroendocrines, les cellules à mucus et les cellules « tuft » (figure 3).

## 1) Les cellules souches

Les **cellules souches** sont réparties en deux groupes distincts. Les cellules souches de la base de la crypte « crypt base columnar cells » (CBC) expriment le marqueur *Leucine-rich-repeat-containing G protein-coupled receptor (Lgr5)* et sont intercalées entre les cellules de Paneth. Ces cellules constituent le principal réservoir de cellules souches. Les cellules CBC sont responsables de la régénération de l'épithélium intestinal. De plus, de récentes études suggèrent que les cellules CBC répondent aux signaux inflammatoires pour moduler leur expansion pendant la régénération de l'épithélium (Asfaha, 2015).

Le second groupe de cellules souches est constitué de cellules souches « label-retaining cells » (LRC+4) localisées en position +4 par rapport au fond de la crypte. Les cellules LRC4+ sont des cellules quiescentes ou à cycle lent qui restent dans les cryptes jusqu'à 4 semaines. Il est admis aujourd'hui que les cellules LRC+4 servent de réserve en cas de blessure (Tian *et al.*, 2011; Buczacki *et al.*, 2013; Barker, 2014). Une autre hypothèse de l'équipe de Buczacki *et al.* est que ces cellules se différencient en cellules de Paneth. En effet, dans un modèle de souris (*Cyp1a1-H2B-YFP*) dont les cellules LRC4+ sont fluorescentes, les auteurs montrent que la densité de ces cellules diminue au cours du temps pendant quatre semaines alors que la densité de cellules de Paneth, observée par une analyse de microscopie confocale, augmente (Buczacki *et al.*, 2013).

Les cellules souches sont monoclonales, indifférenciées et se divisent de manière asymétrique. Une cellule souche donne naissance d'une part à une cellule-fille ayant les mêmes caractéristiques que la cellule-mère, constituant ainsi un réservoir de cellules souches, et d'autre part à une cellule-fille qui prolifère et va donner des cellules différenciées (Scoville *et al.*, 2008). Ces cellules souches permettent le renouvellement de l'intestin. La descendance des cellules souches arrête de proliférer et migre le long de l'axe crypto-villositaire lors de la différenciation. Ainsi les villosités comprennent les différents types de cellules différenciées (figure 3). De plus, dans certains cas, des cellules déjà différenciées peuvent se dédifférencier (Bankaitis *et al.*, 2018).



**Figure 3: Organisation fonctionnelle de l'épithélium intestinal dans l'intestin grêle**

L'intestin grêle s'organise selon deux compartiments : la crypte et la villosité. La crypte constitue le compartiment prolifératif. Au fond des cryptes, les cellules souches prolifèrent et se différencient le long de l'axe crypto-villositaire en différents types cellulaires : les cellules de Paneth, les cellules à mucus, les entérocytes, les cellules entéroendocrines et les cellules « tuft ». Les cellules de Paneth restent au fond des cryptes avec les cellules souches. Les autres cellules différenciées migrent le long de la villosité et sont éliminées par anoïkis.

D'après Peterson & Artis, 2014



## 2) Les cellules épithéliales différenciées

Les cellules épithéliales sont classées en deux grands lignages: cellules absorbatives (les entérocytes) et cellules sécrétrices (mucosécrétrices, Paneth, tuft, entéroendocrines).

Les **entérocytes** ou cellules absorbantes représentent plus de 80% des cellules épithéliales intestinales totales. Elles assurent l'absorption des nutriments présents dans la lumière intestinale tels que l'eau, les sucres, les acides aminés ou les lipides (Gehart and Clevers, 2019). Cette fonction est assurée grâce à la présence de nombreux récepteurs et transporteurs.

Lors de leur différenciation en **cellules de Paneth**, les cellules souches, au lieu de migrer vers le haut des villosités, migrent vers le fond des cryptes. La migration spécifique des cellules de Paneth est régie par les protéines ephrinB2, ephrinB3 et la phosphoinositide-3-kinase (PI3K) (Gehart *et al.*, 2019). Les cellules différenciées sont généralement renouvelées tous les 3 à 5 jours, mais les cellules de Paneth ont une durée de vie de 30 à 60 jours (Clevers and Bevins, 2013; Xu *et al.*, 2020). Ces cellules protègent l'intestin en sécrétant des peptides antimicrobiens tels que les défensines, les cathelicidines ou les lysozymes (Bevins and Salzman, 2011). De plus, les cellules de Paneth forment une niche essentielle aux cellules souches grâce aux facteurs de croissance qu'elles sécrètent (Clevers and Bevins, 2013). En outre, les cellules de Paneth expriment des ligands des voies Wnt et Notch, indispensables au maintien des cellules souches (Nigro *et al.*, 2018). Le facteur de transcription *Sox9* est notamment une cible de la voie de la Wnt et sa délétion spécifique dans l'intestin chez la souris entraîne une diminution des cellules de Paneth dans les cryptes (Mori–Akiyama *et al.*, 2007). Ceci s'accompagne d'une diminution du nombre de cellules souches CBC intercalées avec les cellules de Paneth restantes (Sato *et al.*, 2011).

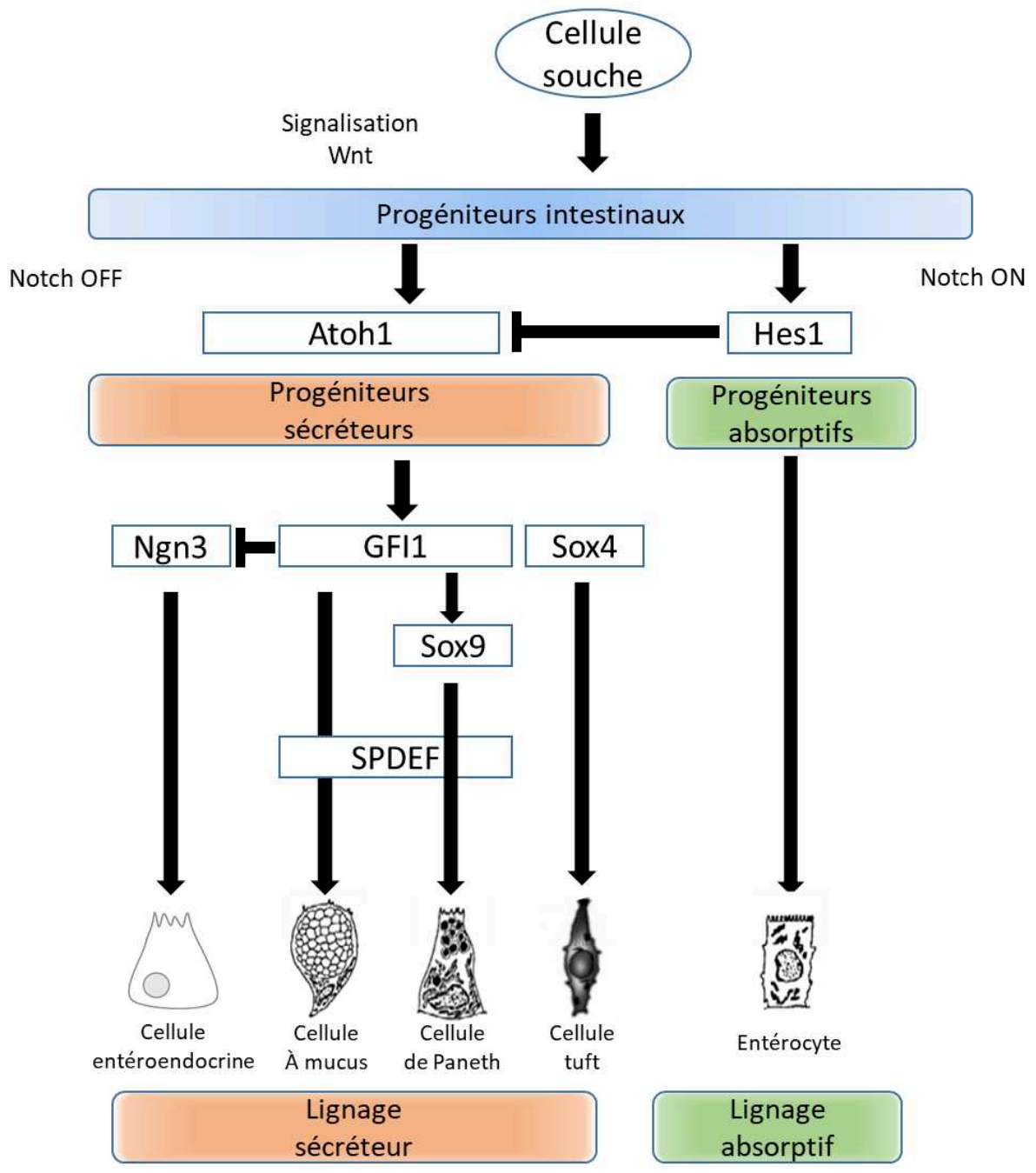
Les **cellules à mucus**, cellules caliciformes ou encore goblet cells (pour leur forme en gobelet), sont les cellules sécrétrices les plus fréquentes, elles représentent environ 16% des cellules épithéliales intestinales totales (Xu *et al.*, 2020). Elles synthétisent, stockent et sécrètent de la mucine, composé principal du mucus qui forme une barrière physique entre le microbiote de la lumière et l'épithélium (Gehart and Clevers, 2019).

Les cellules sécrétrices endocrines intestinales ou **entéroendocrines** représentent uniquement 1% des cellules épithéliales intestinales. Elles sécrètent de nombreuses

hormones impliquées dans la régulation de la prise alimentaire, la vidange gastrique, la motilité intestinale ou l'homéostasie énergétique (Xu *et al.*, 2020). Ainsi, l'intestin est un organe endocrine majeur de par le nombre important de cellules endocrines présentes dans toute sa longueur et la diversité d'hormones qu'il produit. **J'aborderai plus en détail les cellules entéroendocrines plus loin dans cet exposé.**

Les **cellules « tuft »** ou cellules à brosses sont rares, elles représentent moins de 0,4% des cellules épithéliales intestinales totales (Gehart and Clevers, 2019). De plus, ces cellules sont responsables de l'initiation de la réponse immunitaire contre les infections parasitaires aux helminthes (Gerbe *et al.*, 2016).

La différenciation des cellules souches dans les différents types cellulaires est régie par des voies de signalisation ainsi qu'un réseau complexe de facteurs de transcription (figure 4).



**Figure 4: Principaux facteurs de transcription impliqués dans le lignage des cellules épithéliales intestinales**

Au fond des cryptes, les cellules souches prolifèrent et se différencient pour donner les différents types de cellules épithéliales. Sous la dépendance des facteurs de transcription Hes1 ou Math1, les progéniteurs intestinaux vont intégrer le lignage absorbant ou le lignage sécréteur. Dans le lignage sécréteur, l'action du facteur de transcription Ngn3 va entraîner la différenciation des cellules entéroendocrines et Gfi celle des cellules à mucus et des cellules de Paneth pour lesquelles l'action de Spdef est nécessaire, ainsi que Sox9 pour les cellules de Paneth. Sox4 va permettre la différenciation des cellules tuft.

D'après Gribble et al, 2011

### 3) Le lignage absorptif et sécréteur

Les deux voies de signalisation principales, impliquées dans le lignage des cellules épithéliales de l'intestin, sont Notch et Wnt/ $\beta$ -caténine. La  $\beta$ -caténine est une protéine capable de se lier à des protéines d'adhérence : les cadhérines aux niveaux des jonctions cellulaires. Elle peut également se lier à des facteurs de transcription de la famille lymphoid enhancer binding factor/T-cell specific transcription factor (LEF/TCF) et stimuler leur activité. En l'absence de signal Wnt, l'excès de  $\beta$ -caténine produit est dégradé par le protéasome. L'activation de la cascade se produit lorsqu'un ligand de la famille Wnt, une glycoprotéine, se lie à son récepteur (Frizzled). Une cascade d'événements moléculaires conduit alors à l'accumulation de  $\beta$ -caténine qui ne sera pas dégradée mais liée aux facteurs de transcription LEF/TCF afin de stimuler la transcription de gènes cibles. Certains de ces gènes comme la cycline D1, Biglycan ou TIMP3 sont impliqués dans la prolifération des cellules souches (Blanpain, 2007). La voie de signalisation Wnt joue un rôle essentiel dans la régulation de la prolifération et de la différenciation des cellules de l'épithélium intestinal. La surexpression de *dickkopf1*, un inhibiteur de Wnt, entraîne une diminution du nombre de cellules sécrétrices (Takahashi, 2020).

De plus, la voie Notch est essentielle au maintien et à la prolifération des cellules souches avec l'action des signaux Wnt (Tian *et al.*, 2011; Takahashi, 2020). La voie Notch doit son nom au gène *Notch* codant pour le premier élément de la cascade de signalisation de cette voie. Dans l'intestin, le domaine intracellulaire de Notch (Nlic) interagit avec un co-activateur, Recombination signal binding protein J (RBPJ). Cela conduit à la translocation nucléaire du complexe et la transcription de gènes tels que *Hes1*. L'inactivation de Notch en revanche conduit à la transcription d'*Atoh1* et *Ngn3* (Fre *et al.*, 2005; Robine *et al.*, 2005). *Hes1* inhibe l'expression de *Atoh1* (Gui *et al.*, 2017; Castillo-Azofeifa *et al.*, 2019), empêchant ainsi la différenciation des cellules sécrétrices (Jensen *et al.*, 2000) et permettant la différenciation des cellules absorptives, les entérocytes. Lorsque la voie Notch est inactive, *Hes1* n'est pas exprimé et l'expression du facteur de transcription *Atoh1* entraîne la maturation de progéniteurs sécréteurs. Le blocage de cette voie par délétion de RBPJ chez la souris entraîne un arrêt de la prolifération des cellules souches au fond des cryptes qui se différencient alors uniquement en cellules sécrétrices (Jarriault *et al.*, 1995; Fre *et al.*, 2011).

Le facteur de transcription *Atoh1*, autrement appelé *Math1*, induit la différenciation de progéniteurs sécréteurs (Castillo-Azofeifa *et al.*, 2019). L'action du Growth Factor Independent-1 (*Gfi1*) conduit à la formation de cellules à mucus ou cellules de Paneth qui nécessitent également l'action de *Sox9*. La différenciation des cellules tuft est possible via une autre voie sous l'action d'*Atoh1* puis de *Sox4* (Li *et al.*, 2019). Les progéniteurs vont se différencier en cellules entéroendocrines sous l'action de la neurogenin-3 (*Ngn3*) dans un premier temps, puis de nombreux autres facteurs de transcription tels que *Neurod1*, *Arx*, *Foxa1*, *Foxa2*, *Pax4* ou *Pax6* (Ye and Kaestner, 2009; Gehart *et al.*, 2019).

#### 4) Le lignage entéroendocrine

L'utilisation de souris transgéniques a permis de mettre en évidence les gènes impliqués dans la différenciation des cellules entéroendocrines.

Parmi les différents facteurs de transcription impliqués dans le lignage entéroendocrine, la **neurogénine 3** (*Ngn3*) est indispensable à la différenciation de certaines cellules épithéliales. En effet, les souris invalidées pour *Ngn3* ne présentent pas de cellules entéroendocrines et meurent dans les 3 jours après leur naissance (Gradwohl *et al.*, 2000). De plus, la stimulation d'expression de *Ngn3* pendant 8 heures dans des organoïdes intestinaux humains entraîne, après 7 jours, une augmentation du nombre de cellules entéroendocrines de 25% après activation d'une cascade d'autres facteurs de transcription décrits ci-après (Sinagoga *et al.*, 2018).

Chez des souris *Ngn3*<sup>-/-</sup>, *Atoh1* est exprimé, indiquant que *Ngn3* se situe en aval de *Atoh1*. Une inhibition de l'expression de **NeuroD1** est également observée dans ce modèle, ce qui participe à l'absence de cellules entéroendocrines (Jenny *et al.*, 2002). L'invalidation de *NeuroD1* chez la souris entraîne une diminution de cellules entéroendocrines et notamment les cellules sécrétrices de sécrétine et de Cholécystokinine (CCK) (Naya *et al.*, 1997).

Chez la souris, l'invalidation d'**Aristaless related homeobox (Arx)** entraîne une diminution du nombre de cellules entéroendocrines sécrétrices de Glucagon-Like Peptide-1 (GLP-1), Glucose Insulinotropic Peptide (GIP), CCK, sécrétine, gastrine et ghréline. Cependant, les cellules sécrétrices de somatostatine n'expriment pas *Arx* et sont augmentées chez ces souris (Beucher *et al.*, 2012).

L'invalidation, dans l'épithélium intestinal de souris, des facteurs de transcription **Forkhead box A1 et A2 (FoxA1 et FoxA2)**, montre une absence de cellules entéroendocrines sécrétrices de GLP-1 ou GLP-2 ainsi qu'une réduction de cellules sécrétrices de somatostatine et Peptide tyrosine tyrosine (PYY) (Ye and Kaestner, 2009). FoxA1 et FoxA2 sont également importants pour la transcription des facteurs de transcription Isl1 et Pax6 dont l'expression est diminuée chez les souris invalidées pour FoxA1 ou FoxA2.

**Nkx2.2** est également essentiel à la différenciation de certaines cellules entéroendocrines. En effet, son invalidation chez la souris entraîne une diminution de cellules sécrétrices de sérotonine, CCK, GIP et gastrine et une augmentation de la sécrétion de ghréline (Desai *et al.*, 2008).

Nkx2.2 agit en amont de **Paired homeobox 6 (Pax6)**. Pax6 et Pax4 sont des facteurs de transcription de la même famille. Pax6 est nécessaire à l'expression intestinale du proglucagon, précurseur du GLP-1 dans l'intestin (Schonhoff, Giel-Moloney and Leiter, 2004). De plus, chez la souris invalidée pour Pax6, aucune cellule sécrétrice de GLP-1 ou GLP-2 n'est détectée (Hill, Asa and Drucker, 1999). L'invalidation de Pax4 entraîne une diminution du nombre de cellules sécrétrices de sérotonine, somatostatine, GIP et gastrine. On observe également une augmentation du nombre de cellules sécrétrices de GLP-1 (Larsson *et al.*, 1998; Schonhoff, Giel-Moloney and Leiter, 2004; Beucher *et al.*, 2012).

L'invalidation du facteur de transcription **Islet 1 (Isl1)** dans l'intestin entraîne une diminution du nombre de cellules sécrétrices de GLP-1, GIP, CCK et somatostatine ainsi qu'une augmentation du nombre de cellules sécrétrices de sérotonine (Terry *et al.*, 2014).

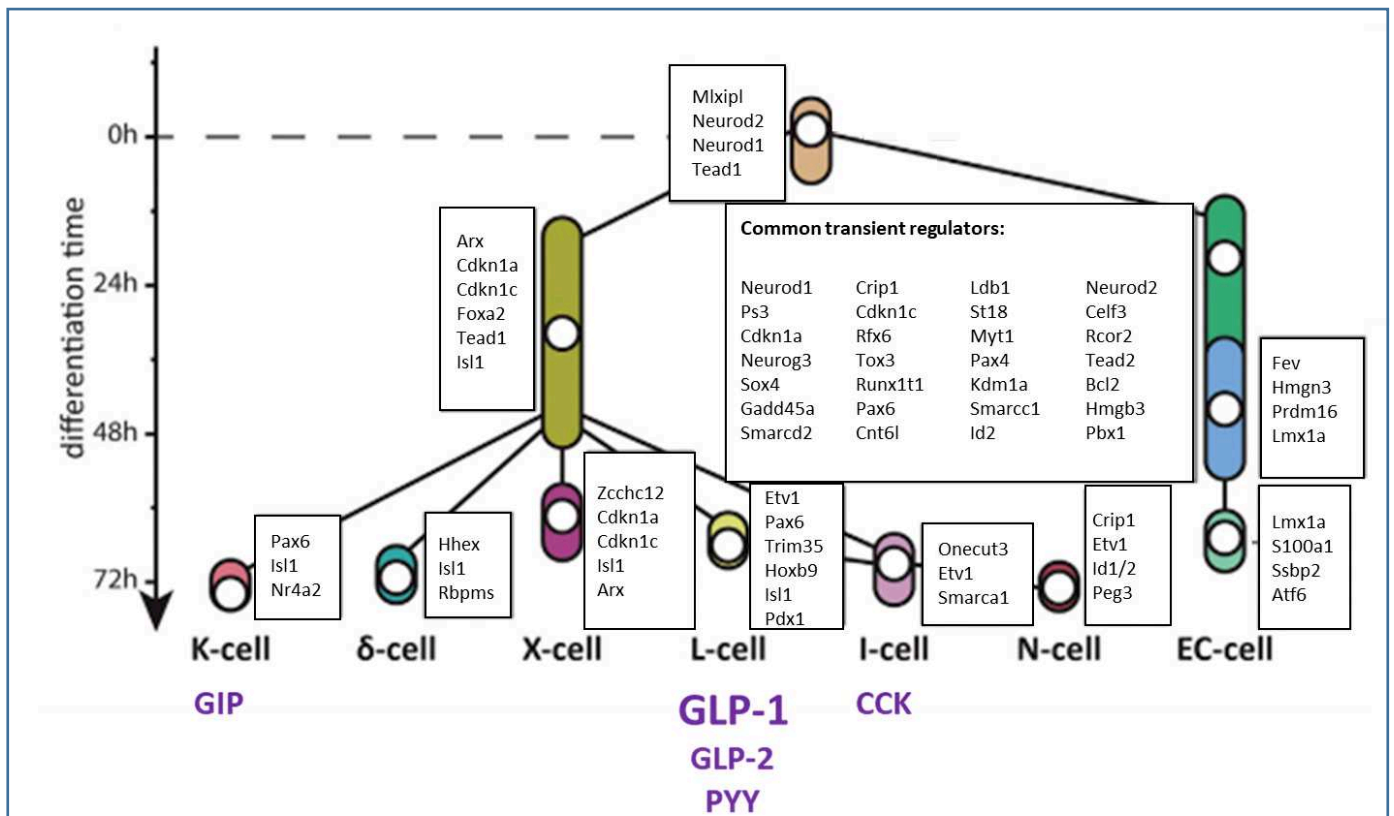
Chez la souris, l'invalidation totale du **Pancreatic and duodenal homeobox 1 (Pdx1)** conduit à la mort de la souris quelques jours après sa naissance. De plus, son invalidation spécifique dans l'intestin entraîne une diminution des cellules entéroendocrines sécrétrices de GIP, une diminution de l'expression des gènes codant pour le GIP ainsi que la somatostatine et inhibe l'expression du proglucagon (Flock, Cao and Drucker, 2005; Jepeal *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2009).

**L'invalidation des ces facteurs de transcription a permis de mettre en évidence leur rôle dans la différenciation des cellules entéroendocrines mais la temporalité de leur activation reste incertaine dans ces modèles.**

L'équipe de Clevers a récemment montré, par RNA-sequencing, l'existence d'autres facteurs de transcription impliqués dans le lignage entéroendocrine tels que Sox4 exprimé en même temps que Neurog3. Aussi, Rfx6 est exprimé dans toutes les cellules lors des étapes précoces de leur maturation mais il est ensuite spécifique du lignage des cellules sécrétant le GIP. De plus, la délétion de Tox3, un autre facteur de transcription découvert dans cette étude, entraîne une diminution de la sérotonine. La même observation a été faite pour Myt1 dont la délétion entraîne une diminution des cellules sécrétrices de sérotonine. En revanche, la délétion de Runx1t1 conduit à la diminution de cellules sécrétrices de GIP et de CCK. Pour finir, la délétion de Zcchc12 conduit à une baisse de sécrétion de ghréline (Gehart *et al.*, 2019). **De plus, cette étude démontre que les différents facteurs de transcription agissent de manière temporelle.** Cette équipe a ainsi classé les différents facteurs de transcription impliqués dans le lignage entéroendocrine en différents groupes : précoces, précoces/intermédiaires parmi lesquels *Neurog3* ou *Sox4*, intermédiaires dans lequel nous trouvons *Pax4*, intermédiaires/tardifs avec *Neurod1*, *Arx*, *Nkx2-2*, *Rfx6* et tardifs parmi lesquels *Pax6* (figure 5).

Par ailleurs, Beumer *et al* ont montré la plasticité du lignage endocrine le long de l'axe antéro-postérieur de l'intestin mais aussi le long de l'axe crypto-villositaire. En effet, sous l'action d'un Bone morphogenetic protein « BMP », les cellules entéroendocrines peuvent changer l'hormone qu'elles sécrètent en migrant le long des villosités (Beumer *et al.*, 2018).

**Dans cet exposé, je m'intéresserai particulièrement à la sécrétion, par les cellules entéroendocrines, de GLP-1 qui jouent un rôle important dans l'homéostasie glucidique.**



**Figure 5: Principaux facteurs de transcription impliqués dans la différenciation des cellules entéroendocrines**

*Ngn3* permet aux progéniteurs sécréteurs de se différencier en progéniteurs endocrines précoces. Ces derniers vont maturer sous l'action de *Pax4* puis *Nkx2.2* et *Neurod1*. Des facteurs de transcription communs aux différents types de cellules entéroendocrines tels que *Sox4*, *Rfx6*, *Pax4*, *Tox3*, *Runx1t1*, *Myt1*, permettent leur maturation. Enfin, les facteurs de transcription *Pax6*, *Isl1*, *Foxa1*, *Foxa2* et *Pdx1* vont permettre la différenciation des cellules entéroendocrines sécrétrices de GLP-1.

D'après Gehart et al, 2019 ; Ye et Kaestner, 2009 ; Beucher et al, 2012 ; Desai et al, 2008.



## Partie 2 : Fonctions de l'intestin

L'intestin est un organe majeur pour l'organisme. Ces principales fonctions sont de constituer une barrière physique avec le milieu extérieur, de participer à l'immunité, d'absorber les nutriments et de sécréter des hormones.

Parmi ses principales fonctions, l'intestin a un rôle de barrière entre la lumière intestinale et le milieu intérieur grâce à une monocouche de cellules épithéliales formant une barrière physique via un réseau protéique formant 3 différents complexes adhésifs : des desmosomes, des jonctions adhérentes et des jonctions serrées (Groschwitz and Hogan, 2009; Julio-Pieper and Bravo, 2016). L'intestin participe également à l'immunité et présente son propre système immunitaire intestinal composé de lymphocytes et de cellules présentant des antigènes (Mowat and Agace, 2014).

**Dans le cadre de ma thèse de doctorat je place l'intestin comme un organe central de l'homéostasie énergétique par ses fonctions endocrine et d'absorption de nutriments que je décris ci-après.**

### A) Fonction endocrine de l'intestin

L'intestin est un organe endocrine majeur. Les cellules endocrines de l'intestin ne sont pas regroupées en glandes mais dispersées le long de l'épithélium intestinal. Les cellules entéroendocrines dans l'intestin sont de type « ouvertes », elles présentent des microvillosités sur le pôle apical, ce qui augmente la surface de détection des nutriments dans la lumière intestinale. Leur pôle basal est plus large que leur pôle apical et permet l'exocytose des vésicules de sécrétion contenant les hormones, vers la circulation sanguine. Dans l'estomac, les cellules endocrines sont de types fermées, elle ne sont pas en contact avec la lumière (Gribble and Reimann, 2019).

#### 1) Les différentes entérohormones

Les cellules entéroendocrines sont variées et ne sécrètent pas moins de vingt hormones dont certaines sont présentées dans le tableau 1. Pendant longtemps les cellules entéroendocrines ont été désignées par une lettre et classées selon l'hormone qu'elles sécrètent : cellules D pour la somatostatine, cellules G pour la gastrine, cellules P/D1 (ou X/A chez la souris) pour la gréline, cellules M pour la motiline, cellules I pour la cholécystokinine (CCK), cellules K pour

le glucose-dependent insulintropic peptide (GIP), cellules L pour le glucagon-like peptide-1 (GLP-1). Plus récemment cette classification est apparue inadaptée car il a été montré qu'une cellule entéroendocrine avait la capacité de sécréter plusieurs entérohormones (Habib *et al.*, 2012; Haber *et al.*, 2017; Gehart *et al.*, 2019).

**Tableau 1: Présentation des entérohormones et leurs principales fonctions**

Entérohormones	Localisation des cellules ou lieu de sécrétion	Fonctions principales
Cholécystokinine	Intestin	Anorexigène ; Stimule les contractions de la vésicule biliaire, d'enzymes pancréatiques, de gastrine. Inhibe la vidange gastrique.
Gastrine	Intestin proximal	Stimule la sécrétion d'acide gastrique et d'insuline
Ghréline	Estomac	Orexigène ; Stimule la sécrétion de GLP-1
GIP	Intestin distal	Incrétine
GLP-1	Intestin distal	Effet incrétine = potentialise la sécrétion d'insuline en réponse au sucre
Histamine	Intestin	Régule la synthèse d'acides gastriques et la motilité intestinale
Neurotensine	Jéjunum	Stimule la motilité intestinale, les sécrétions pancréatiques et l'absorption des acides gras
PYY	Intestin distal	Anorexigène ; "frein iléale"
Sécrétine	Duodénum	Anorexigène ; Stimule la sécrétion de mucus
Sérotonine	Duodénum	Inhibe le péristaltisme
Somatostatine	Intestin et système nerveux central	Inhibe la motilité intestinale et la sécrétion de gastrine, CCK, sécrétine, GIP et de l'insuline

La **ghréline**, découverte en 1999 (Kojima *et al.*, 1999) est présente essentiellement dans l'estomac. C'est la seule hormone gastro-intestinale qui exerce un effet orexigène, c'est à dire qui stimule l'appétit (Cummings *et al.*, 2001; Wren *et al.*, 2001; Gribble and Reimann, 2019). Le jeûne entraîne une augmentation de la concentration sanguine en ghréline qui diminue de nouveau après une prise alimentaire. De plus, une équipe a démontré que la ghréline stimule

la sécrétion de GLP-1 dans des lignées de cellules entéroendocrines murines GLUTag et humaines NCI-H716 (Gagnon *et al.*, 2015).

Les cellules entérochromaffines, observées principalement dans le duodénum, sont responsables de la synthèse, du stockage et de la sécrétion de la 5-hydroxytryptamine (5-HT), autrement appelé **sérotonine**. C'est une hormone intestinale non peptidique dont la synthèse se fait en plusieurs étapes à partir du L-tryptophane. Dans un premier temps, le L-tryptophane est converti en 5-hydroxy-L-tryptophane (5-HTP), par l'enzyme tryptophane hydroxylase. Il s'agit de l'étape limitante car l'enzyme nécessite la présence de tétrahydrobioptérine, d'oxygène, de NADPH<sub>2</sub> et d'un métal fer ou cuivre. Le 5-HTP est ensuite décarboxylé par une L-aminoacide décarboxylase conduisant à la synthèse de 5-HT (Banskota, Ghia and Khan, 2019). Après avoir été considérée dans les années 1950 comme jouant un rôle dans la contractilité intestinale (Bülbring and Lin, 1958), des études récentes montrent que la sérotonine n'est pas nécessaire pour ce mécanisme. En effet, des souris chez lesquelles la synthèse de 5-HT est inhibée, ne présentent aucune altération de la contractilité intestinale (Yadav *et al.*, 2010; Spencer and Hu, 2020). Par ailleurs, des études récentes ont démontré le rôle de la sérotonine dans l'activation de cellules immunitaires, la génération de l'inflammation dans l'intestin ainsi que le remodelage osseux et l'homéostasie métabolique (Banskota, Ghia and Khan, 2019).

La **sécrétine** est un polypeptide sécrété principalement par le duodénum. Elle a un effet anorexigène, c'est-à-dire qui diminue l'appétit, et retarde la vidange gastrique. De plus, la sécrétine inhibe la sécrétion de gastrine dans l'estomac et stimule la sécrétion de mucus dans l'intestin afin de protéger la muqueuse (Siu *et al.*, 2006). Elle stimule également la sécrétion de bile par la vésicule biliaire ainsi que celle de bicarbonate et d'insuline par le pancréas (Cheng, Chu and Chow, 2011; Sekar and Chow, 2013).

La **neurotensine** (NT) est sécrétée par le jéjunum. Sa sécrétion est induite par la détection de lipides dans la lumière de l'intestin. Cette hormone participe à la régulation de la motilité intestinale, des sécrétions pancréatiques et de l'absorption des acides gras (Li *et al.*, 2020). Une forte concentration plasmatique de la pro-neurotensine (précurseur stable de la NT) augmente les risques de développer un diabète et des maladies cardiovasculaires chez l'Homme (Melandar *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2016). Une étude réalisée sur des souris NT<sup>-/-</sup> révèle que ces souris nourries avec un régime riche en gras et ne sécrétant pas de NT, sont protégées

contre l'obésité, l'insulino-résistance et la stéatose hépatique (Li *et al.*, 2016). La NT stimule la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires et joue un rôle important dans l'inflammation du tissu adipeux via le récepteur NTR1 (Li *et al.*, 2020).

La **somatostatine** est une entérohormone présente tout au long du tractus gastro-intestinal. La somatostatine a été observée majoritairement dans les cellules entéroendocrines (90%) et faiblement (10%) dans le système nerveux (Gonkowski and Rytel, 2019). La somatostatine inhibe la motilité intestinale, la vidange gastrique, la sécrétion d'acide par l'estomac et la sécrétion d'autres entérohormones telles que la CCK ainsi que le glucagon et l'insuline par le pancréas (Corleto, 2010). Actuellement des analogues de la somatostatine tels que l'octréotide et le lanréotide sont utilisés dans le traitement du syndrome de Cushing caractérisé par un excès de sécrétion de cortisol, l'acromégalie due à un excès de production d'hormone de croissance et les tumeurs neuroendocrines. Ces traitements montrent un effet hyperglycémiant (Vergès, 2017).

La **cholécystokinine** (CCK) est sécrétée par les cellules entéroendocrines et les neurones cérébraux. Le gène *Cck* est traduit en pré-pro-CCK dont la maturation produit de nombreux peptides qui peuvent être sulfatés ou amidés. Ils sont nommés en fonction du nombre d'acides aminés qu'ils contiennent : CCK-5, CCK-7, CCK-8, CCK-12, CCK-18, CCK-22, CCK-33, CCK-39, CCK-58 (Chandra and Liddle, 2007; Fakhry *et al.*, 2017). La CCK retrouvée dans la circulation sanguine est un mélange des formes sulfatées de CCK-8, CCK-22, CCK-33 et CCK-58 (Rehfeld, 2020). La CCK est connue pour stimuler les contractions de la vésicule biliaire et la relaxation du sphincter d'Oddi, ce qui induit l'augmentation de la sécrétion biliaire dans le duodénum. De plus, elle stimule la sécrétion d'enzymes pancréatiques (Williams, 2019). Elle inhibe aussi la vidange gastrique ainsi que la sécrétion de gastrine dans l'estomac (Rehfeld, 2019; Okonkwo, Zozoff and Adeyinka, 2020). Par ailleurs, la CCK est anorexigène (Fakhry *et al.*, 2017).

La **gastrine** est sécrétée par l'estomac en réponse à une prise alimentaire (Zeng *et al.*, 2020). Elle possède une extrémité C-terminale similaire à celle de la CCK puisque leurs 5 derniers acides aminés sont les mêmes. Cela permet à la gastrine de se lier au récepteur CCK-2 (Rehfeld, 2019). Plusieurs études ont démontré que la gastrine stimule la sécrétion d'insuline (KANETO *et al.*, 1969; Rehfeld and Stadil, 1973). De plus, dans l'estomac, la gastrine stimule dans la sécrétion d'acide par régulation paracrine. Il a également été montré qu'elle agissait

comme un facteur de croissance pour l'estomac proximal en agissant via le récepteur CCK2R (Hayakawa *et al.*, 2016). La gastrine stimule la sécrétion d'histamine par les cellules entérochromaffin-like (Zeng *et al.*, 2020).

L'**histamine** est sécrétée dans l'estomac par les cellules entérochromaffines-like. Elle appartient à la famille des amines biogène. Elle est synthétisée à partir de la L-histidine via la L-histidine décarboxylase et stimule la sécrétion d'acide gastrique et la motilité intestinale (Sander *et al.*, 2006) La sécrétion d'histamine est stimulée par la gastrine.

Le **PYY** est un peptide de 36 acides aminés, sécrété principalement dans la partie distale du tractus gastro-intestinal. C'est une hormone anorexigène (Gribble and Reimann, 2019). L'arrivée du bol alimentaire dans l'iléon induit la sécrétion de PYY qui inhibe la prise alimentaire (Rigaud, 2014). Ce rétrocontrôle négatif sur la prise alimentaire participe au « frein iléal », avec une diminution de la sécrétion d'acide, et des sécrétions pancréatiques, une diminution de la vidange gastrique ainsi qu'une réduction de la vitesse de transit. Deux formes de PYY ont été observées : le PYY(1-36) et le PYY(3-36) qui est la forme la plus fréquente dans la circulation sanguine (Guida and Ramracheya, 2020). Chez la souris, il a été montré que l'inactivation du gène codant pour PYY entraînait une augmentation de la prise alimentaire et de la prise de poids (Batterham *et al.*, 2006). Au contraire, une surexpression de PYY protège de l'obésité génétique ou due à un régime riche en gras (Boey *et al.*, 2008). Le PYY est sécrété par les cellules qui sécrètent également du Glucagon-Like Peptide-1 (GLP-1). Ces deux hormones inhibent la vidange gastrique (Habib *et al.*, 2013).

Les cellules entéroendocrines sécrètent également les hormones incrétines (incretin : INtestine seCRETion INSulin), qui potentialisent la sécrétion d'insuline en réponse à une prise orale de glucose. C'est le cas du **GIP et du GLP-1** (Gribble and Reimann, 2019). Ces hormones contribuent jusqu'à 50% de la sécrétion d'insuline postprandiale. Chez les sujets atteints de diabète de type 2, les concentrations plasmatiques d'hormones incrétines sont diminuées. Elles se lient à des récepteurs couplés à des protéines G et sont inactivées par l'enzyme dipeptidyl peptidase-4 (DPP-4) (Gupta and Raja, 2020). Le GIP provient de pro-GIP clivé par la pro-hormone convertase 1/3 en GIP. La sécrétion de cette hormone est stimulée notamment par les lipides alimentaires mais également par les sucres. L'inactivation du récepteur au GIP chez les souris, les protège de l'obésité induite par un régime riche en gras (Miyawaki *et al.*, 2002). De plus, la concentration en GIP sécrété en réponse à un bolus de glucose est

positivement corrélée à l'indice de masse corporelle (Harada *et al.*, 2011). En outre, le GIP inhibe la sécrétion d'acide gastrique (Gupta and Raja, 2020). Le GLP-1 est également impliqué dans le contrôle de la prise alimentaire. Cette hormone est beaucoup étudiée et des analogues sont utilisés dans le traitement du diabète de type 2. **Je me suis particulièrement intéressée au GLP-1 au cours de ma thèse pour son rôle dans l'homéostasie glucidique et je vais détailler les mécanismes de sa biosynthèse et ses fonctions physiologiques.**

## 2) Le Glucagon-Like Peptide-1

### a. Biosynthèse, maturation et inactivation du GLP-1

Le gène codant pour le préproglucagon (*Gcg*), est exprimé dans une sous-population de cellules entéroendocrines de la muqueuse intestinale, dans les cellules  $\alpha$  pancréatiques et dans certains neurones du noyau du tractus solitaire (NTS) (Sandoval and D'Alessio, 2015). Après élimination du peptide signal, le préproglucagon devient proglucagon qui va lui-même conduire à la formation de différents peptides tels que le GLP-1 ou le glucagon sous l'action de proconvertases spécifiques selon les tissus.

#### Transcription du preproglucagon

Les études sur la régulation de la transcription du gène *GCG* ont mis en évidence une région promotrice (G1), quatre éléments amplificateurs (G2 à G5) et un élément de réponse à l'AMPc (Sandoval and D'Alessio, 2015). En effet, il a été montré que l'élévation de l'AMPc entraîne une augmentation de GCG (Sandoval and D'Alessio, 2015).

Une étude *in vitro* de Yi & coll. a montré que la  $\beta$ -caténine, l'effecteur majeur de la voie Wnt, stimule la transcription du proglucagon dans les cellules entéroendocrines mais pas dans les cellules  $\alpha$  du pancréas, en partie grâce au transcription factor 7 like 2 (TCF7L2, initialement TCF-4) (Kramer, 2016). Dans la lignée de cellules endocrines intestinales murine GLUTag, la transcription du proglucagon est activée par un traitement au lithium via l'activation du récepteur nucléaire peroxydase proliférateur-activated receptor  $\beta/\delta$  (PPAR $\beta/\delta$ ). La  $\beta$ -caténine et TCF7L2 peuvent se lier sur la région G2 du proglucagon. TCF7L2 est présent dans l'intestin mais pas dans les îlots pancréatiques, ce qui expliquerait la stimulation par la voie Wnt de la transcription du gène du proglucagon dans l'intestin et non le pancréas (Daoudi *et al.*, 2011).

Dans les cellules alpha des îlots de Langerhans, PAX6 et MafB favorisent la transcription de GCG alors que l'insuline l'inhibe. En revanche, dans les cellules entéroendocrines, l'insuline stimule l'expression de GCG, via la voie Wnt ; par la  $\beta$ caténine et le TCF7L2.

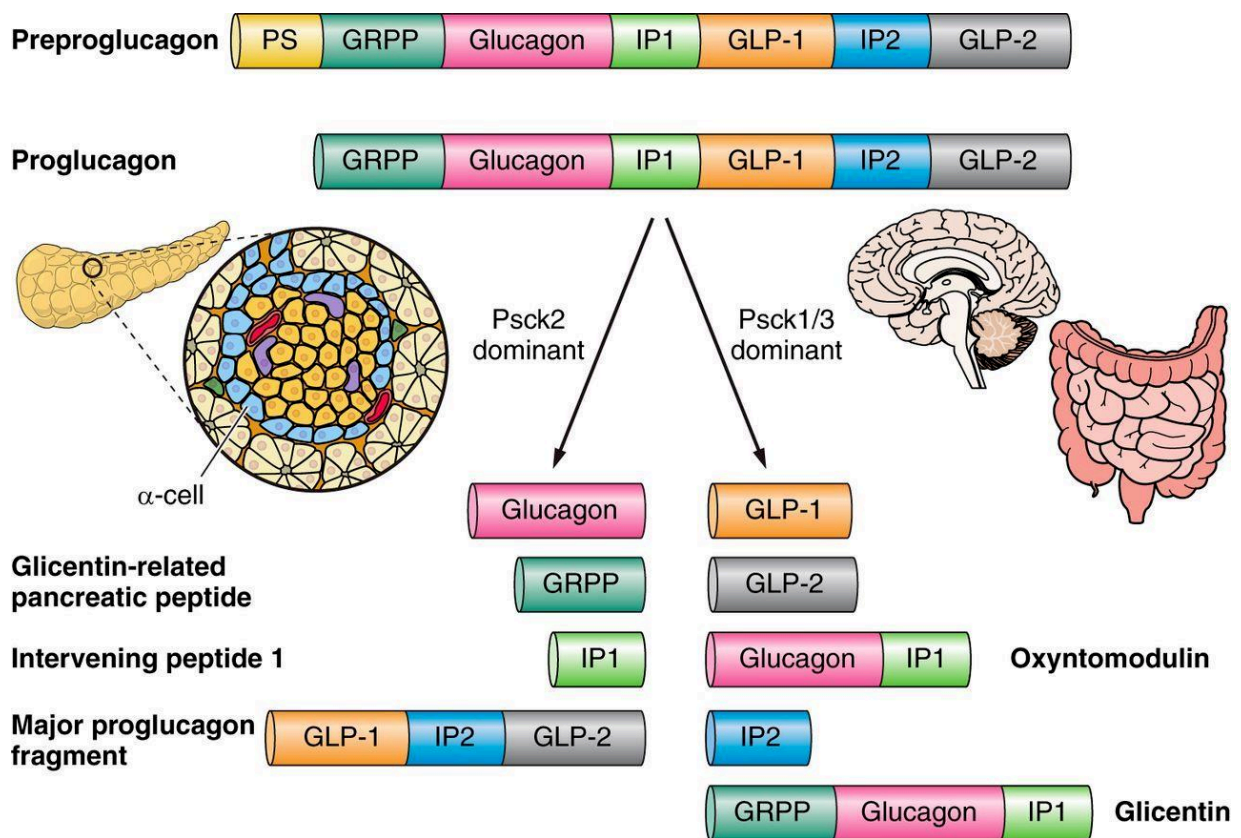
#### Maturation post-traductionnelle du proglucagon

Après clivage du peptide signal (PS), la maturation post-traductionnelle du proglucagon est spécifique du tissu dans lequel elle a lieu. Les prohormones convertases sont des endoprotéases à sérine, dépendantes du calcium (Ramos-Molina, Martin and Lindberg, 2016). Dans les cellules  $\alpha$  du pancréas, la prohormone convertase 2 (PC2 codée par le gène *Pcsk2*) prédomine et conduit à la production de glucagon, une hormone hyperglycémiant, ainsi que du Glicentin-related pancreatic peptide (GRPP), d'Intervening peptide 1 (IP1) et de Major Proglucagon Factor (MPF). Dans les cellules entéroendocrines et les neurones du noyau du tractus solitaire, la prédominance de la prohormone convertase 1/3 (PC1/3 codée par le gène *Pcsk1*) entraîne la production de GLP-1, GLP-2, oxyntomoduline, glicentine et Intervening peptide 2 (IP2) (Sandoval and D'Alessio, 2015) (figure 6).

#### La proconvertase 1/3

La PC1/3 est composé de 4 domaines : un prodomaine, un domaine catalytique, un domaine P spécifique et un domaine carboxy-terminal. Le domaine du propeptide est essentiel pour la sortie de la protéine du réticulum endoplasmique. Le domaine catalytique est fortement conservé parmi diverses espèces. Le domaine P joue un rôle important dans la régulation du calcium et la dépendance des proconvertases au pH. Le domaine carboxy-terminal participe à l'oligomérisation de PC1/3.

PC1/3 participe à la maturation du proglucagon en GLP-1 et GLP-2 dans l'intestin et, dans le pancréas, aux premières étapes de la synthèse de l'insuline en clivant la proinsuline en une forme intermédiaire (Larder, Lim and Coll, 2014).



**Figure 6: Maturation post-traductionnelle tissu spécifique du proglucagon**

Le gène préproglucagon code pour le proglucagon. Ce peptide subit une maturation post-traductionnelle de manière différente selon les tissus. Dans les cellules  $\alpha$  pancréatiques, la prohormone convertase 2 permet la production de glucagon, GRPP et IP1. Dans les cellules entéroendocrines et certains neurones du cerveau, la prohormone convertase 1/3 entraîne la production de GLP-1, GLP-2, oxyntomoduline, IP2 et glicentine.

*D'après Sandoval et d'Alessia, 2015*



Chez la souris, l'invalidation de PCSK1 conduit à un déficit de maturation du proglucagon en GLP-1 dans l'intestin et une augmentation de concentration de proinsuline dans le pancréas. De plus, cette invalidation induit une mortalité précoce chez la souris, seulement un tiers survit au-delà de 7 jours (Ramos-Molina, Martin and Lindberg, 2016). Une étude chez l'homme a montré qu'un individu ayant des mutations hétérozygotes dans le gène PCSK1 présentait de multiples endocrinopathies et une obésité sévère (Jackson *et al.*, 1997).

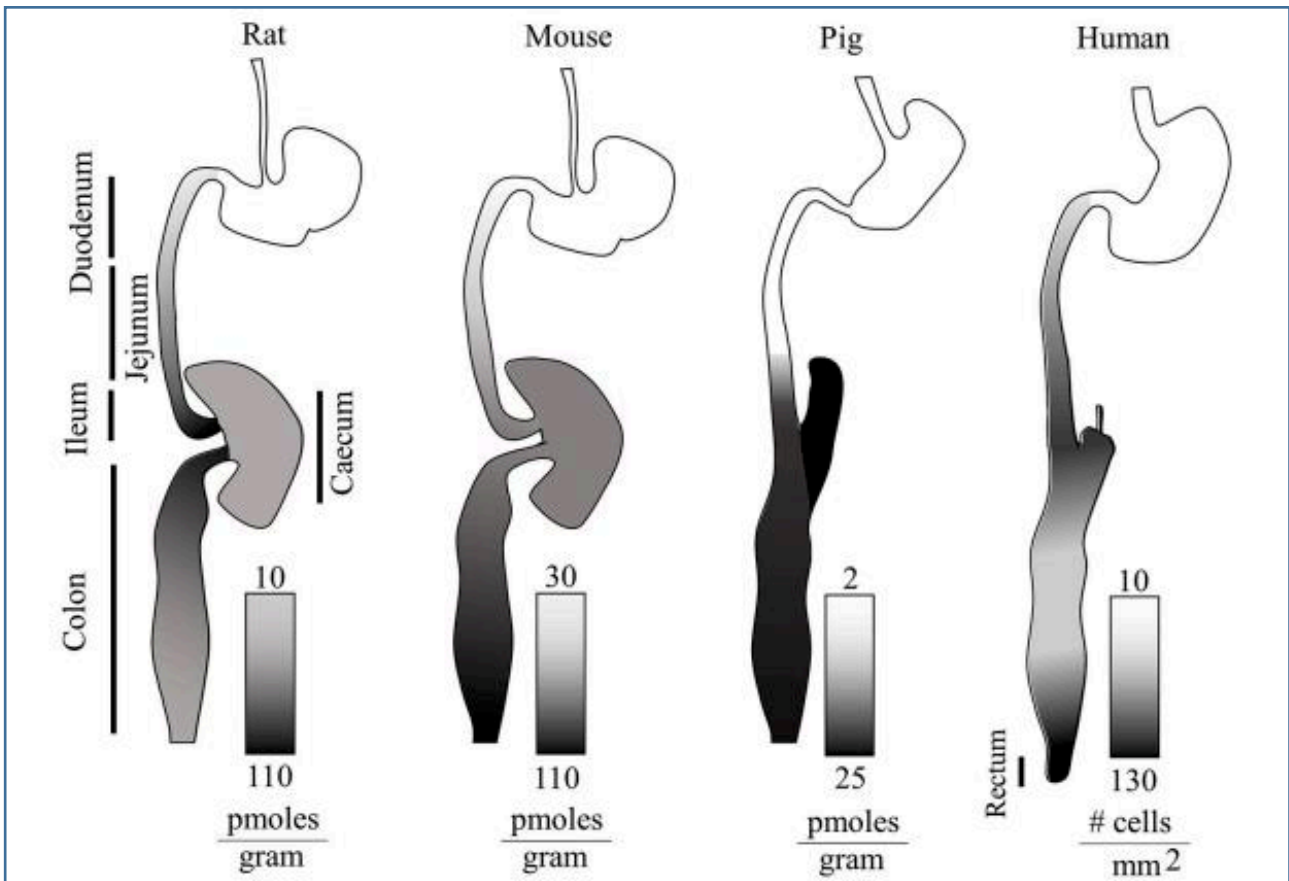
La proconvertase 1/3 est inhibée par la ProAAS (codée par le gène PCSK1N). Pax6 permet la transcription de *Pcsk1* et de son inhibiteur *Pcsk1n*, ainsi que de *Pcsk2* (Liu *et al.*, 2012).

Le GLP-1 est produit sous la forme d'un peptide de 37 acides aminés après maturation post-traductionnelle, le GLP-1(1-37). Cette forme subit une amidation C-terminale, formant le GLP1(1-36)amide. L'action de la proconvertase 1/3 par clivage de six acides aminés N-terminaux va former le GLP-1(7-37) et le GLP-1(7-36)amide, cette dernière étant la forme active majoritaire retrouvée dans le sang.

#### b. Sécrétion du GLP-1 et inactivation

Le nombre de cellules sécrétrices de GLP-1 le plus élevé est observé dans les parties distales de système digestif chez l'Homme comme chez la souris (figure 7) (Paternoster and Falasca, 2018).

La sécrétion de GLP-1 est modulée par la détection de lipides, sucres ou protéines par différents récepteurs couplés aux protéines G, présents sur la membrane apicale des cellules entéroendocrines. L'activation de récepteurs couplés à une protéine G par les nutriments déclenche une cascade de signalisation moléculaire à l'intérieur de la cellule entéroendocrine. Le métabolisme des nutriments en ATP, via des voies de métabolisation, inhibe les canaux potassiques. La fermeture des canaux potassiques par l'ATP entraîne la dépolarisation de la membrane plasmique, l'ouverture des canaux calciques dépendants du voltage, l'augmentation de la concentration intracellulaire en calcium et la sécrétion de GLP-1 (Reimann and Gribble, 2002; Reimann *et al.*, 2008; Paternoster and Falasca, 2018).



**Figure 7: Expression du Glucagon-like peptide-1 intestinal**

Le GLP-1 est exprimé différemment le long de l'intestin. Chez le rat, la souris et le porc, les concentrations les plus élevées sont observées au niveau de l'iléon et le côlon. Chez l'Homme aussi, il y a plus de cellules entéroendocrines dans les parties distales de l'intestin et notamment l'iléon et le rectum.

*D'après Paternoster, 2018*

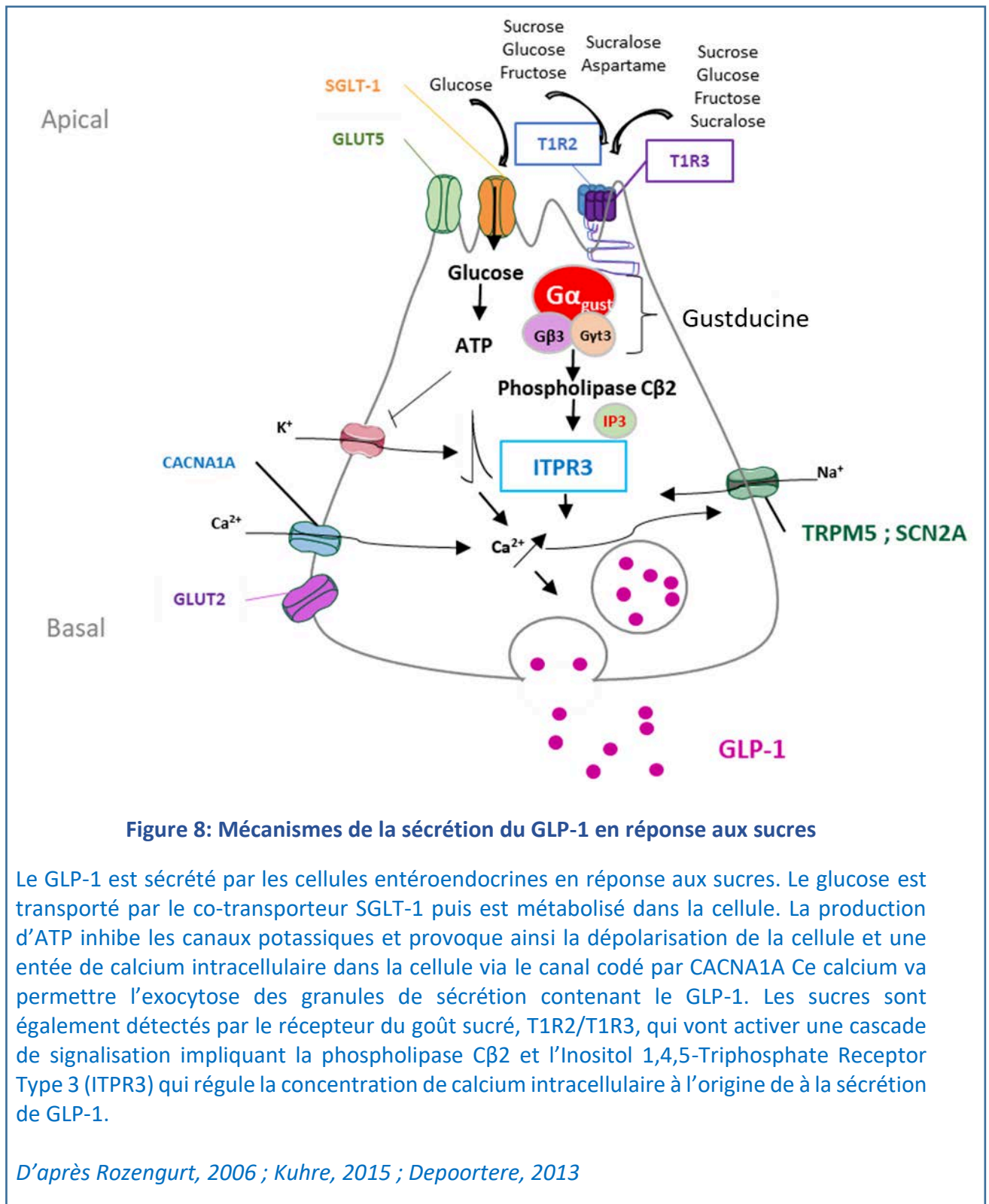
Les lipides stimulent très fortement la sécrétion de GLP-1. G protein-coupled receptor 119 (GPR119) est un récepteur des lipides présent sur la membrane apicale des cellules entéroendocrines. L'invalidation spécifique de GPR119 dans les cellules entéroendocrines de souris induit une forte diminution de la concentration plasmatique en GLP-1 (Moss *et al.*, 2016). D'autres récepteurs sont impliqués dans ce mécanisme comme GPR40-41-42-43-93-119-120-142, récepteurs des acides gras (Mohammad, 2016). La cinétique de sécrétion du GLP-1 en réponse aux lipides ou aux glucides est biphasique. En effet, une étude menée sur cellules épithéliales primaires de souris montre deux pics de GLP-1 après stimulation par la forskoline. La forskoline permet la stimulation de l'adénylate cyclase (Alasbahi and Melzig, 2012). Le premier pic a lieu 1 à 6 minutes après stimulation et le second 7 à 12 minutes après (Wheeler *et al.*, 2017).

Certains acides aminés permettent également de déclencher la sécrétion de GLP-1, c'est le cas par exemple de la L-Glutamine (Badole *et al.*, 2013). C'est également le cas d'autres aux acides aminés basiques tels que L-arginine, L-lysine ou L-ornithine qui se lient au récepteur GPRC6A (Ding *et al.*, 2018).

**Le glucose est un stimulus majeur de la sécrétion de GLP-1 par les cellules entéroendocrines de l'intestin. Pour ma thèse, je me suis intéressée principalement à la sécrétion du GLP-1 en réponse aux glucides.**

Les mécanismes qui lient la détection des glucides à la sécrétion de GLP-1 impliquent des transporteurs (SGLT-1, GLUT) et le récepteur du goût sucré T1R2/T1R3 (figure 8).

Le transporteur SGLT1 est localisé à la surface de la membrane apicale des cellules. Il permet le transport du glucose vers l'intérieur de la cellule ainsi que le co-transport du sodium. Le transporteur GLUT2 est localisé au niveau de la membrane baso-latéral et peut être transloqué au niveau apical de la cellule lorsque la concentration en glucose est élevée dans la lumière intestinale. Il permet également le transport du glucose dans la cellule entéroendocrine (Smith *et al.*, 2018). Le métabolisme du glucose produit de l'ATP qui provoque la fermeture des canaux potassiques. L'accumulation de potassium ( $K^+$ ) provoque la dépolarisation de la membrane plasmique (Kuhre *et al.*, 2015) et une augmentation du calcium intracellulaire conduisant à l'exocytose du GLP-1 (Depoortere, 2014).



**Figure 8: Mécanismes de la sécrétion du GLP-1 en réponse aux sucres**

Le GLP-1 est sécrété par les cellules entéroendocrines en réponse aux sucres. Le glucose est transporté par le co-transporteur SGLT-1 puis est métabolisé dans la cellule. La production d'ATP inhibe les canaux potassiques et provoque ainsi la dépolarisation de la cellule et une entrée de calcium intracellulaire dans la cellule via le canal codé par CACNA1A Ce calcium va permettre l'exocytose des granules de sécrétion contenant le GLP-1. Les sucres sont également détectés par le récepteur du goût sucré, T1R2/T1R3, qui vont activer une cascade de signalisation impliquant la phospholipase C $\beta_2$  et l'Inositol 1,4,5-Triphosphate Receptor Type 3 (ITPR3) qui régule la concentration de calcium intracellulaire à l'origine de la sécrétion de GLP-1.

*D'après Rozengurt, 2006 ; Kuhre, 2015 ; Depoortere, 2013*

Les souris invalidées totalement pour SGLT1 présentent une altération de la sécrétion de GLP-1 en réponse au glucose (Gorboulev *et al.*, 2012). De plus, GLUT2 est également nécessaire à la sécrétion de GLP-1. Les souris invalidées totalement pour GLUT2 présentent également des concentrations réduites de GLP-1 après ingestion de glucose (Reimann *et al.*, 2008).

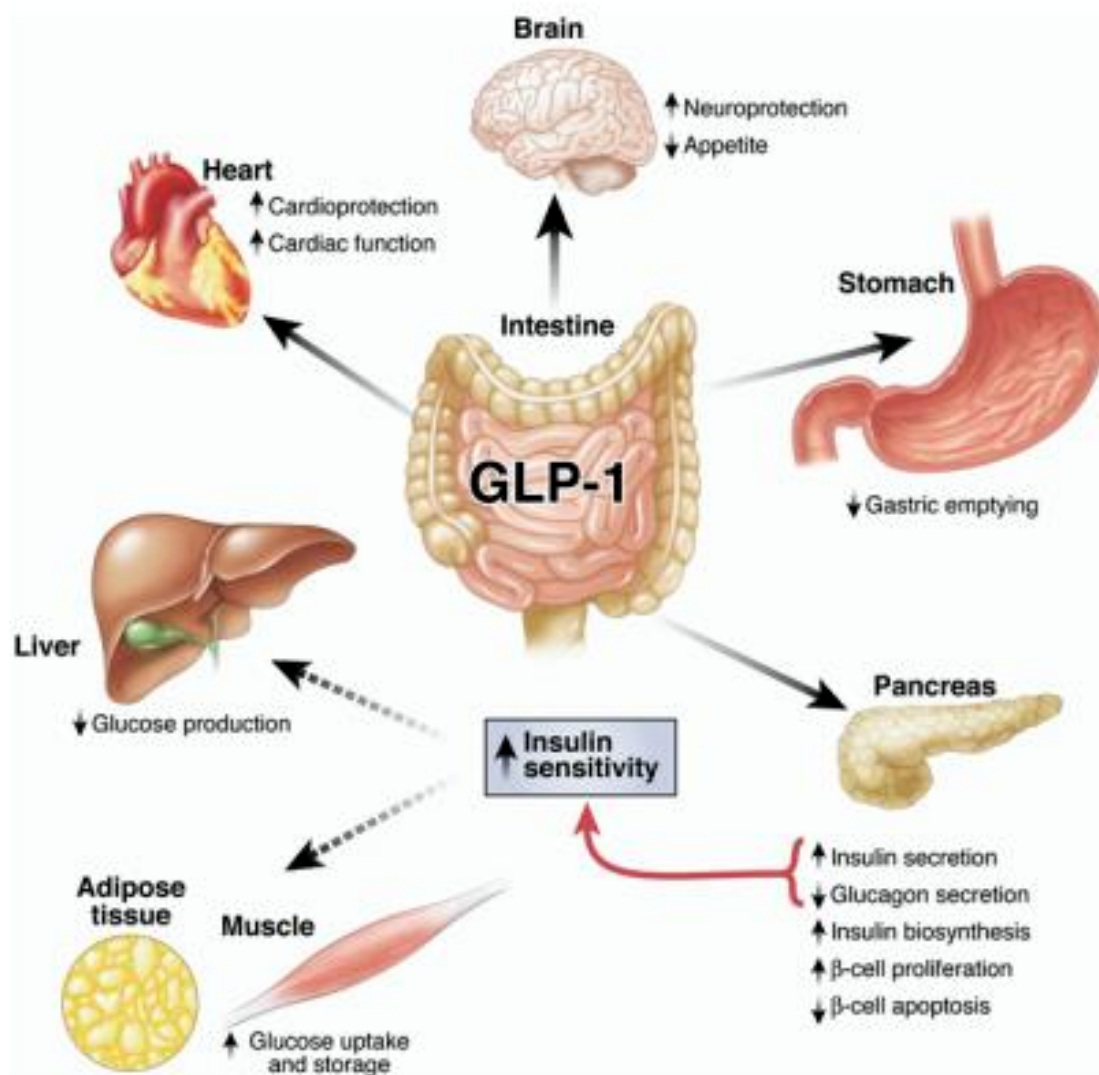
Le récepteur au goût sucré T1R2/T1R3 jouent également un rôle important dans la sécrétion de GLP-1. Ce récepteur augmente l'expression de SGLT1 en réponse au sucre dans l'intestin (Reimann *et al.*, 2008). De plus, T1R2/T1R3 interagit avec la protéine G à laquelle ils sont couplés : la gustducine. Il s'agit d'une protéine hétérotrimérique composée des sous-unités  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ . **Je présenterai cette protéine qui joue un rôle central dans ma thèse plus loin dans cet exposé.**

Cela déclenche une cascade de signalisation via une phospholipase, ce qui entraîne la sécrétion de GLP-1. *In vivo*, les souris invalidées pour l' $\alpha$ -gustducine présentent une altération de la sécrétion de GLP-1 en réponse à un gavage de glucose (Jang *et al.*, 2007). De plus, l'inactivation du récepteur T1R2/T1R3 entraînent une diminution de la sécrétion de GLP-1 en réponse à une ingestion de glucose (Jang *et al.*, 2007; Kokrashvili, Mosinger and Margolskee, 2009; Geraedts *et al.*, 2012). **Le récepteur T1R2/T1R3, SGLT, GLUT et l' $\alpha$ -gustducine seront détaillés plus loin dans cet exposé.**

Les deux formes actives du GLP-1, GLP-1(7-37) et GLP-1(7-36)amide, sont extrêmement sensibles à l'activité catalytique de l'enzyme DPP-IV, également appelée CD26 (cluster of differentiation 26), qui clive le dipeptide N-terminal et rend ainsi ce peptide inactif (Deacon, Johnsen and Holst, 1995). Le GLP-1 rejoint la circulation sanguine via la veine porte où elle est en contact avec la DPP-IV présente au niveau des cellules endothéliales. Le temps de demi-vie du GLP-1 dans la circulation est court, inférieur à 2 minutes. La protéase DPP-IV clive l'extrémité N-terminale du GLP-1(7-36) amide et du GLP-1(7-37) respectivement en GLP-1 (9-36) amide et GLP-1(9-37) qui sont deux formes inactives (Mentlein, Gallwitz and Schmidt, 1993; Baggio and Drucker, 2007).

### c. Effets physiologiques du GLP-1

Le GLP-1 agit via le récepteur GLP-1R qui est exprimé dans le pancréas, les poumons, le tissu adipeux, les reins, le cœur et dans certaines cellules du système nerveux central (figure 9). Le récepteur GLP-1R est couplé à une protéine G. La fixation du GLP-1 sur son récepteur induit une augmentation de calcium intracellulaire.



**Figure 9: Effets physiologiques du GLP-1**

Le GLP-1 est sécrété dans l'intestin par les cellules entéroendocrines et agit à différents niveaux via son récepteur GLP-1R. le GLP-1 stimule la protection et les fonctions cardiaques. Cette entérohormone anorexigène diminue l'appétit et est neuroprotective. Dans l'estomac, le GLP-1 inhibe la vidange gastrique. Au niveau pancréatique, le GLP-1 inhibe l'apoptose des cellules  $\beta$  et stimule leur prolifération et stimule la biosynthèse de l'insuline. Il stimule aussi la sécrétion d'insuline et inhibe la sécrétion de glucagon, ces effets augmentent la sensibilité à l'insuline. Indirectement, cette sensibilité à l'insuline encouragée par le GLP-1 inhibe la production de glucose par le foie et stimule son absorption et son stockage dans les muscles et le tissu adipeux.

*D'après Baggio et Drucker, 2007*

Le GLP-1, comme le GIP, est responsable de l'effet incrétine. Dès 1964, McIntyre montre une augmentation de la sécrétion d'insuline en réponse à une prise orale de glucose. Cet effet n'est pas observé lorsque le glucose est administré par voie intraveineuse (Mcintyre, Holdsworth and Turner, 1964).

Le récepteur GLP-1R est présent à la surface des cellules  $\beta$  pancréatiques. Lorsque le GLP-1 se fixe sur celui-ci, en présence de glucose, il active une adénylate cyclase et la production d'AMPc. Cela inhibe les canaux potassique ATP-dépendant et stimule la dépolarisation de la membrane plasmique. L'augmentation du calcium intracellulaire permet l'exocytose des granules contenant l'insuline (Baggio and Drucker, 2007). Dans les cellules  $\alpha$  du pancréas, le GLP-1 inhibe la sécrétion du glucagon (Paternoster and Falasca, 2018). Au niveau des cellules  $\delta$ , il stimule la sécrétion de somatostatine (Baggio and Drucker, 2007).

Au niveau central, le GLP-1 a un effet anorexigène et est neuroprotecteur. Des études chez le rongeur ont montré que l'administration d'un agoniste du GLP-1R entraîne une réduction de la prise alimentaire et la masse corporelle (Tang-Christensen *et al.*, 1996; Turton *et al.*, 1996; Baggio and Drucker, 2007). Dans l'estomac, il ralentit également la vidange gastrique, cela ralentit l'absorption du glucose et régule la glycémie (Paternoster and Falasca, 2018).

Au niveau cardiovasculaire, le GLP-1 a effet anti-inflammatoire, augmente le rythme cardiaque et a un effet vasoprotecteur et cardioprotecteur. Le GLP-1 stimule également le stockage du glucose dans les muscles et le tissu adipeux (Baggio and Drucker, 2007; Campbell and Drucker, 2013).

**Le GLP-1 est essentiellement connu pour son rôle dans la régulation de l'homéostasie glucidique via son effet incrétine. Cependant, la sécrétion du GLP-1 et l'effet incrétine sont diminués dans les maladies métaboliques.**

## **B) Absorption des protéines alimentaires**

Une des autres fonctions majeures de l'intestin est l'absorption des nutriments. Les protéines, les graisses et les sucres sont décomposés sous l'action d'enzymes digestives afin de donner de plus petites unités capables d'être absorbées (Greenwood-Van Meerveld, Johnson and Grundy, 2017). Je présenterai dans cette partie l'absorption des protéines.

Selon le programme national nutrition santé (PNNS) de l'agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (ANSES), la contribution des macronutriments à l'apport énergétique total recommandé pour les protéines est de 10 %.

### 1) Digestion des protéines alimentaires

Dans l'estomac, un pH faible va activer le pepsinogène qui est le précurseur inactif de la pepsine. **La pepsine** va couper les liaisons peptidiques au niveau des acides aminés aromatiques et donner un mélange de fragments protéiques intermédiaires, de peptides et d'acides aminés qui seront acheminés vers le duodénum. Dans l'intestin, l'action des protéases pancréatiques permet de digérer les protéines. Elles contiennent des endopeptidases (trypsine, chymotrypsine, élastase) et des exopeptidases (carboxypeptidases A et B) qui décomposent les protéines en acides aminés, dipeptides et tripeptides (Lecleire, 2008; Kiela and Ghishan, 2016). Les protéases pancréatiques sont d'abord libérées sous formes inactives. Dans un premier temps, le trypsinogène va être activé en trypsine par l'entérokinase, une glycoprotéine synthétisée et libérée par les entérocytes. La trypsine clive les protéines en peptides ayant à leur extrémité carboxy-terminale un radical Arg ou Lys clivés ensuite par la carboxypeptidase B. La chymotrypsine et l'élastase clivent les protéines en peptides ayant à leur extrémité carboxy-terminale respectivement des radicaux aromatiques et aliphatiques clivés ensuite par la carboxypeptidase A (Lecleire, 2008).

90% des protéines alimentaires sont absorbées sous forme d'acides aminés et 10% sous forme de dipeptides et tripeptides (Kiela and Ghishan, 2016). Dans le cytosol de l'entérocyte, les di- et tripeptides sont hydrolysés en acides aminés (Bröer and Fairweather, 2018).

De plus, les oligo-peptides peuvent être digérés en acides aminés, di- et tri-peptides par des peptidases entérocytaires présentes en partie dans la bordure en brosse et en intracytoplasmique. Les di- et tri-peptides pouvant traverser la membrane apicale des entérocytes, sont transformés dans la cellule en acides aminés. Il a été décrit trois aminopeptidases libérant l'extrémité N-terminale des peptides, deux carboxypeptidases libérant l'extrémité C-terminale des peptides, une endopeptidase et la gamma-glutamyl-transpeptidase (Lecleire, 2008).

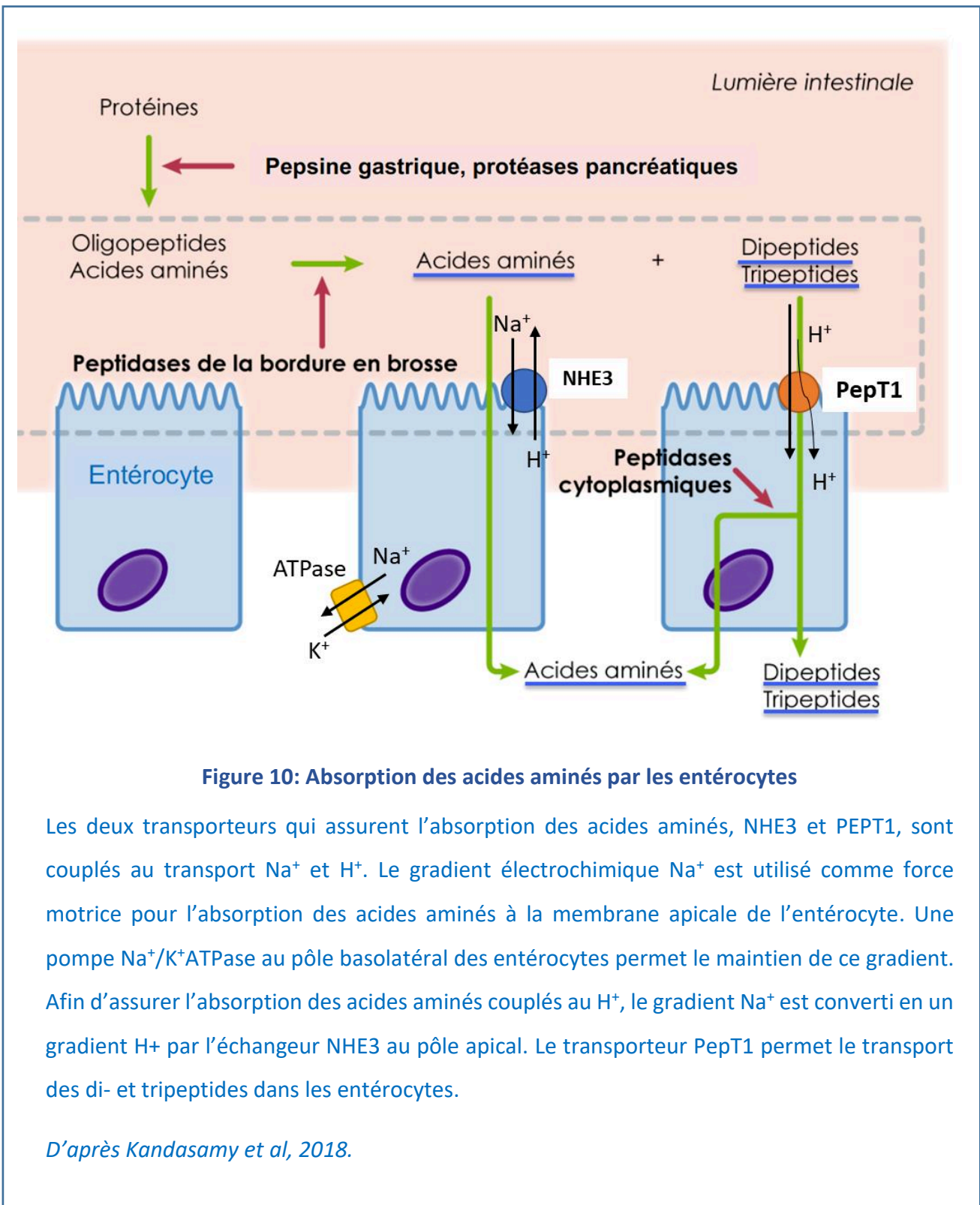


## 2) Captage des protéines alimentaires

L'absorption des protéines par l'entérocyte se fait sous forme de di- ou tri-peptides via le transporteur Pept-1 ou sous formes d'acides aminés libres. Les acides aminés sont absorbés au pôle apical des entérocytes et en sortent au niveau de la membrane baso-latérale via différents systèmes de transport (Christensen, 1990; Lecleire, 2008). Le transport des acides aminés est complexe et mal connu. Il existe différents systèmes responsables de leur absorption tels que B<sup>0</sup> qui est un transporteur dépendant du sodium. Les acides aminés peuvent emprunter différents transporteurs classés en « systèmes » : le système L (Leucine) pour les grands acides aminés neutres hydrophobes, le système A (Alanine) pour les petits acides aminés polaires, le système ASC (Alanine, Sérine, Cystéine), le système N (Asparagine, Histidine, Glutamine) ou le système T (tryptophane) pour les acides aminés aromatiques (Bröer and Fairweather, 2018).

Les dipeptides et tripeptides sont absorbés dans l'intestin de manière dépendante du sodium qui est nécessaire au fonctionnement du Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger 3 (NHE3) pour générer un gradient protonique pour le co-transport H<sup>+</sup>/peptide (figure 10). Le transporteur impliqué dans l'absorption des peptides est le **peptide transporter 1** (PEPT1) codé par le gène *SLC15A1* qui est exprimé dans l'épithélium intestinal et dans une moindre mesure dans l'épithélium rénal.

L'absorption se fait via différents transporteurs en fonctions de leurs affinités avec les acides aminés donc les principaux sont membres des familles SLC1A, SLC6A, SLC7A, SLC16A et SLC38A (Chen *et al.*, 2018).



**Figure 10: Absorption des acides aminés par les entérocytes**

Les deux transporteurs qui assurent l'absorption des acides aminés, NHE3 et PEPT1, sont couplés au transport  $\text{Na}^+$  et  $\text{H}^+$ . Le gradient électrochimique  $\text{Na}^+$  est utilisé comme force motrice pour l'absorption des acides aminés à la membrane apicale de l'entérocyte. Une pompe  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ATPase au pôle basolatéral des entérocytes permet le maintien de ce gradient. Afin d'assurer l'absorption des acides aminés couplés au  $\text{H}^+$ , le gradient  $\text{Na}^+$  est converti en un gradient  $\text{H}^+$  par l'échangeur NHE3 au pôle apical. Le transporteur PepT1 permet le transport des di- et tripeptides dans les entérocytes.

*D'après Kandasamy et al, 2018.*

Dans l'intestin, l'absorption des acides aminés est assurée via des co-transporteurs de Na<sup>+</sup> et des échangeurs d'acides aminés présents sur la bordure en brosse ou la membrane basolatérale des entérocytes. Le gradient électrochimique du sodium vers l'intérieur de la cellule qui est utilisé comme force motrice pour le transport des acides aminés est assuré par une pompe Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase au pôle basolatéral. Afin d'assurer l'absorption des acides aminés couplés au H<sup>+</sup>, le gradient Na<sup>+</sup> est converti en un gradient H<sup>+</sup> par l'échangeur **sodium–hydrogen exchanger (NHE3)** au pôle apical, codé par le gène *SLC9A3*. Le transporteur **Peptide transporter 1 (PepT1)**, codé par le gène *SLC15A1* médie le co-transport des oligopeptides couplé à un H<sup>+</sup>. Le **transporteur Neutral amino acid (NAA)** codé par *SLC6A19* transporte les acides aminés aromatiques tels que la phénylalanine, la tyrosine et le tryptophane. Les acides aminés sont également absorbés via les transporteurs **Proton-coupled amino acid transporter (PAT1)** codé par *SLC36A1*, **Excitatory amino-acid carrier 1 (EAAC1)** codé par *SLC1A1*, **sodium/Imino-acid Transporter 1 (SIT1)** codé par *SLC6A20* et **l'hétérodimère b<sup>0,+</sup>** codé par *SLC7A9* et *SLC3A1* (Kandasamy *et al.*, 2018).

### 3) Export des acides aminés des entérocytes

Environ 10% des acides aminés absorbés par l'entérocytes est utilisé par l'épithélium intestinal pour son métabolisme (Lecleire, 2008). La sortie des acides aminés restants vers la circulation sanguine est assurée par des nombreux transporteurs tels que l'hétérodimère **Y+L amino acid transporter 1 (y+ LAT1)** codé par *SLC7A7* et *SLC3A2*, **T-type amino acid transporter 1 (TaT1)** aussi appelé Monocarboxylate transporter 10 (MCT10) codé par le gène *SLC16A10*, et les **transporteurs L-type amino acid transporters 1, 2 et 4 (LAT1, LAT2 et LAT4)** codés respectivement par les gènes *SLC7A5*, *SLC7A8* et *SLC43A2* (Kiela and Ghishan, 2016; Kandasamy *et al.*, 2018).

## C) Absorption des lipides

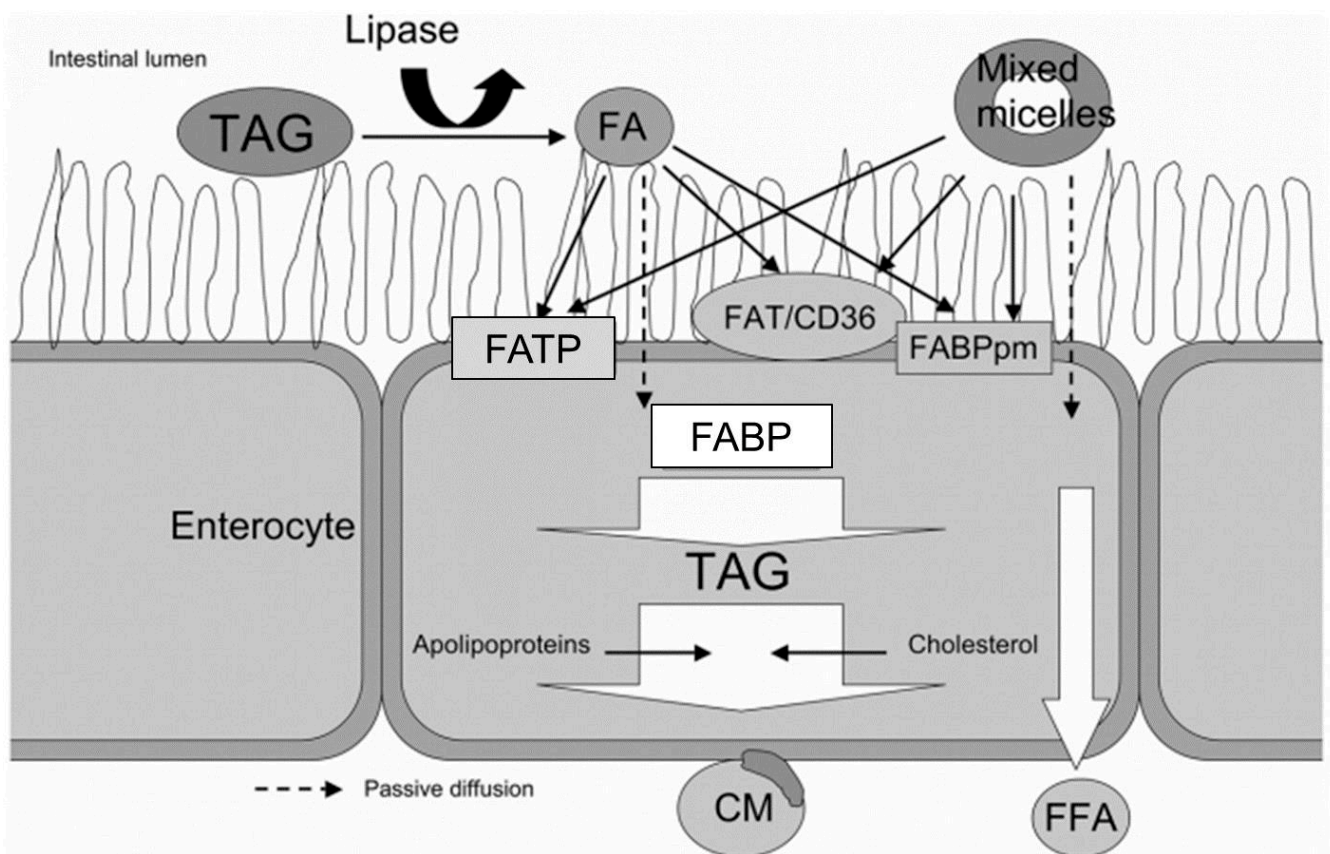
Selon le PNNS, la contribution des macronutriments à l'apport énergétique total recommandé est de 35 à 40% pour les lipides. Les lipides les plus retrouvés dans notre alimentation sont les triglycérides ou triacylglycerol (TAG), assurant 90 à 95% de l'énergie totale issue des lipides alimentaires (Iqbal and Hussain, 2009). De plus, notre alimentation comprend des phospholipides, parmi lesquels la phosphatidylcholine prédomine, des glycolipides, des

stéroïls et les vitamines D, E, A et K (Mu and Høy, 2004; Iqbal and Hussain, 2009; Raynal-Ljutovac *et al.*, 2011).

Les triglycérides sont composés d'un squelette glycérol avec trois acides gras acylés. Dans l'alimentation humaine, les acides gras peuvent être de différentes tailles et être saturés ou non saturés (Mu and Høy, 2004).

### 1) Digestion des lipides

La digestion des lipides commence dans la bouche sous l'action de lipases linguales sécrétées par les glandes salivaires. Elle se poursuit dans l'estomac où interviennent également des lipases gastriques et puis dans l'intestin. Les triglycérides étant des molécules insolubles dans l'eau, elles s'agrègent pour former de grosses gouttelettes lipidiques. L'émulsion par les acides biliaires permet de disperser les triglycérides afin de former des gouttelettes plus petites ce qui facilite leur accès aux lipases pancréatiques. (Iqbal and Hussain, 2009). Les triglycérides sont hydrolysés en 2-monoacylglycerol (2-MAG) et acides gras libres. Les produits de la digestion des triglycérides s'associent aux acides biliaires pour former des micelles. Le monoacylglycérol est capté dans l'intestin sous forme de 2-MAG. Le 2-MAG peut également être hydrolysé par la lipase pancréatique en glycérol et acide gras libre.



**Figure 11: Absorption des lipides alimentaires par les entérocytes**

Les acides gras sont captés par la cellule par diffusion passive ou par diffusion facilitée. La diffusion facilitée est assurée par les transporteurs FABP, FATP, FABPpm et CD36. Dans l'entérocyte, la présence des acyl-CoA cholestérol acyltransférase, diacylglycérol acyltransférase et lécithine rétinol acyltransférase permettent l'estérification du cholestérol, des monoacylglycérols et du rétinol. Ces produits sont incorporés dans des chylomicrons pour être sécrétés.

TAG : Triacylglycerols ; FA : Fatty acids ; CM : Chylomicrons ; FFA : Free Fatty Acids

*D'après Masson, 2010.*

## 2) Captage des acides gras

Les acides gras libres sont captés par les entérocytes par diffusion passive ou transport facilité. La diffusion passive est permise grâce à un gradient de concentration due à une forte concentration d'acides gras dans la lumière intestinale et une faible concentration dans le cytosol des entérocytes.

Plusieurs transporteurs sont impliqués dans le mécanisme de transport facilité (figure 11). Le **Fatty Acid Transporter / Cluster of Differentiation 36 (FAT/CD36)** est fortement exprimé dans l'intestin et est sur-exprimé en présence de graisses alimentaires (Poirier *et al.*, 1996). CD36 est un récepteur multiligands exprimé sur la membrane plasmique des plaquettes, les monocytes, les adipocytes, les cellules épithéliales de la rétine, des glandes mammaires et de l'intestin grêle et les papilles gustatives de la langue (Glatz and Luiken, 2018). De plus, l'inactivation de CD36 chez la souris entraîne une libération de triacylglycérol réduite dans la lymphe intestinale et une accumulation de lipides dans les entérocytes de l'intestin proximal, ce qui montre un défaut du ciblage des acides gras vers le réticulum endoplasmique pour l'assemblage des chylomicrons (Drover *et al.*, 2005).

Le transporteur **Fatty Acid Transporter Protein 4 (FATP4)** participe également à l'absorption des lipides par les entérocytes. FATP4 est le seul membre de la famille des FATP présent sur le côté apical de la bordure en brosse de l'épithélium intestinal. Il est également exprimé au niveau du réticulum endoplasmique où a lieu l'estérification des acides gras (Cifarelli and Abumrad, 2018).

La **plasma membrane fatty acid-binding protein (FABPpm)** est une protéine présente au niveau de la membrane plasmique des entérocytes. FABPpm est impliquée dans le transport des acides gras (Chabowski *et al.*, 2007; Masson *et al.*, 2010).

## 3) Trafic entérocytaire des acides gras

Une fois dans l'entérocyte, les acides gras sont réestérifiés. Ils sont pris en charge par des protéines et dirigés dans le cytoplasme pour rejoindre le réticulum endoplasmique pour former des complexes lipidiques. Les acides gras et MAG sont pris en charge par des protéines de liaison spécifiques et vont former des TAG. Pour cela, ils vont se lier dans le cytoplasme à deux protéines de la famille des **Fatty Acid-Binding Proteins (FABP)** : FABP1 ou FABP

hépatique (Liver-FABP ou L-FABP) et FABP2 ou FABP intestinal (Intestinal-FABP ou I-FABP). Le FABP1 a un rôle primordial dans la  $\beta$ -oxydation des acides gras. FABP1 permet le transport des acides gras par diffusion passive alors que FABP2 permet un transport facilité à travers la membrane. La délétion des gènes FABP1 ou FABP2 n'altère pas l'absorption des lipides alimentaires mais entraîne une production réduite de chylomicrons (Cifarelli and Abumrad, 2018).

#### 4) Formation des chylomicrons

Après l'absorption des lipides, des chylomicrons sont formés dans les entérocytes. Il s'agit de lipoprotéines riches en TAG et esters de cholestérol. Les lipoprotéines sont des composées de triglycérides (85 à 90%), d'esters de cholestérol (3 à 5%) formant un cœur hydrophobe, de phospholipides (7 à 9%) formant une monocouche, de cholestérol libre et des apolipoprotéines (1 à 2%) formant une surface hydrophile (Miller and Small, 1983). La formation de pré-chylomicrons se fait dans le réticulum endoplasmique via **l'enzyme microsomal triglyceride tranfert protein (MTP)** qui permet le transfert des lipides sur l'apolipoprotéine B. Ce système permet la formation d'une particule faiblement lipidée contenant l'apolipoprotéine B et une gouttelette lipidique sans apolipoprotéine. La fusion des deux forme le pré-chylomicron. Les pré-chylomicrons sont transportés via des vésicules spécifiques, les pre-chylomicron transport vesicle (PCTV), dans l'appareil de golgi où ils vont terminer leur maturation (Xiao, Stahel and Lewis, 2019). Ces chylomicrons sont ensuite sécrétés dans le système lymphatique pour rejoindre la circulation sanguine (Cifarelli and Abumrad, 2018).

#### 5) Transit des triglycérides

La majeure partie de la biosynthèse des TAG dans l'entérocyte se fait via la voie des MAG. Le MAG et l'acyl-CoA se lient de manière covalente pour former du diacylglycérol (DAG) par l'action des monoacylglycérol acyltransférases (MGAT). Une acylation par la diacylglycérol acyltransférase (DGAT) entraîne la synthèse de TAG (Iqbal and Hussain, 2009).

Les triglycérides sont ensuite transportés par voie lymphatique ou veineuse. Si seuls des acides gras libres sont administrés, les acides gras seront transportés principalement par voie veineuse. Cependant, lorsque sont administrés des acides gras libres et des monoacylglycérols, plus d'acides gras seront transportés par voie lymphatique. De plus, les

acides gras sont moins transportés via la veine porte sous forme de triglycérides que sous forme d'acides gras libres. La L-FABP va également constituer un « réservoir » d'acides gras libres en attendant leur transport (Lecleire, 2008).

#### D) Absorption des sucres

Selon le PNNS, la contribution des macronutriments à l'apport énergétique total recommandé est de 45 à 50% pour les glucides.

Les glucides alimentaires sont absorbés sous forme de mono- et disaccharides via des transporteurs. Les oligosaccharides et polysaccharides digestibles sont hydrolysés dans la lumière du tube digestif par des amylases en mono ou dimères avant d'emprunter ces transporteurs. Les principaux transporteurs présents dans l'intestin sont le **Sodium glucose co-transporter-1 (SGLT1)** et les **glucose transporter -2 et -5 (GLUT2 et GLUT5)** (figure 12).

SGLT1 est codé par le gène *SLC5A1*. Il s'agit d'un cotransporteur du glucose et du galactose avec du sodium. Dans l'intestin, SGLT1 est présent à la surface de la membrane apicale des cellules entéroendocrines et des entérocytes. Dans les entérocytes, SGLT1 permet l'absorption de faible concentration de glucose. L'activation de ce co-transporteur est médié par la sortie de sodium via la pompe sodium/potassium-ATPase présente au pôle baso-latéral de la cellule (Poulsen, Fenton and Rieg, 2015). L'invalidation de SGLT1 chez la souris entraîne une malabsorption du glucose et du galactose. Bien que les souris *splt1<sup>-/-</sup>* ne survivaient pas plus de 2 jours avec un régime standard, elles étaient cependant en bonne santé lorsqu'elles étaient soumises à un régime dépourvu de monosaccharides et de disaccharides (Gorboulev *et al.*, 2012).

Les autres transporteurs présents dans l'intestin, GLUT2 et GLUT5, permettent le transport facilité du glucose et du fructose à travers la membrane plasmique. Il s'agit de transport facilité ne consommant pas d'énergie (Mueckler and Thorens, 2013). Les transporteurs de la famille des GLUTs sont codés par les gènes Solute Carrier Family 2A (SLC2A) et présentent la même structure. Toutes les protéines GLUT possèdent 12 segments transmembranaires, un site de N-glycosylation et un domaine de liaison cytoplasmique. Il existe 14 GLUTs qui permettent tous un transport facilité du glucose excepté GLUT13, aussi appelé HMIT qui est un symporteur H<sup>+</sup>/myo-inositol. Ils sont classés en 3 catégories selon leurs séquences en acides aminés. La première catégorie comprend les GLUT1, 2, 3, 4 et 14 ; la deuxième catégorie



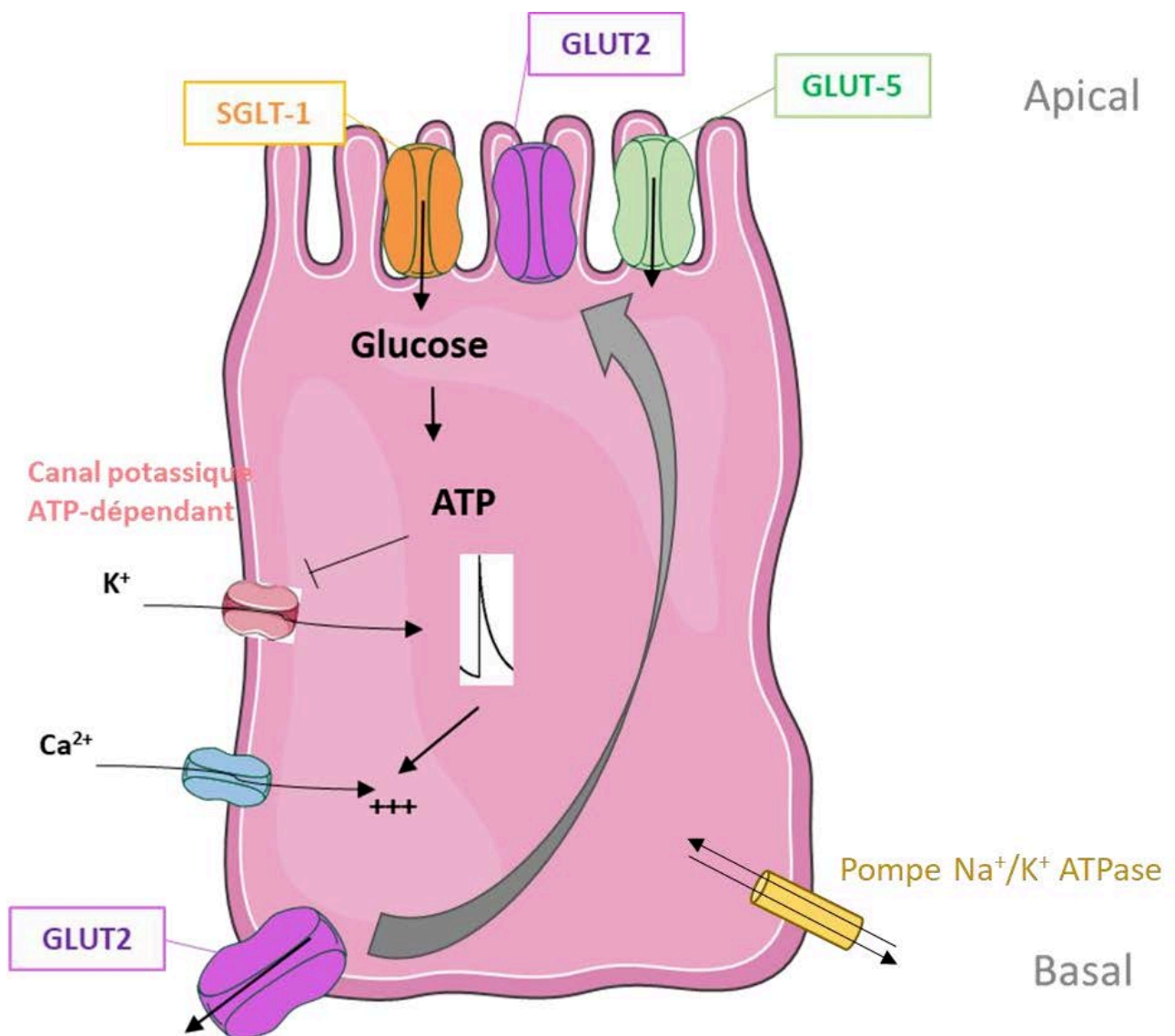
contient les GLUT5, 7, 9 et 11 et la troisième catégorie compte les GLUT6, 8, 10, 12 et 13 (Mueckler and Thorens, 2013).

GLUT5 a été le premier GLUT de classe 2 identifié. Il est codé par le gène *SLC2A5*. Il présente une forte affinité pour le fructose ( $K_m = 6 \text{ mM}$ ) et, présent à la membrane apicale des entérocytes, il assure l'absorption du fructose dans l'intestin grêle.

GLUT2 est codé par le gène *SLC2A2*. Il a une faible affinité pour le glucose ( $K_m = 17 \text{ mM}$ ) et pour le galactose ( $K_m = 92 \text{ mM}$ ), le mannose ( $K_m = 125 \text{ mM}$ ) et le fructose ( $K_m = 76 \text{ mM}$ ) dont il assure également le transport. Il a cependant une forte affinité pour les glucosamines ( $K_m = 0,8 \text{ mM}$ ) (Mueckler and Thorens, 2013). Dans l'entérocyte, GLUT2 est le transporteur principal du glucose principalement présent à la membrane basolatérale des entérocytes. Il assure le transport du glucose, du fructose et du galactose vers la circulation sanguine. GLUT2 peut cependant être transloqué à la membrane apicale pour participer à l'absorption du glucose dans les entérocytes. Ce mécanisme dépend de la concentration de glucose dans la lumière intestinale. La présence permanente de GLUT2 à la surface de la membrane apicale est une caractéristique du diabète et de l'insulino-résistance (Kellett *et al.*, 2008; Leturque, Brot-Laroche and Le Gall, 2012).

Il a récemment été démontré l'existence d'une relation entre les cellules entéroendocrines et les entérocytes qui permet un couplage entre la détection des sucres et leur absorption. La détection du glucose par le récepteur T1R2/T1R3 présent à la surface des cellules entéroendocrines entraîne la dépolarisation de la membrane et une entrée de calcium dans l'entérocyte. L'élévation du calcium intracellulaire conduit à l'activation de la phospholipase  $\beta$ II. Cette cascade de réaction va conduire à la sécrétion de GLP-1 et GLP-2 par les cellules entéroendocrines. Le GLP-2 via une activation neuronale provoque la translocation de GLUT2 à la membrane apicale des entérocytes (Figure 19) (Smith *et al.*, 2018).

**Les lipides, glucides et les protéines sont les composants principaux de notre alimentation et dont l'excès alimentaire peut contribuer au développement de maladies métaboliques telles que l'obésité et le diabète de type 2 sur lesquelles je me suis focalisée dans le cadre de mon projet de thèse. Dans le cadre de ma thèse, je me suis particulièrement intéressée à la signalisation du goût sucré dans l'intestin.**



**Figure 12: Transporteurs du glucose, galactose et fructose dans les entérocytes**

Les transporteurs SGLT-1 et GLUT5, présents à la surface de la membrane apicale de l'entérocyte permettent l'entrée des mono et disaccharides dans la cellule. SGLT-1 est un co-transporteur permettant l'entrée de sodium et de glucose pour lequel il présente une forte affinité. GLUT5 participe au transport du fructose et du glucose à travers la membrane plasmique. GLUT2, présent au pôle baso-latéral permet la sortie des monosaccharides vers la circulation sanguine. De plus, GLUT2 peut être transloqué au pôle apical et assurer l'absorption de glucose, galactose et fructose lorsqu'ils sont présents en forte concentration dans la lumière intestinale.

*D'après Mueckler et Thorens, 2013 et Leturque, Brot-Laroche et Le Gall, 2012*

## Partie 3 : Signalisation du goût sucré dans l'intestin

Les glucides alimentaires sont multiples et représentent une source d'énergie majeure pour l'organisme. Dans l'intestin, les glucides sont absorbés par les entérocytes mais ils peuvent également être détectés par le récepteur spécifique responsables de la transduction du goût sucré dans les cellules entéroendocrines. A la différence des glucides, tous les édulcorants ne sont pas absorbés dans l'intestin mais sont détectés par le récepteur du goût sucré. Dans cette partie, je détaillerai les différents glucides et édulcorants puis la voie de transduction du goût sucré dans les cellules entéroendocrines.

### A) Structure des glucides et des édulcorants

#### 1) Les glucides

Les glucides alimentaires peuvent être classés de différentes manières. Les glucides sont composés de carbone, d'hydrogène et d'oxygène (CHO), c'est pourquoi ils peuvent être appelés hydrates de carbone ou carbohydrates. Les glucides peuvent être classés en fonction de leur indice ou index glycémique dont la référence est le glucose avec un indice glycémique de 100% ou de leur pouvoir sucrant, de leur capacité à être assimilés, ou encore selon leur structure chimique, leur poids moléculaire ou de leur degré de polymérisation (Guy-Grand, 2008).

L'indice glycémique a été créé en 1981 pour classer les aliments selon leur effet sur la glycémie. Il est défini par l'aire sous la courbe de la glycémie durant les 2 heures suivant l'ingestion d'un aliment contenant 50g de glucides. L'indice glycémique des aliments est mesuré en pourcentage à partir de la référence qui est le glucose. Ainsi on considère par exemple qu'une baguette de pain a un indice glycémique de 75% (Lecerf, 2007; Dal Gobbo and Bétry, 2018).

Le pouvoir sucrant caractérise le goût sucré d'un aliment, il représente la capacité d'un composé à être perçu par un individu comme du sucre. Il est déterminé par analyse sensorielle, technique permettant d'identifier les propriétés organoleptiques d'un aliment. Le pouvoir sucrant est mesuré par rapport à une référence qui est le saccharose dont le pouvoir sucrant est de 1. Par exemple, le pouvoir sucrant du glucose est de 0,70 (Guy-Grand, 2008).

La classification structurale des glucides en fonction du degré de polymérisation présente 4 classes (Tableau 2). La première classe comprend les sucres constitués d'un (mono-) ou deux (disaccharide) oses dont les principaux composés sont le glucose, fructose et le galactose ainsi que le saccharose et le lactose. La deuxième classe contient les oligosaccharides séparés en malto-oligosaccharides et oligosaccharides. La troisième classe comprend les polysaccharides dont les amidons digestibles et les polysaccharides non amylacés. Enfin, le quatrième et dernier groupe de glucides de cette classification contient les glucides hydrogénés (ou polyols).

Dans de nombreux aliments, nous retrouvons, de façon naturelle ou ajoutée, du saccharose, glucose, fructose, lactose, maltose ou galactose. Par exemple, le saccharose représente environ 75% des sucres ajoutés dans l'alimentation (Guy-Grand, 2008).

En conditions normales, les sucres sont absorbés par les entérocytes et l'élévation de la glycémie est régulée principalement par l'insuline. Chez les diabétiques, le défaut de sécrétion d'insuline et l'insulino-résistance entraînent une hyperglycémie. Afin de limiter les risques, les édulcorants ont été utilisés dans les régimes pour personnes diabétiques.

**Tableau 2: Classification structurale des glucides (d'après Guy-Grand, 2008)**

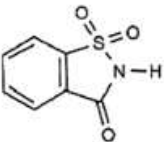
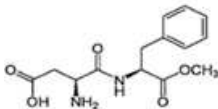
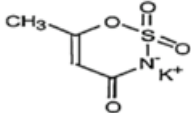
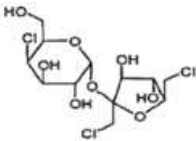
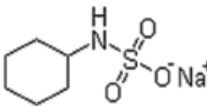
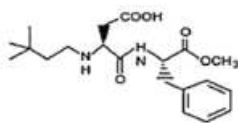
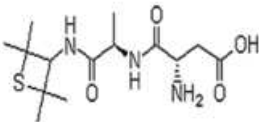
<b>Classe (degré de polymérisation)</b>	<b>Sous-groupe</b>	<b>Principaux composés</b>
Sucres (1-2)	Monosaccharides	Glucose, galactose, fructose
	Disaccharides	Saccharose, lactose, tréhalose, maltose, isomaltulose
Oligosaccharides (3-9)	Malto-oligosaccharides	Maltodextrines
	Autres oligosaccharides	Raffinose, fructo-oligosaccharides, galacto-oligosaccharides
Polysaccharides (>9)	Amidon	Amylose, amylopectine, amidons modifiés
	Polysaccharides non amylicés	Cellulose, hémicelluloses, pectines, inuline, hydrocolloïdes
Glucides hydrogéné (polyols)	De type monosaccharidique	Sorbitol, mannitol, xylitol, érythritol
	De type disaccharidique	Lactitol, maltitol
	De type oligosaccharidique	Sirops de maltitol, hydrolysats d'amidon hydrogénés
	De type polysaccharidique	Polydextrose

## 2) Les édulcorants

Les édulcorants, ou sucres de substitution, sont des substances d'origine naturelle ou de synthèse donnant une saveur sucrée. Ils sont populaires car ils ne sont pas ou sont peu caloriques, contrairement aux sucres (4Kcal/g) alors qu'une plus faible quantité d'édulcorants est nécessaire pour percevoir une intensité sucrée égale ou équivalente (Amouyal and Andreelli, 2012). Les édulcorants sont classés en deux catégories : les édulcorants de charge et les édulcorants intenses. Les édulcorants de charge ou sucre-alcool tels que le xylitol, sorbitol ou mannitol sont des substituts alimentaires et ont un pouvoir sucrant faible, de 1,5 fois celui du saccharose en moyenne. De plus, les édulcorants de charge fournissent des calories. La valeur énergétique des sucre-alcool est estimée à 2,4 kcal/g alors que celle du saccharose est de 4 kcal/g. Les édulcorants intenses sont des additifs alimentaires et ont un pouvoir sucrant élevé. En revanche, leur valeur énergétique est quasiment négligeable (Monnier and Colette, 2010). **Dans la suite de cet exposé, je m'intéresserai uniquement aux édulcorants intenses qui sont les plus utilisés dans l'alimentation.** Il en existe un grand nombre tels que la saccharine, l'aspartame, l'acesulfame-k, le sucralose, le cyclamate, le néotame ou l'alitame qui sont des édulcorants de synthèse ou la stevia qui est d'origine naturelle (Tableau 3). De plus, 6 protéines végétales naturelles sucrées ou modifiant le goût ont été identifiées : la néoculine, la brazzéine, la mabinlin, la thaumatine, la monelline et la miraculine. Le pouvoir sucrant de la brazzéine est de 1900 comparé au saccharose et celui de la monelline et la thaumatine est de 3000. Le pouvoir sucrant élevé de ces protéines et leurs bonnes propriétés sensorielles en font des édulcorants naturels prometteurs (Belloir, Neiers and Briand, 2017).

Le premier sucre de substitution mis sur le marché a été **la saccharine** découverte en 1879 par Remsen et Fahlberg. Elle n'est pas absorbée dans le tractus gastro-intestinal et n'affecte donc pas la glycémie ou la sécrétion d'insuline (Yilmaz and Uçar, 2015). La saccharine a un goût amer et métallique et possède un pouvoir sucrant 300 fois plus élevé que le saccharose. L'administration américaine des denrées alimentaires et des médicaments a estimé la dose journalière admissible (DJA) pour la saccharine à 5mg/kg/jour (Chakraborty and Das, 2018). Elle est utilisée dans l'alimentation (boisson, bonbon, confitures, etc), et fait également partie de la composition de certains dentifrices par exemple (Shankar, Ah and Sriram, 2013).

**Tableau 3: Caractéristiques des principaux édulcorants de synthèse (D'après Chattopadhyay, 2014)**

Edulcorant	Autre nom	Structure	Pouvoir sucrant*
Saccharine	Sweet'n'Low		300
Aspartame	Nutra sweet ; Equal		180-200
Acesulfame-k	Ace K; Sunette; Sweet'n'Safe		200
Sucralose	Splenda		600
Cyclamate	Sucaryl		30-50
Néotame	-		7 000 - 13 000
Alitame	-		2 000

\* Saccharose = 1

En revanche, l'**aspartame** est un dipeptide synthétique métabolisé en phenylalanine, acide aspartique et méthanol. Le pouvoir sucrant de l'aspartame est d'environ 200, comparé au saccharose dont le pouvoir sucrant est de 1. La DJA de l'aspartame a été établie par le Comité scientifique de l'alimentation de la Commission européenne à 40mg/kg/jour (Chakraborty and Das, 2018). L'aspartame n'est pas utilisé en pâtisserie car il est sensible à la chaleur mais il est présent dans l'alimentation, la boisson et les médicaments (Chattopadhyay, Raychaudhuri and Chakraborty, 2014; Choudhary and Pretorius, 2017).

L'**acesulfame-k, ou Ace-k**, est un édulcorant stable à la chaleur. Ayant un arrière-goût amer, il est habituellement associé avec un autre sucre de substitution, souvent l'aspartame ou le sucralose (Kuhn *et al.*, 2004). L'Ace-k possède un pouvoir sucrant 200 fois plus élevé que le saccharose. Le comité scientifique de l'alimentation de la Commission européenne a évalué sa dose journalière admissible entre 9 et 15 mg/kg/jour. L'apport journalier estimé est de 20% de la DJA compte tenu de son pouvoir sucrant élevé (Chakraborty and Das, 2018).

**Le sucralose** est un édulcorant fait à partir du saccharose en remplaçant 3 groupes hydroxyles par 3 atomes de chlorure. Le sucralose n'est pas métabolisé dans l'organisme, la majorité est excrétée dans les fèces (Magnuson, Roberts and Nestmann, 2017). Il a un pouvoir sucrant 450 à 650 fois plus élevé que le saccharose. La DJA du sucralose a été fixée par l'autorité européenne de sécurité des aliments à 40mg/kg/jour (Chakraborty and Das, 2019).

**Le cyclamate** est utilisé depuis les années 1950 aux Etats-Unis. Il est 30 fois plus sucré que le saccharose. Il a un goût amer et est souvent associé à la saccharine avec lequel il fait une synergie (Chattopadhyay, Raychaudhuri and Chakraborty, 2014).

**Le néotame** est formé par la N-alkylation de l'aspartame et a un pouvoir sucrant 30 à 60 fois plus élevé que ce dernier (Nofre and Tinti, 2000). En 2003, l'organisation des Nations unies pour l'alimentation et l'agriculture et l'organisation mondiale de la santé ont fixé la DJA à 2mg/kg/jour (Chakraborty and Das, 2019).

**L'alitame** un dipeptide d'acide L-aspartique et D-alanine. Il est rapidement absorbé dans l'intestin, métabolisé et excrété (Chattopadhyay, Raychaudhuri and Chakraborty, 2014). L'alitame a un pouvoir sucrant 200 fois plus élevé que le saccharose. La DJA est estimée à 1mg/kg/jour. A ce jour, l'alitame n'est commercialisé qu'en Colombie, Mexique, Chine, Australie et Nouvelle Zélande (Chakraborty and Das, 2019).



Parmi les édulcorants naturels, le plus connu est la stevia. La *Stevia rebaudiana* est une plante originaire du Paraguay et du Brésil. Ses feuilles sont séchées et transformées en une poudre fine qui est utilisée comme édulcorant naturel depuis des siècles par les tribus indiennes locales (Gerwig *et al.*, 2016). Les composants apportant le goût sucré sont les glycosides. Les feuilles de la *S. rebaudiana* en contiennent 41 différentes formes contenant un aglycone stéviol dont les principales sont le stevioside et le rebaudioside A. Ils ont un pouvoir sucrant entre 250 et 350 fois supérieur au saccharose (Serio, 2010; Gerwig *et al.*, 2016). La stevia commercialisée correspond à la poudre des feuilles de *S. rebaudiana* séchées et purifiées, contenant principalement du stevioside et du rebaudioside A. La pureté doit être supérieure à 95% (Gerwig *et al.*, 2016). Le comité mixte FAO-OMS (Food and Agriculture Organisation – Organisation Mondiale de la Santé) a estimé la DJA de la stevia à 4mg/kg/jour (Amouyal and Andreelli, 2012).

L'impact de ces édulcorants sur la santé est encore débattu. Des études ont montré que l'aspartame pouvait induire un stress oxydatif, endommager la membrane des cellules et conduire à une inflammation systémique (Choudhary and Pretorius, 2017). Chez le rat, la DJA pour l'aspartame est de 250mg/kg/jour et de 25mg/kg/jour pour la saccharine. Les rats traités avec 1000mg/kg/jour d'aspartame ou 100mg/kg/jour de saccharine présentent au niveau du foie une augmentation de l'activité de l'alanine aminotransférase et l'alkaline phosphatase, indicateurs de l'étendue des lésions hépatocellulaires. De plus, il a été observé une surexpression de h-Ras, un facteur oncogène, et une sous-expression de P27, un suppresseur de tumeur, indiquant un potentiel risque de carcinogenèse hépatique (Alkafafy *et al.*, 2015). Le sucralose a également des effets nocifs sur le foie en induisant une dégénérescence des hépatocytes et une infiltration lymphocytaire après ingestion régulière de 3g/kg/jour chez le rat pendant 30 jours (Dhurandhar, Bharihoke and Kalra, 2018).

L'Anses considère que les études menées chez l'Homme ou la souris ne permettent pas de mettre en évidence que la consommation d'édulcorants expose à un risque pour la santé (Schlienger, 2017).

## B) La voie de transduction du goût sucré

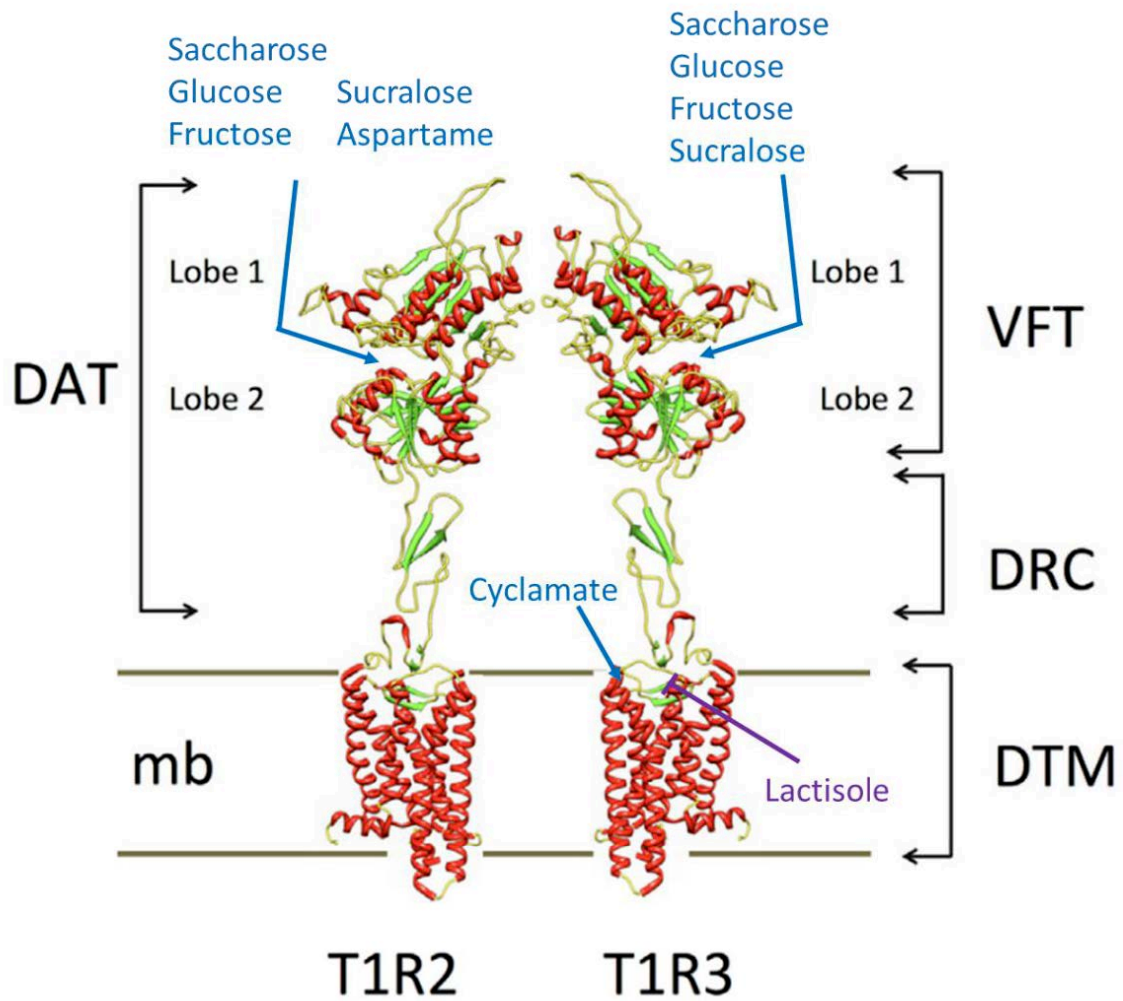
Le goût ou la gustation est le sens qui permet de percevoir la saveur d'une molécule. Nous distinguons 5 saveurs fondamentales : le sucré, l'amer, le salé, l'acide et l'umami.

La sensation de goût débute dans la bouche au niveau des papilles gustatives. Les papilles gustatives sont de petites aspérités couvrant la langue et reliées à des terminaisons nerveuses responsables du goût. On compte environ 100 cellules réceptrices du goût par papille gustative. La sensation de goût est déclenchée par des molécules dites sapides, c'est-à-dire ayant un goût, qui conduisent à la transduction du goût via différents acteurs que je vais présenter ci-dessous (Margolskee, 2002; Depoortere, 2014).

**Dans le cadre de ma thèse, je me suis intéressée à la transduction du goût sucré dans l'intestin dont les mécanismes de signalisation intracellulaire conduisent à la sécrétion d'entérohormones ou l'absorption du glucose.**

### 1) Le récepteur du goût sucré

Le récepteur impliqué dans la détection du goût sucré est un hétérodimère composé de l'assemblage de 2 sous-unités **taste receptor type 1 member 2 et 3** (T1R2 et T1R3) codés respectivement par les gènes *TAS1R2* et *TAS1R3* (Margolskee, 2002). Ce récepteur est présent à la surface des papilles gustatives de la langue, des cellules entéroendocrines, et également dans le pancréas, la vessie et le cerveau (Depoortere, 2014; Laffitte, Neiers and Briand, 2014; Takai *et al.*, 2015). De manière intéressante, il a été montré que la sous-unité T1R3, probablement en l'absence de T1R2, pouvait former un homodimère T1R3/T1R3. Ce récepteur est fonctionnel et capable de détecter les mono- et di-saccharides et le sucralose à forte concentration (Laffitte, Neiers and Briand, 2014).



**Figure 13: Le récepteur T1R2 et T1R3.**

Le récepteur du goût sucré est un hétérodimère composé des sous-unités T1R2 et T1R3. Ces deux sous-unités sont composées d'un large domaine amino-terminal (DAT), lui-même composé de deux sous-unités : un domaine vénus flytrap (VFT) et un court domaine riche en cystéine (DRC) qui lie le DAT au domaine transmembranaire (DTM) de structure en hélice  $\alpha$ . Les différents sites de liaison pour les différents sucres et édulcorants sont représentés en bleu. Le site de liaison pour le lactisol, inhibiteur du récepteur du goût sucré est représenté en mauve.

*D'après Sigoillot, 2015.*

Le récepteur T1R2/T1R3 agit en hétérodimère et détecte aussi bien les glucides que les édulcorants. Il contient un grand domaine amino-terminal (DAT). Ce DAT comprend un domaine vénus flytrap (VFT) et un court domaine riche en cystéine (DRC) qui lie le DAT au domaine transmembranaire en hélice  $\alpha$  (DTM), caractéristique des RCPG (figure 13) (Laffitte, Neiers and Briand, 2014). Le domaine VFT est composé de deux lobes sur lesquels la majorité des glucides et édulcorants se lient de façon différentielle et spécifique (Laffitte, Neiers and Briand, 2014).

En effet, il a été montré que le domaine VFT de T1R2 présentait un site de liaison pour les glucides naturels tels que le saccharose, le glucose et le fructose et pour quelques édulcorants comme le sucralose et l'aspartame. Le domaine VFT de T1R3 lie aussi le saccharose, le glucose, le fructose et le sucralose, mais avec une plus faible affinité que T1R2. T1R3 présente également un site de liaison au niveau de son DTM, capable de lier certains édulcorants tels que le cyclamate. Un site de liaison pour des inhibiteurs de ces récepteurs tels que le lactisol a été également détecté au niveau du DTM de T1R3 (figure 13) (Cui *et al.*, 2006; Laffitte, Neiers and Briand, 2014; Sigoillot *et al.*, 2015).

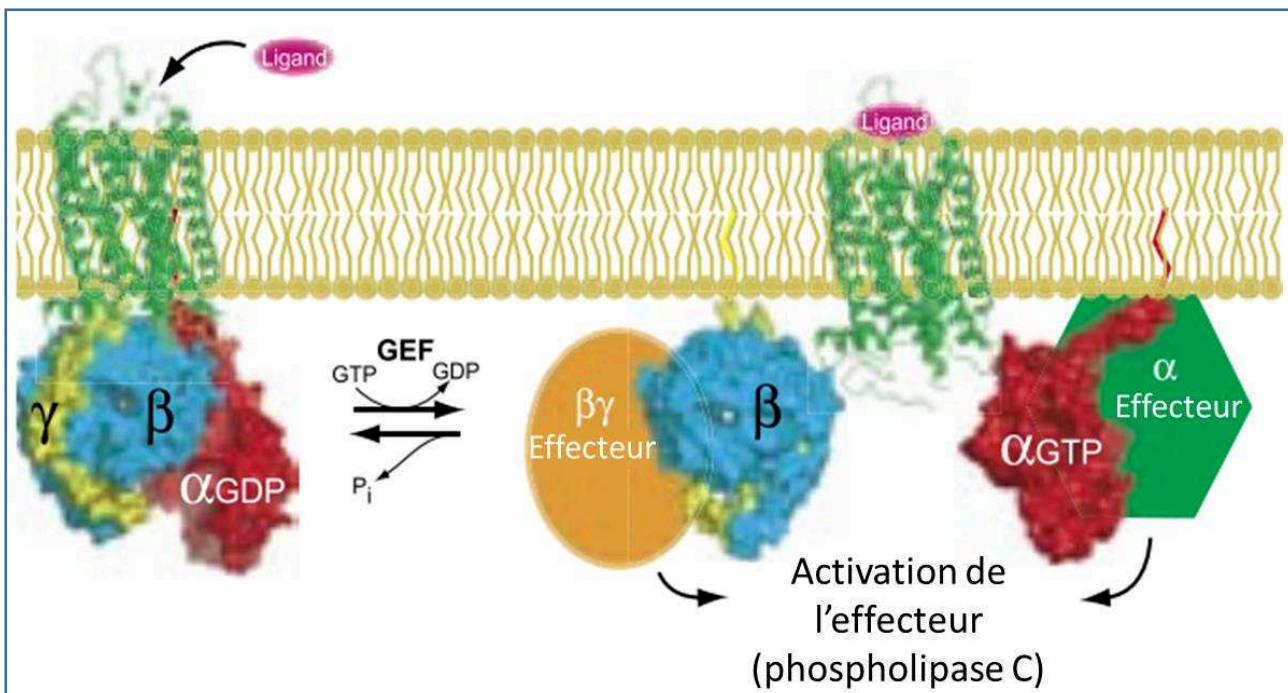
**Le récepteur du goût sucré est couplé à une protéine G (RCPG) de classe C ayant une structure particulière, la gustducine (Margolskee, 2002). La liaison des composés sucrés à l'hétérodimère T1R2/T1R3 active la gustducine.**

## 2) La gustducine : protéine G couplée aux récepteurs du goût sucré

La gustducine fait partie de la famille des protéines G hétérotrimériques. Elle est composée de trois sous-unités :  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$  codées respectivement par les gènes *GNAT3*, *GNB3* et *GNG13* (Ren *et al.*, 2009).

Comme toutes les protéines G hétérotrimériques à l'état basal, la sous-unité  $\alpha$ , associée au dimère  $\beta\gamma$ , est liée au GDP. La liaison de composé sucré par le récepteur T1R2/T1R3 va activer la protéine G gustducine à laquelle ils sont couplés. La sous-unité  $\alpha$ , alors associée à la GTP va se dissocier du dimère  $\beta\gamma$  via l'action d'une protéine Guanine nucleotide exchange factor (GEF) et interagir avec son effecteur, la phospholipase C, pour initier une cascade de signalisation intracellulaire (figure 14) (Jones, Siderovski and Hooks, 2004).

Il existe une grande variété de sous-unités  $\alpha$  de protéine G qui lui confère sa spécificité: certaines sont exprimées dans les cellules de manière ubiquitaire (comme par exemple  $\alpha_s$  et  $\alpha_i$ ), tandis que d'autres protéines G impliquées dans la transduction sensorielle ne sont exprimées que dans des cellules sensorielles spécialisées. Par exemple, les transducines ( $G_t$ ) transduisent la photoexcitation dans les cellules de la tige et du cône rétiens, et  $G_{olf}$  transduit la stimulation olfactive dans les neurones de l'épithélium olfactif (McLaughlin, McKinnon and Margolskee, 1992).



**Figure 14: Activation de la protéine hétérotrimérique G**

A l'état basal, la protéine G est composée d'une sous-unité  $\alpha$  liée au GDP et associée à un dimère  $\beta\gamma$ . La liaison d'un ligand avec le récepteur couplé à la protéine G conduit, grâce à une protéine Guanine nucleotide exchange factor (GEF), à la dissociation de la sous-unité  $\alpha$  désormais couplée au GTP du dimère  $\beta\gamma$ . La sous-unité  $\alpha$  va pouvoir interagir avec un effecteur. Dans le cas de l' $\alpha$ -gustducine, l'effecteur est la phospholipase C.

*D'après Jones, 2004.*

**Dans le cas de la transduction du goût sucré, la sous-unité  $\alpha$  est la  $\alpha$  gustucine.**

Comme je l'ai décrit précédemment, à l'état basal, la sous-unité  $\alpha$  des protéines G hétérotrimériques est associée au dimère  $\beta/\gamma$ . Les sous-unités  $\alpha$  des protéines G confèrent pour la plupart la spécificité d'interaction entre le récepteur et les effecteurs dans le processus de transduction du signal. La sous-unité alpha de la gustducine, nommée Gustducin alpha-3 chain

(ou Guanine nucleotide-binding protein G(t) subunit alpha-3) a été découverte en 1992 par l'équipe de Margolskee (McLaughlin, McKinnon and Margolskee, 1992) et est codée par le gène *GNAT3*. *GNAT3* est un gène de 1703 paires de bases codant pour une protéine de 354 acides aminés (McLaughlin, McKinnon and Margolskee, 1992). L'équipe de Margolskee a montré que l'ARNm de l' $\alpha$ -gustducine était exprimé dans toutes les papilles gustatives de la langue. Il n'est pas exprimé dans les parties non sensorielles de la langue ni dans d'autres tissus (épithélium olfactif, rétine, cerveau, foie, cœur, reins) (McLaughlin, McKinnon and Margolskee, 1992).

La localisation tissulaire de la gustducine n'est toujours pas claire mais nous savons maintenant que *GNAT3* est également exprimé dans l'intestin, dans les cellules entéroendocrines, dans le pancréas, les reins et l'urètre (Rozengurt, 2006; Deckmann *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2015). Jang & coll. ont mis en évidence, la présence de l' $\alpha$ -gustducine dans plus de 90% des cellules entéroendocrines, sécrétrices de GLP-1, dans des biopsies de duodénum humain (Jang *et al.*, 2007).

**La gustducine est de la famille des protéines Gq qui permet l'activation de la phospholipase C $\beta$ 2.**

### **3) La phospholipase C- $\beta$ 2, l'effecteur de la gustducine**

**Dans la voie de transduction du goût sucré, l'activation de la gustducine déclenche une voie de signalisation et conduit à une augmentation de l'activité de la phospholipase C- $\beta$ 2.**

La phospholipase C- $\beta$ 2, codée par le gène *PLCB2*, dégrade le phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PIP2) en inositol 1,4,5-trisphosphate (IP3) et diacylglycérol (DAG) (Huque, Brand and Rabinowitz, 1992). Les récepteurs de l'IP3, IP3R3, sont exprimés dans tous les tissus et sont notamment présents sur la membrane du réticulum endoplasmique des cellules entéroendocrines. La liaison de l'IP3 sur son récepteur IP3R3 va permettre la libération du calcium stocké dans le réticulum endoplasmique dans le cytoplasme (Mak and Foskett, 2015). L'inactivation totale du gène codant pour l'IP3R3 chez la souris entraîne un défaut de reconnaissance du goût sucré (Hisatsune *et al.*, 2007).

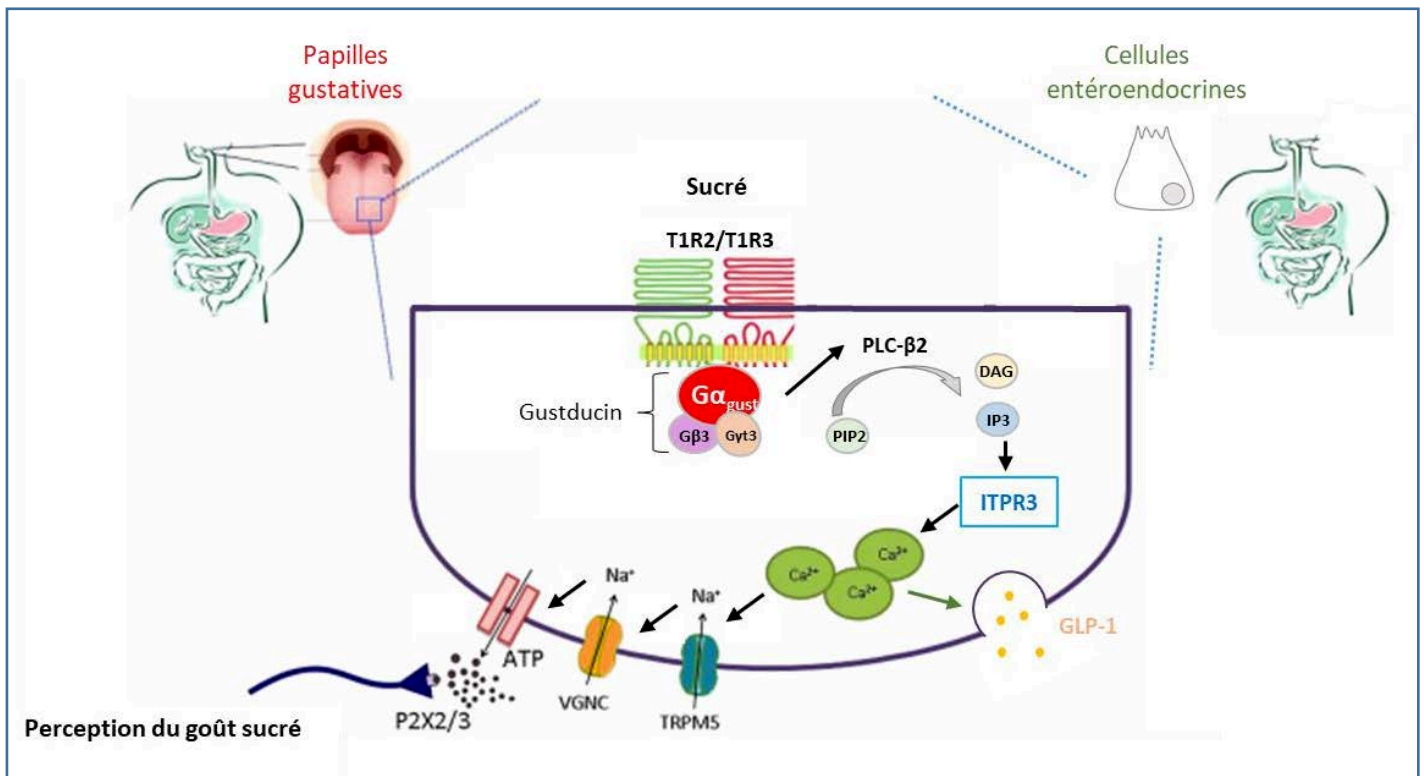
L'augmentation de la concentration en calcium intracellulaire va alors conduire à la dépolarisation de la cellule et à l'activation de canaux sodiques (TRPM5 et VGNC), puis à la

génération de potentiels d'action induisant la libération d'adénosine triphosphate (ATP) par la cellule (figure 15) (Murata *et al.*, 2010; Depoortere, 2014).

**Dans la bouche, la voie de transduction du goût sucré conduit à la perception du goût sucré, via l'activation des récepteurs purinergiques par l'ATP libéré par les papilles (Figure 15).**

L'ATP est un ligand naturel des récepteurs purinergiques appelés P2X. Les P2Xs sont des canaux sélectifs pour les cations avec une forte perméabilité pour le calcium, sodium et potassium. Il existe 7 formes homotrimériques (P2X1 à P2X7) et trois récepteurs hétérotrimériques nommés P2X2/3, P2X4/6 et P2X1/5. La forme P2X2/3 joue un rôle essentiel dans la voie de signalisation du goût. Son invalidation chez la souris entraîne une perte presque totale des réponses neuronales et comportementales à toutes les qualités gustatives (Finger *et al.*, 2005).

**Dans l'intestin, la voie de transduction du goût sucré conduit à la sécrétion de GLP-1 et GLP-2 par les cellules entéroendocrines (figure 15).** Aucune preuve de libération d'ATP dans les cellules entéroendocrines n'a encore été montrée. Le GLP-1 est sécrété en réponse à la détection de composés sucrés et active le nerf vague. L'activation par le GLP-1 des fibres nerveuses sensibles au goût sucré est inhibée par un prétraitement avec antagoniste du GLP-1R. Ces résultats indiquent que, chez la souris, le GLP-1 est spécifiquement impliqué dans la transmission des signaux du goût sucré (Takai *et al.*, 2015). La réponse nerveuse aux édulcorants tels que le sucrose est réduite chez les souris GLP-1R<sup>-/-</sup> de même que la réponse au glucose, maltose ou fructose. Aussi, le comportement alimentaire des souris GLP-1R<sup>-/-</sup> montre qu'elles sont moins attirées par les aliments sucrés (Martin *et al.*, 2009).



**Figure 15: Mécanismes de transduction du goût sucré**

Sur les papilles gustatives et les cellules entéroendocrines, le récepteur hétérodimérique T1R2/T1R3 détecte les sucres et les édulcorants. Il active la gustducine, protéine G couplée à ce récepteur. Cela conduit à une augmentation de l'activité de la phospholipase C-β2 qui produit de l'inositol 1,4,5-trisphosphate (IP3) et du diacylglycérol (DAG) à partir de phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PIP2). La liaison de l'IP3 avec son récepteurs ITPR3 entraîne une libération du calcium intracellulaire et l'activation du canal sodique transient receptor potential cation channel M5 (TRPM5). La dépolarisation de la cellule active le canal sodique voltage dépendant VGNC et permet, dans les papilles, la libération d'ATP qui active les récepteurs purinergiques P2X2/3 sur les fibres nerveuses afférentes conduisant à la perception du goût. Dans la cellule entéroendocrine l'augmentation de calcium intracellulaire conduit également à la sécrétion d'entérohormone comme le GLP-1.

*D'après Depoortere, 2014.*



#### 4) Conséquence d'un défaut de signalisation dans la transduction du goût sucré

Dans les cellules entéroendocrines sécrétrices de GLP-1, la transduction du goût sucré conduit à la sécrétion de GLP-1 et GLP-2 comme je l'ai présenté précédemment dans cet exposé. Un défaut dans cette voie de signalisation conduit à un défaut de sécrétion de GLP-1 et GLP-2. En effet, l'inactivation chez la souris des gènes TAS1R2 et TAS1R3 codant pour le récepteur hétérodimérique du goût sucré conduit à une inhibition de la sécrétion de GLP-1 et de GLP-2 en réponse à une ingestion de glucose par gavage (Margolskee *et al.*, 2007; Kokrashvili, Mosinger and Margolskee, 2009; Smith *et al.*, 2018). De plus, Smith et al ont montré le rôle indirect du récepteur T1R2 dans l'absorption du glucose. En cas de forte concentration de glucose dans la lumière intestinale, le GLP-2 sécrété par les cellules entéroendocrines conduit, via une activation neuronale mise en évidence par l'accumulation de cfos sous forme phosphorylée, à la translocation des transporteurs GLUT2 à la membrane apicale des entérocytes et participent ainsi à l'absorption du glucose. L'inactivation du gène TAS1R2 chez la souris inhibe la translocation de GLUT2 à la membrane apicale des entérocytes et altère l'absorption du glucose lorsqu'il est présent en quantité élevée dans l'intestin (Smith *et al.*, 2018).

Comme je l'ai présenté précédemment, l' $\alpha$ -gustducine, associée aux récepteurs T1R2 et T1R3, permet la transduction du goût sucré et stimule la sécrétion de GLP-1 et GLP-2 (Dimitriadis, Randeva and Miras, 2017). L'inactivation de l' $\alpha$ -gustducine altère l'expression de SGLT1, un des principaux transporteurs impliqués dans l'absorption intestinale du glucose. Les sucres et édulcorants présents dans la lumière intestinale stimulent l'expression de l'ARNm de SGLT1. L'inactivation de  $\alpha$ -gustducine inhibe cette stimulation. Elle est donc nécessaire à la surexpression de SGLT1 en réponse aux glucides et édulcorants. La même observation a été faite avec l'inactivation du récepteur T1R3 (Margolskee *et al.*, 2007).

Feng *et al* ont étudié les effets du dextran sulfate sodium (DSS) sur les souris invalidées pour l' $\alpha$ -gustducine,  $\alpha$ -gust<sup>-/-</sup>. Le DSS est un colitogène connu pour provoquer des lésions épithéliales intestinales et une inflammation. Chez la souris  $\alpha$ -gust<sup>-/-</sup>, le traitement au DSS aggrave la perte de poids, les saignements intestinaux et l'inflammation. Ces résultats suggèrent un rôle important de la voie de transduction du goût sucré dans la régulation du système immunitaire intestinal et de l'inflammation (Feng *et al.*, 2018). De plus, l'inactivation de l' $\alpha$ -gustducine chez la souris réduit la prise de poids induite par un régime obésogène. Ces

souris présentent également une augmentation de l'activité de thermogénèse dans le tissu adipeux, ce qui conduit à une diminution de la masse de tissu adipeux blanc (Avau *et al.*, 2015). Ces résultats suggèrent que l' $\alpha$ -gustducine est impliquée dans le développement de l'obésité.

Les souris invalidées pour les sous-unités T1R2, T1R3 ou pour l' $\alpha$ -gustducine sont considérées comme des modèles de déficience fonctionnelle de la sécrétion de GLP-1. En effet, les souris  $\alpha$ -gust<sup>-/-</sup> présentent un défaut de sécrétion du GLP-1 en réponse au glucose (Jang *et al.*, 2007; Margolskee *et al.*, 2007). Ces auteurs ont également montré *in vitro* une diminution de la sécrétion de GLP-1 en réponse au glucose dans une lignée de cellules entéroendocrines humaines, les NCI-H716, dont l'expression de l' $\alpha$ -gustducine a été inhibée (Jang *et al.*, 2007). De plus, ils montrent que chez les souris  $\alpha$ -gust<sup>-/-</sup>, l'hétérodimère  $\beta\gamma$ -gustducine ne se forme pas correctement et que les signaux médiés par la gustducine sont perdus. Donc chez les souris  $\alpha$ -gust<sup>-/-</sup>, la concentration plasmatique en GLP-1 n'augmente pas en réponse au glucose, ainsi que la sécrétion d'insuline normalement amplifiée en réponse au glucose, ne l'est pas dans ce modèle. Il y a donc une diminution de l'effet incrétine (Jang *et al.*, 2007).

Dans les maladies métaboliques telles que l'obésité et le diabète de type 2, les concentrations plasmatiques en entérohormones et notamment GLP-1 sont diminuées. Il a été montré que la chirurgie bariatrique et particulièrement le bypass gastrique entraîne une amélioration métabolique et une stimulation de la sécrétion de GLP-1. Chez la souris  $\alpha$ -gust<sup>-/-</sup>, la sécrétion de GLP-1 n'est pas augmentée en réponse au glucose après chirurgie (Mokadem *et al.*, 2014). L'absence d'activation de l' $\alpha$ -gustducine empêche la transmission du signal venant du récepteur et inhibe l'augmentation de l'activité de la phospholipase.

**L' $\alpha$ -gustducine est impliqué dans le développement de l'obésité, la transduction du goût sucré, la régulation du système immunitaire intestinal, l'inflammation et la sécrétion de GLP-1.**

Cependant, des études remettent en question l'implication de la voie de transduction du goût sucré dans la sécrétion de GLP-1. Dans ces études chez l'Homme, la détection de sucralose par le récepteur T1R2/T1R3 n'augmente pas la sécrétion de GLP-1 (Ma *et al.*, 2009; Ford *et al.*, 2011). Aussi, une étude de Steinert a montré que le glucose était plus efficace que le fructose pour stimuler la sécrétion de GLP-1 et que les édulcorants comme le sucralose, l'aspartame ou l'acesulfame K n'avaient pas d'effet sur les concentrations plasmatiques en GLP-1 (Robert

E. Steinert *et al.*, 2011). Saltiel *et al.* ont également montré chez le rat que la sécrétion de GLP-1 était spécifique des édulcorants détectés. En effet, le sucralose stimulait la sécrétion de GLP-1 uniquement lorsqu'il était injecté au niveau vasculaire et non dans la lumière intestinale. Au contraire, l'acesulfame K stimulait la sécrétion de GLP-1 lorsqu'il était administré dans la lumière intestinale (Saltiel *et al.*, 2017).

## Partie 4 : L'intestin dans les pathologies métaboliques

L'intestin est en contact permanent avec l'environnement et le renouvellement continu des cellules épithéliales lui permet de s'adapter à l'environnement nutritionnel ainsi qu'aux maladies métaboliques telles que l'obésité et le diabète de type 2. Dans cette partie, je présenterai les maladies métaboliques que sont l'obésité et le diabète de type 2. Je développerai également leur impact sur le microbiote et la fonction endocrine de l'intestin puis je présenterai les traitements utilisés.

### A) L'obésité et le diabète de type 2

#### 1) L'obésité

L'obésité est un problème mondial de santé. Au cours des 3 dernières décennies, l'incidence de l'obésité a crue de façon drastique. En effet, l'OMS rapporte que l'obésité a doublé entre 1980 et 2014 à l'échelle mondiale. Ce phénomène, autrefois considéré spécifique aux pays à hauts revenus s'est développé dans les pays à revenus faibles ou intermédiaires (Julia and Hercberg, 2016). Dans les pays où la prévalence de l'obésité était la plus élevée dans les années 1970, comme les Etats-Unis, la progression s'est poursuivie jusqu'aux années 2000. Dans d'autres pays, la progression a été plus tardive comme en Grande-Bretagne (dans les années 1980) ou la France (dans les années 1990) (Charles, 2011). De plus l'obésité est associée au statut socio-économique et aux facteurs environnementaux comme la sédentarité, le manque d'activité physique ou l'augmentation des portions alimentaires (Vecchié *et al.*, 2018).

L'obésité est définie selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) par une accumulation excessive de graisse corporelle qui représente un risque pour la santé. Elle est mesurée en calculant l'Indice de Masse Corporelle (IMC) d'un individu (poids en kg par la taille en mètre au carré). Si une personne a un IMC égal ou supérieur à 25, elle est en surpoids ; au-delà de 30 l'obésité est de classe I. Lorsque l'IMC est supérieur à 35, le patient est atteint d'obésité de classe II et de classe III si l'IMC dépasse 40 kg/m<sup>2</sup> (Vecchié *et al.*, 2018). L'équipe de Krakauer propose un nouvel algorithme se voulant plus précis : A Body Shape Index (ABSI), basé sur la taille, le poids et le tour de taille (Krakauer and Krakauer, 2012). Cependant, ni l'IMC ni l'ABSI ne tient compte de l'âge ou du sexe des individus et ne distingue pas la masse grasse de la masse maigre.

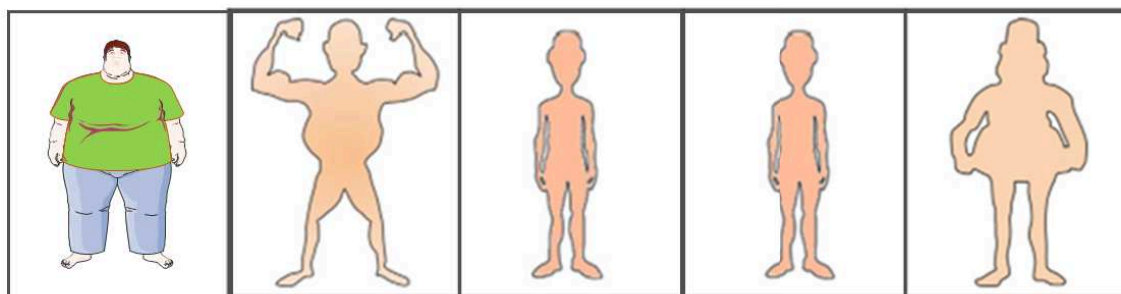
Il est désormais décrit dans la littérature, plusieurs formes d'obésité qui peuvent altérer le métabolisme avec différents phénotypes (figure 16).

#### Les obèses métaboliquement sains :

La prévalence du phénotype obèse métaboliquement sain est d'environ 10 à 44% des adultes européens obèses, elle est plus élevée chez les femmes que chez les hommes et diminue avec l'âge (Vecchié *et al.*, 2018). Ces individus présentent un IMC supérieur à 30 associé à un profil métabolique sain. Malgré leur IMC élevé, ils présentent une forte sensibilité à l'insuline, peu de cytokine pro-inflammatoire dans le tissu adipeux et le plasma. Le risque d'accidents cardiovasculaires et la mortalité de ces sujets est moindre et comparable à des personnes ayant un IMC normal, entre 18 et 25. Cependant, certaines études montrent que ce phénotype augmente le risque de maladie cardiovasculaire, de maladie rénale chronique et de stéatose hépatique (Aung *et al.*, 2014; Heianza *et al.*, 2014). Schroder et ses collègues ont suivi des patients pendant 10 ans et ont ainsi démontré que la moitié des patients obèses métaboliquement sains développaient ensuite un phénotype non sain. Parmi les 301 patients obèses métaboliquement sains, 148 ont développé des désordres métaboliques comme un tour de taille et une concentration plasmatique en lipides plus élevée (Schröder *et al.*, 2014). D'autres équipes ont montré la pertinence de prendre en considération le degré d'adiposité viscérale, en particulier au niveau du foie et les caractéristiques inflammatoires (Stefan *et al.*, 2008).

#### Les non obèses métaboliquement obèses :

La prévalence de ce phénotype est comprise entre 5 et 45% selon la définition choisie et les facteurs sociaux et démographiques (Ding, Chan and Magkos, 2016). Les non obèses métaboliquement obèses sont des sujets de poids normal mais présentant les mêmes facteurs de risques cardiovasculaires que des individus obèses. Ils présentent un pourcentage élevé de tissus adipeux viscéral, une hyper-insulinémie accompagnée d'une faible sensibilité à l'insuline, dyslipidémie et une forte concentration plasmatique en cytokine pro-inflammatoire (Hyun *et al.*, 2008). Ces individus sont généralement plus âgés, plus sédentaires, fument plus et ont un tour de taille plus élevé que les personnes saines (Wildman *et al.*, 2008).



	Obèse selon l'OMS	Obèse métaboliquement sain	Non obèse métaboliquement obèse	Obèse de poids normal	Obèse sarcopénique
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	>30	>30	18,5 – 25	18,5 – 25	>30
Tissu adipeux viscéral / masse grasse	Élevé	Faible	Élevé	Masse grasse >30%	Élevé
Masse maigre	Normal	Élevée	Normal	Normal	Faible
Capacité cardiorespiratoire	Faible	Élevée	Faible	/	Faible
Désordres métaboliques	Présent	Absent	Présent	Absent	Présent

**Figure 16: Caractéristiques des phénotypes « obèses »**

De nouveaux phénotypes obèses sont décrits dans la littérature. Les obèses métaboliquement sains sont des individus obèses sans comorbidité associée. Les non obèses métaboliquement obèses sont des patients ayant un IMC normal mais présentant des désordres métaboliques. Le syndrome des obèses de poids normal correspond à un IMC normal avec cependant une masse grasse supérieure à 30%. Chez les sujets âgés de 65 ans et plus, on observe une augmentation de la prévalence du phénotype obèse sarcopénique caractérisé par une faible masse maigre et un tissu adipeux très développé.

*D'après Vecchié, 2018*

### Le syndrome obèse de poids normal :

Il s'agit de sujets de poids normal ayant une masse grasse supérieure à 30% de leur masse totale (Vecchié *et al.*, 2018). Contrairement aux non obèses métaboliquement obèses, ces individus ne présentent aucun désordre métabolique. De Lorenzo a mené une étude sur des femmes non obèses en bonne santé, non obèses présentant un syndrome obèse et, obèses étant proche en âge. La masse corporelle et le risque cardiovasculaire n'étaient pas différents entre les non obèses et les obèses de poids normal. Cependant, cette étude a montré que des femmes obèses de poids normal présentaient un taux de cytokines pro-inflammatoire intermédiaire entre les patientes non obèses et pré-obèse (De Lorenzo *et al.*, 2007).

### Les obèses sarcopéniques :

La prévalence de l'obésité sarcopénique est très variable. Il s'agit de patients ayant une faible masse musculaire ainsi qu'une diminution de la force (sarcopénie) et une masse grasse élevée. Ce phénotype est plus courant chez les patients âgés de plus de 65 ans, chez qui on observe une prise de masse grasse et une perte de masse musculaire due au vieillissement (Vecchié *et al.*, 2018). Avec le vieillissement, la graisse peut s'accumuler à la fois viscéralement et ectopiquement plutôt qu'au niveau sous-cutané abdominal (Batsis and Villareal, 2018). Cette accumulation est stimulée notamment par une réduction de l'activité physique, des changements hormonaux et une résistance à la leptine, hormone qui contrôle la sensation de satiété. L'inflammation chronique due à l'obésité a un effet catabolique sur la masse musculaire. De plus, des études montrent les risques de ce phénotype sur le métabolisme (Lim *et al.*, 2010), les maladies cardiovasculaires (Kim *et al.*, 2014). Les risques sont plus élevés que la sarcopénie seule ou l'obésité seule (Batsis and Villareal, 2018; Vecchié *et al.*, 2018).

De plus, l'obésité est associée à une inflammation systémique de bas grade. L'inflammation du tissu adipeux participe à l'altération des tissus observée au cours de l'obésité (Faucher and Poitou, 2016). L'inflammation de bas grade est caractérisée par une augmentation des taux circulants de médiateurs inflammatoires tels que la protéine C réactive (CRP), des cytokines, des interleukines, des molécules d'adhésion et du remodelage de la matrice extracellulaire et une diminution de la concentration en adiponectine anti-inflammatoire (Clément and Vignes, 2009; Schlienger, 2010). Une étude réalisée par notre équipe a également montré une inflammation intestinale induite par les lymphocytes T dans ce contexte d'obésité (Monteiro-

Sepulveda *et al.*, 2015). L'inflammation stimule les processus d'athérogenèse et entraîne des anomalies immuno-inflammatoire. Ces modifications altèrent le fonctionnement du foie et du système nerveux central. Elles peuvent conduire à des complications comme des stéatohépatites définies par une accumulation de triglycérides dans les hépatocytes. La stéatose hépatique présente une infiltration inflammatoire et une évolution fibrosante pouvant conduire à une cirrhose. De plus, de nombreux travaux cherchent à préciser l'impact de l'obésité dans l'incidence des cancers de l'œsophage, des voies biliaires, des reins, du sein, du côlon. En outre, l'obésité altère la mécanique respiratoire et entraîne une dyspnée proportionnelle à l'IMC du patient (Schlienger, 2010).

**Dans le cadre de ma thèse, les individus sont considérés comme obèses dès lors que leur IMC est supérieur à 30 qu'il y ait ou non présence de comorbidités associées. L'obésité est souvent associée à des facteurs de comorbidité telles que les maladies cardiovasculaires et le diabète de type 2.**

## 2) Le diabète de type 2

Il existe différentes formes de diabètes, les plus fréquentes sont le diabète de type 1 et le diabète de type 2 (DT2), toutes les deux caractérisées par une hyperglycémie chronique. Le diabète de type 1 est causé par une destruction auto-immune des cellules  $\beta$  pancréatiques, conduisant à une absence de sécrétion d'insuline (DiMeglio, Evans-Molina and Oram, 2018). Le DT2 est la forme la plus répandue des diabètes diagnostiqués. En 2014, le DT2 correspond à 90-95% des diabètes diagnostiqués chez l'adulte et sa prévalence augmente chez l'enfant et l'adolescent (Henning, 2018). Il est lié à un défaut de sécrétion d'insuline par le pancréas ainsi qu'à une insulino-résistance (Landgraf *et al.*, 2019). Selon la Haute Autorité de Santé, le DT2 est défini par une glycémie supérieure à 1,26 g/L après un jeûne de 8 heures, ou une glycémie supérieure ou égale à 2 g/L 2 heures après une charge orale de 75 g de glucose (David and Boinet, 2018; Tenenbaum *et al.*, 2018). De plus, une mesure de l'hémoglobine glyquée HBA1C supérieure à 6,5% est caractéristique du diabète (Vijan, 2015). L'HBA1C est formé par la glycosylation de l'hémoglobine et sa valeur représente le statut glycémique du patient au cours des 2 à 3 derniers mois (Nitin, 2010).

Au début des années 1900, les scientifiques pensaient que le DT2 étaient uniquement dû à un défaut de sécrétion de l'insuline par le pancréas. Nous savons désormais qu'il s'agit d'un



désordre complexe impliquant également le foie, les muscles, les reins, le tissu adipeux, le cerveau, les cellules  $\alpha$  et l'intestin (Brunton, 2016).

L'insuline, hormone clé de l'homostasie glucidique inhibe la production hépatique de glucose par le foie en inhibant la néoglucogénèse et stimule la captation du glucose par les tissus périphériques tels que les muscles et le tissu adipeux. Les patients atteints de DT2 ont besoin d'une concentration plus élevée en insuline pour inhiber la production hépatique de glucose, c'est ce qui caractérise l'insulino-résistance (Groop *et al.*, 1993). L'augmentation de la production hépatique de glucose est à l'origine de l'hyperglycémie à jeun observée chez ces patients. Le pancréas produit plus d'insuline en réponse à cette glycémie élevée puis fini par s'épuiser et causer le diabète (Kahn, Cooper and Del Prato, 2014).

L'hyperglycémie peut entraîner des complications telles que des rétinopathies, néphropathies ou neuropathie. De plus, les adultes diabétiques sont 2 à 3 fois plus sujets aux maladies cardiovasculaires qui sont la cause principale de décès prématurés chez ces patients (Henning, 2018).

Les facteurs de prédisposition au DT2 sont l'hypertension, la dyslipidémie, le tabagisme, l'âge et principalement l'obésité. Un sujet obèse de 18 ans a un risque supérieur à 50% de développer un DT2 et plus son IMC est élevé plus le risque augmente. Environ 80% des patients atteints de DT2 sont obèses ou en surpoids (Henning, 2018).

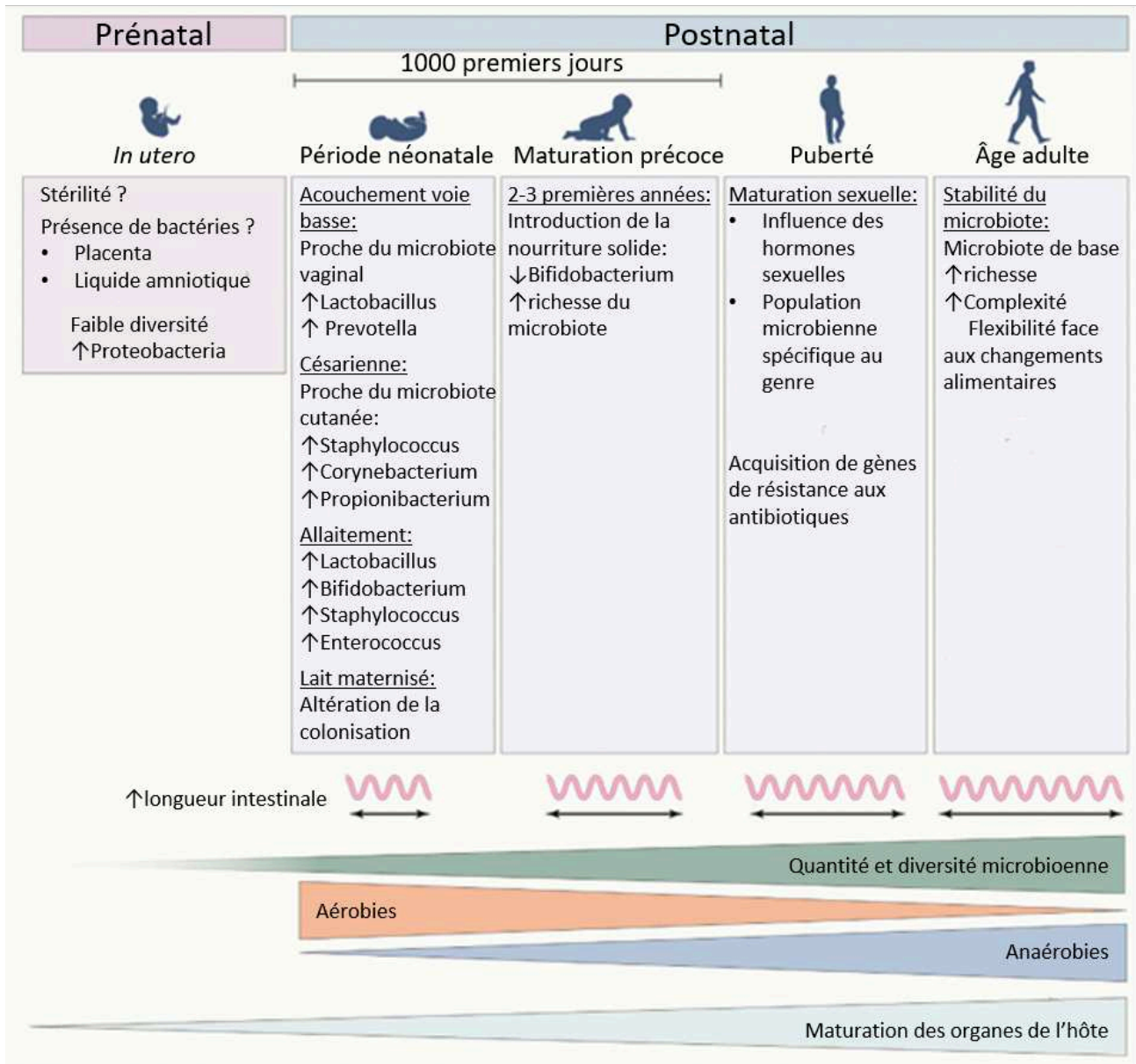
**L'obésité et le DT2 peuvent altérer d'autres fonctions et notamment le microbiote intestinal ainsi que la fonction endocrine de l'intestin.**

## **B) Dysbiose du microbiote**

L'intestin grêle abrite de nombreux micro-organismes formant le microbiote intestinal. Celui-ci se compose principalement de bactéries mais également des champignons archées, protozoaires et virus. On estime entre  $10^{12}$  et  $10^{14}$  le nombre de bactéries vivant tout au long de l'intestin, ce qui en fait l'organe abritant la communauté bactérienne la plus importante et la plus diversifiée (Dave *et al.*, 2012). Chaque individu possède un microbiote qui lui est propre et dont la densité ainsi que la diversité sont différentes tout au long du système digestif, la densité la plus importante étant observée dans le côlon. Le microbiote est constitué d'environ 500 à 1000 espèces de bactéries qui sont classées dans différents phyla dont les 4 principaux sont : *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Actinobacteria* et *Proteobacteria* (Arumugam *et al.*, 2011;

Sommer, 2015). La diversité bactérienne peut être modifiée par de nombreux facteurs tels que l'âge de l'individu (Hopkins, Sharp and Macfarlane, 2002), l'alimentation, des traitements médicamenteux ou des pathologies telles que l'obésité et le DT2 ainsi que la chirurgie bariatrique (Dave *et al.*, 2012; Debédat, Clément and Aron-Wisnewsky, 2019).

Depuis toujours, on pense que l'embryon est stérile *in utero*. Cependant, des études montrent que les fœtus sont en contact avec des bactéries. En effet dans le placenta et le liquide amniotique, une faible densité de bactéries est présente, appartenant principalement aux *Proteobacteria* (Aagaard *et al.*, 2014). A la naissance, le microbiote intestinal se développe au contact du microbiote vaginal de la mère lors d'un accouchement par voie basse, ou avec l'environnement en cas de césarienne. Lors de la croissance, le microbiote évolue avec l'introduction de nourriture solide. On observe notamment une diminution de la fréquence du genre *Bifidobacteria* (Palmer *et al.*, 2007). Ainsi le microbiote évolue pendant la croissance de l'hôte avec une diminution progressive de bactéries aérobies en parallèle d'une augmentation de bactéries anaérobies et se stabilise à l'âge adulte (figure 17) (Hopkins, Sharp and Macfarlane, 2002; Kundu *et al.*, 2017).



**Figure 17: Evolution du microbiote de la naissance à l'âge adulte**

La composition du microbiote évolue avec la croissance de l'hôte. *In utero*, le fœtus est en contact avec le placenta et le liquide amniotique qui contiennent une faible densité bactérienne. Le mode de naissance influence le microbiote du nourrisson de même que la manière de le nourrir (allaitement ou lait maternisé). L'introduction de nourriture solide entraîne ensuite une diminution de Bifidobacterium et une augmentation de la richesse bactérienne du microbiote. A la puberté, les hormones sexuelles entraînent le développement d'une population microbienne dépendante du genre. Ainsi, le microbiote évolue, la densité en bactéries aérobies diminue tout au long de la croissance de l'hôte en parallèle à une augmentation de la densité d'anaérobies. Le microbiote se stabilise enfin à l'âge adulte.

D'après Kundu *et al*, 2017.

Le microbiote intestinal est de plus en plus étudié car il joue un rôle important dans la physiologie et la physiopathologie humaine. Le microbiote intestinal a un rôle dans la fermentation des résidus alimentaires non digestibles et contribue également à l'absorption des vitamines et des acides gras. De plus, il est important dans le développement et la maturation du système immunitaire et il participe à l'effet barrière contre les pathogènes (Blottière and Doré, 2016). Le microbiote agit également sur l'épithélium intestinal. Chez l'enfant, le tractus intestinal est immature autant sur le plan structurel que fonctionnel. Il apparaît que la maturation de l'intestin coïncide avec le développement du microbiote intestinal (Sommer and Bäckhed, 2013).

En 2006, l'équipe de Gordon a démontré que le microbiote des individus obèses était altéré notamment en termes de diversité bactérienne (Ley *et al.*, 2006). Chez les sujets obèses, il est observé une diminution des *Bacteroidetes* et notamment des *Bacteroides* ainsi qu'une augmentation des *Firmicutes*, dont les *Bacillaceae* et les *Clostridiaceae*, et des *Proteobacteria* (Hildebrandt *et al.*, 2009; Pascale *et al.*, 2018).

Dans les années 1950, le transfert de microbiote a commencé à être utilisé comme traitement. Eiseman *et al.* ont réussi à traiter 4 patients atteints d'infection au *Clostridium difficile* (Borody and Khoruts, 2012). Depuis, de nombreuses études sont réalisées sur les effets du transfert de microbiote fécal. Aussi, il a été montré qu'une transplantation de microbiote obèse chez la souris saine entraîne la mise en place d'un phénotype obèse (Turnbaugh *et al.*, 2006). De plus, Bäckhed *et al.* ont montré que des souris axéniques ayant reçu un microbiote de souris conventionnelles obèses présentaient une augmentation de leur masse grasse de 60% en 14 jours accompagnée du développement d'une insulino-résistance (Bäckhed *et al.*, 2004).

### **C) Conséquences des maladies métaboliques sur la fonction endocrine**

Il a été démontré que les sujets atteints de maladies métaboliques présentaient une moindre concentration plasmatique en entérohormones, et une réduction de l'effet incrétine (Campbell and Drucker, 2013; Holst and Deacon, 2013). Il y aurait cependant une augmentation de la sécrétion de GIP chez les sujets diabétiques. De plus, une étude a montré l'effet obésogène du GIP. En effet, son invalidation chez la souris protège de la prise du poids due au régime riche en gras (Miyawaki *et al.*, 2002). Chez l'Homme, des polymorphismes du

récepteur au GIP sont également associés à des différences de poids (Vogel *et al.*, 2009; Nauck, 2016).

De plus, les maladies métaboliques altèrent la sécrétion et l'action physiologique du GLP-1 .

### 1) Dans l'obésité

En 1996, Ranganath et al ont montré que la sécrétion de GLP-1 était plus faible chez les sujets obèses comparée au sujets minces après un repas riche en glucides (Ranganath *et al.*, 1996). Il a été montré que les individus obèses ou en surpoids présentaient une réduction d'environ 20% du GLP-1 en réponse au glucose comparés à des sujets de poids normal (Hira, Pinyo and Hara, 2020). Cet effet s'accompagne d'une diminution de l'effet incrétine chez des patients obèses ayant une tolérance normale au glucose (Knop *et al.*, 2012).

Il est difficile de déterminer si la diminution de sécrétion de GLP-1 est une cause ou une conséquence de l'obésité mais il a été montré que la perte de poids induite par un régime alimentaire restaurait cette sécrétion chez des patients obèses non diabétiques (Verdich *et al.*, 2001). Cependant, la réponse des cellules  $\beta$  pancréatiques au GLP-1 n'est pas altéré par l'obésité (Aulinger *et al.*, 2015).

### 2) Dans le diabète de type 2

Le diabète de type 2, une comorbidité associée à l'obésité altère également la sécrétion de GLP-1. En effet, plusieurs équipes ont montré une diminution de la concentration de GLP-1 et de l'effet incrétine chez des sujets ayant un DT2 ou une intolérance au glucose (Nauck *et al.*, 1986; Vilsbøll *et al.*, 2001; Knop *et al.*, 2007; Gautier, Choukem and Girard, 2008; Færch *et al.*, 2015).

L'altération de l'effet incrétine pourrait s'expliquer par une diminution du nombre de récepteurs GLP-1R dans les cellules  $\beta$  pancréas. En effet, une étude a montré une diminution du nombre des récepteurs au GLP-1 sur les cellules  $\beta$  de pancréas prélevés chez des rats hyperglycémiques (Xu *et al.*, 2007). Le GLP-1 garde cependant sa capacité à stimuler la sécrétion d'insuline en réponse au glucose, contrairement au GIP (Willms *et al.*, 1996; Gautier, Choukem and Girard, 2008).

**La synthèse et la sécrétion de GLP-1, important pour l'homéostasie glucidique, sont altérées dans les maladies métaboliques mais le GLP-1 garde son effet incrétine. C'est pourquoi il est très étudié pour l'élaboration de traitement de l'obésité et le diabète de type 2**

## **D) Thérapeutiques**

Le traitement principal de l'obésité est une modification du mode de vie du patient afin d'induire une perte de poids. Il est recommandé d'adopter une alimentation saine et de pratiquer une activité physique régulière. Le traitement le plus utilisé contre le diabète de type 2 est la metformine qui diminue efficacement le HbA1c (Landgraf *et al.*, 2019). Les sulfamides hypoglycémiantes tels que le Glimepiride ou le Gliclazide ont également un rôle important dans le traitement du diabète de type 2 (Scheen, 2021). Ils présentent néanmoins des risques d'hypoglycémie et de prise de poids et doivent désormais faire face à la concurrence de nouveaux traitements tels que les traitements basés sur l'effet incrétine du GLP-1 comme les analogues du GLP-1 ou les inhibiteurs de DPP-4. En dernier recours, les patients atteints d'obésité peuvent subir une chirurgie bariatrique. Selon la Haute Autorité de Santé, la chirurgie bariatrique peut être envisagée chez des patients dont l'IMC est supérieur ou égal à 40 ou supérieur ou égal à 35 s'il est associé à au moins une comorbidité susceptible d'être améliorée après la chirurgie, telle que le diabète de type 2.

### **1) Traitements du DT2 basés sur l'effet incrétine du GLP-1**

Le GLP-1 a un temps de demi-vie très court car il est rapidement dégradé par la DPP-IV. De plus, chez les patients obèses, il a été observé une diminution de la sécrétion de GLP-1 et une altération de l'effet incrétine. Des analogues du GLP-1 moins sensibles à l'activité de la DPP-IV ont été développés.

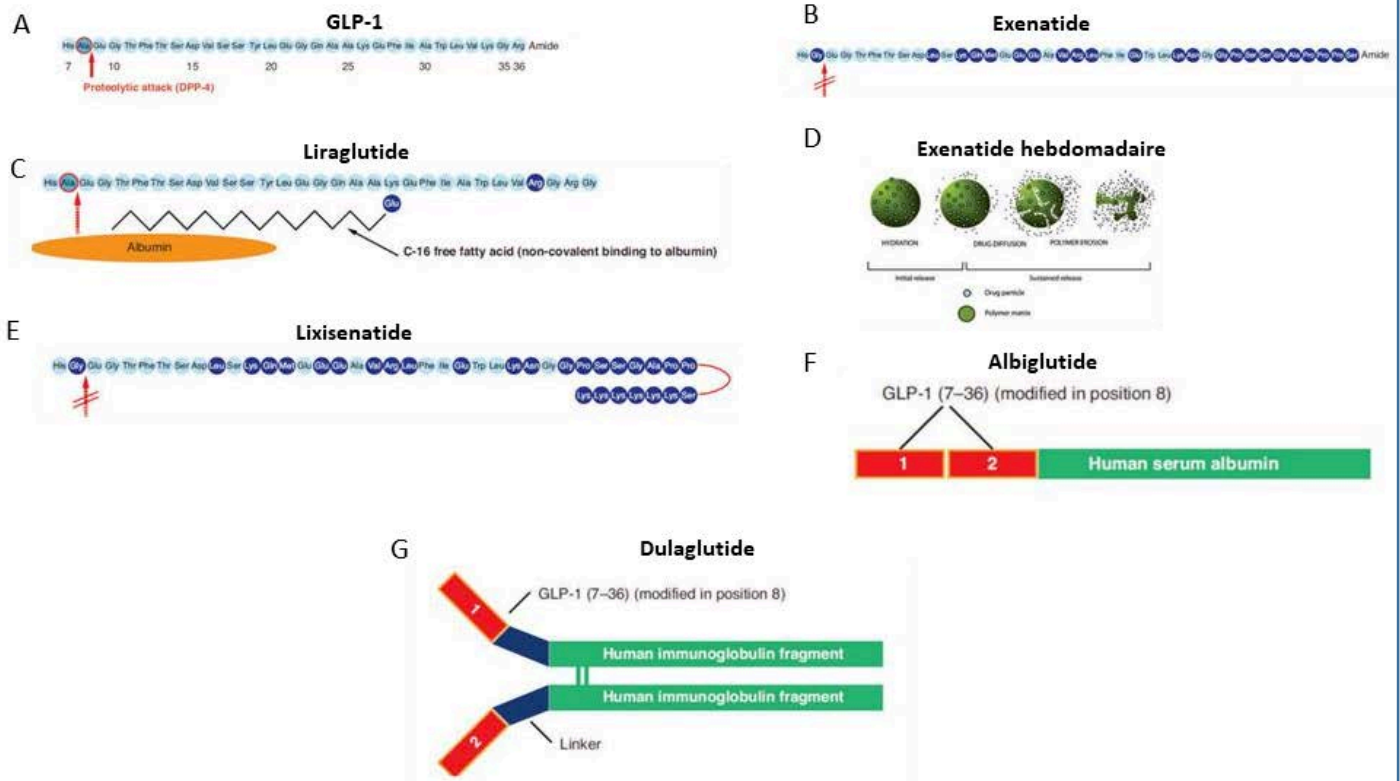
#### **a. Analogue du GLP-1**

Les agonistes du récepteur GLP-1R entraînent une diminution de la glycémie et de la pression sanguine ainsi qu'une perte de poids et une protection cardiaque et rénale (Landgraf *et al.*, 2019).

Des études ont montré que les agonistes du GLP-1 réduisent la mortalité des patients quelle qu'en soit la cause.

Le premier agoniste du récepteur GLP-1R, autorisé en 2006, a été l'**exenatide**. Il s'agit d'une version synthétique de l'exendine-4, un peptide naturel qui est identique au GLP-1 et dérivé à

partir de la salive du lézard *Heloderma suspectum* (Aroda, 2018). Il est semblable au GLP-1 à 53% avec des variations d'acides aminés lui conférant une résistance plus importante à la DPP-IV (Figure 18B). Alors que la demi-vie du GLP-1 n'est que de quelques minutes, celle de l'exenatide est de 2,4 heures (Bhavsar, Mudaliar and Cherrington, 2013; Aroda, 2018). Ce traitement peut stimuler l'activité sécrétrice des cellules  $\beta$  pancréatiques pendant 3 ans (van Raalte *et al.*, 2016). Il est habituellement prescrit pour 2 doses par jours afin de diminuer la glycémie après le petit-déjeuner et le dîner. L'étude AMIGO a été menée sur 1446 individus parmi lesquels 40% présentaient des anticorps anti-exenatide. Après 30 semaines, il est observé une diminution l'hémoglobine glyquée HbA1c d'environ 1%, de la glycémie à jeun d'environ 20 mg/dL et une perte de poids de 1 à 2 kg (Aroda, 2018). Le principal effet secondaire était des nausées atteignant entre 30 et 40% des participants à l'étude.



**Figure 18: Structure A) du GLP-1 et des analogues du GLP-1 : B) Exenatide, C) Liraglutide, D) Exenatide hebdomadaire, E) Lixisenatide, F) Albiglutide et G) Dulaglutide.**

Les analogues du GLP-1 sont utilisés dans le traitement de l'obésité et du diabète de type 2. Ils ont une structure proche du GLP-1 et demi-vie plus élevée. L'exenatide est similaire au GLP-1 à 53%, le remplacement d'une alanine en position 2 par une glycine lui confère une plus grande résistance à la DPP-IV. Le liraglutide présente un acide gras ajouté sur l'alanine en position 2 et le remplacement de l'arginine en position 24 par une albumine. L'exenatide hebdomadaire est encapsulée pour une diffusion lente. Le lixisenatide, en plus d'un remplacement d'une alanine en position 2 par une glycine, possède 6 lysines à l'extrémité C-terminale. L'albiglutide est une protéine recombinante constituée de 2 copies du GLP-1 humain fusionnées en série à l'albumine humaine. Le dulaglutide est un dimère du GLP-1 humain fusionné à une chaîne lourde d'immunoglobuline humaine.

D'après Nauck *et al*, 2016.



En 2011 (2012 aux Etats-Unis), un traitement a été développé. Il s'agit d'un traitement hebdomadaire d'**exenatide encapsulé** dans une matrice de polymères biodégradables qui se désintègre dans l'organisme et libère l'exenatide petit à petit (figure 18D). La capsule est constituée de microsphères de poly-(D,L-lactide-co-glycolide). Ce traitement étudié lors du programme DURATION permet une réduction de l'HbA1c de 1,3 à 1,9%, une perte de poids de 2 à 4 kg et une diminution de la glycémie à jeun d'environ 35 mg/dL. Ces résultats montrent des effets plus importants que 10 mcg d'exenatide injectée deux fois par jours. D'autant plus que seul 14% des participants au programme ont présenté des nausées comme effet secondaire (Aroda, 2018).

Le second analogue du GLP-1 approuvé en 2009 dans le traitement du DT2 est le **liraglutide**. Il partage 97% de la structure du GLP-1 avec l'ajout d'un acide gras et le remplacement de l'arginine (en position 24) par une albumine, résistant à l'action de la DPP-IV (figure 18C). Le liraglutide est le premier analogue du GLP-1 développé avec une action longue durée (Nauck, 2016). Le programme LEAD a montré que ce traitement conduit à une réduction de l'HbA1c de 0,9 à 1,4%, une perte de poids de 1 à 3kg et une diminution de la glycémie à jeun de 30 à 50mg/dL, il est donc plus efficace que l'exenatide. De plus la liraglutide entraîne une diminution de la pression sanguine et une augmentation de la fréquence cardiaque de 2 à 3 battements par minutes. Seuls 8% des participants ont développé des anticorps contre la liraglutide et 10 à 30% présentaient des nausées en réponse au traitement. De plus, la liraglutide limite la vidange gastrique (Steinert *et al.*, 2017). Le programme SCALE a également montré que le liraglutide pouvait entraîner une perte de poids jusqu'à 8kg (Aroda, 2018).

Le **lixisenatide**, autorisé en 2013 (2016 aux Etat-Unis), comme l'exenatide, est un dérivé de l'exendine-4 auquel a été ôté un résidu de proline et ajouté 6 lysines à l'extrémité C-terminale (figure 18E). Sa demi-vie est d'environ 3h. Il a été étudié par le programme GETGOAL et entraîne une réduction de l'HbA1c de 0,7 à 0,9%, une perte de poids de 1 à 3 kg et une diminution de la glycémie postprandiale de 81 à 143 mg/dL (Aroda, 2018).

En 2014, l'**albiglutide** a été autorisé comme traitement contre le DT2. Il s'agit d'une protéine recombinante constituée de 2 copies du GLP-1 humain fusionnées en série à l'albumine humaine (figure 18F). Sa demi-vie est de 5 jours et ses effets ont été étudié par le programme HARMONY qui a mis en évidence une réduction de l'HbA1c de 0,6 à 1%, une perte de poids supérieure à 1kg et une diminution de la glycémie à jeun d'environ 20 mg/dL (Aroda, 2018).

L'albiglutide a été retiré du marché mondial en juillet 2017. En effet, les essais ont montré un risque accru de maladie cardiovasculaire avec ce traitement (Hernandez *et al.*, 2018; Landgraf *et al.*, 2019).

Le **dulaglutide** a également été mis sur le marché en 2014. Il s'agit d'un dimère du GLP-1 humain fusionné à une chaîne lourde d'immunoglobuline humaine (figure 18G). La demi-vie de ce dimère est de 4,5 jours pour une dose de 0,75mg, recommandé dans le cadre d'une monothérapie. Elle est de 4,7 jours pour une dose de 1,5mg prescrite en complément d'un autre traitement. Le dulaglutide a été étudié par le programme AWARD et entraîne une réduction de l'HbA1c de 0,7 à 1,6%, une perte de poids de 1 à 3kg et une diminution de la glycémie à jeun de 30 à 40 mg/dL (Aroda, 2018).

En 2018, le **sémaglutide** a été mis sur le marché. Il a une homologie supérieure à 90% avec le GLP-1 humain. La molécule diffère du GLP-1 sur 3 points. En position 8, l'alanine a été substituée par l'acide alpha-aminoisobutyrique, une chaîne diacide C18 a été attachée au peptide en position 26 et la lysine en position 34 a été remplacée par de l'arginine. La demi-vie du sémaglutide est d'environ 7 jours. Le programme SUSTAIN étudiant les effets de ce traitement démontre une meilleure efficacité du sémaglutide comparé à l'inhibiteur de DPP-IV sitagliptine, l'exénatide ou le dulaglutide dans la perte de poids et la réduction des concentrations de l'hémoglobine glyquée (Goldenberg and Steen, 2019)

Ces traitements sont basés sur l'effet incrétine du GLP-1, une autre hormone potentialise la sécrétion d'insuline en réponse : le GIP. Aucun traitement basé sur l'effet incrétine de cette hormone n'est utilisé actuellement mais des études visent à montrer les effets bénéfiques que des analogues du GIP pourraient avoir sur le diabète de type 2 (Bailey, 2020; Holst and Rosenkilde, 2020).

De plus, l'inhibition de la sécrétion de glucagon médiée par la glycémie est altérée chez les patients diabétiques. Ses effets stimulant la dépense énergétique, hypolipidémiques et rassasiants en font une cible intéressante pour les thérapies contre l'obésité. Cependant le glucagon n'est pas utilisé comme médicament anti-obésité du fait de son effet hyperglycémiant aigu (Müller *et al.*, 2017; S. J. Brandt *et al.*, 2018). Le Glucagon et le GLP-1 proviennent tous-deux du proglucagon et présentent une forte similitude en acides aminés. En 2009, les groupes de recherche de Richard DiMarchi et Matthias Tschöp ont conçu un

double agoniste GLP-1R/GCGR en modifiant la séquence du glucagon (Day *et al.*, 2009; Müller *et al.*, 2017). Chez la souris obèse, ce co-agoniste conduit à une diminution de la masse corporelle. Plusieurs sociétés pharmaceutiques tentent désormais de développer des doubles agonistes GLP-1R/GCGR pour traiter le diabète et l'obésité chez l'Homme (Sara J. Brandt *et al.*, 2018).

**Les analogues du GLP-1 reproduisent l'effet du GLP-1 endogène. Ce sont des traitements contraignants, administrés par injection sous-cutanée (Nauck, 2016). Un autre traitement consiste à inhiber la DPP-IV qui empêche l'action du GLP-1.**

#### b. Inhibiteur de DPP-4

Contrairement aux analogues du GLP-1 qui sont administrés par injections sous-cutanée, les inhibiteurs de DPP-IV sont administrés par voie orale et agissent dès les 5 premières minutes. Les inhibiteurs de DPP-4 sont des gliptines utilisés comme traitement contre le DT2. Il existe 5 gliptines couramment utilisés : la sitagliptine, la vildagliptine, la saxagliptine, la linagliptine et l'alogliptine.

Le premier inhibiteur de DPP-IV utilisé a été la sitagliptine. Il s'agit d'un composé hétérocyclique non-peptidique qui a une action rapide et de longue durée. La vildagliptine et la saxagliptine en revanche, sont des cyano-pyrrolidines à action lente et prolongée après leur liaison à la DPP-IV. La linagliptine et l'alogliptine sont également utilisés dans le traitement du DT2 (Nauck, 2016).

La sitagliptine, l'alogliptine et la linagliptine forment une interaction non covalente avec la DPP-IV pour l'inactiver. En revanche, la vildagliptine et la saxagliptine agissent via la formation d'une liaison covalente enzyme-inhibiteur (Deacon, 2011).

Les inhibiteurs de la DPP-IV diminuent l'activité de la DPP-IV présente dans le sérum de plus de 80% et ainsi, doublent la concentration de GLP-1 actif (Ahrén and Schmitz, 2004). Ceci est associé à une augmentation de la sécrétion d'insuline, une inhibition de la sécrétion du glucagon et une réduction de la glycémie postprandiale (Herman *et al.*, 2006).

A l'exception de la linagliptine, ces inhibiteurs sont éliminés via les reins et doivent être adaptés à la fonction rénale des patients (Landgraf *et al.*, 2019). La linagliptine est excrétée en majorité dans les fèces (Guedes *et al.*, 2013). La vildagliptine et la saxagliptine étant en partie métabolisées par le foie, il est recommandé de réduire les doses de ces traitements chez des

patients ayant des problèmes hépatiques (Deacon, 2011). Les inhibiteurs de DPP-4 sont tout de même déconseillés chez les patients ayant des antécédents ou des risques de pancréatite car ils augmentent le risque de développer une pancréatite aigüe.

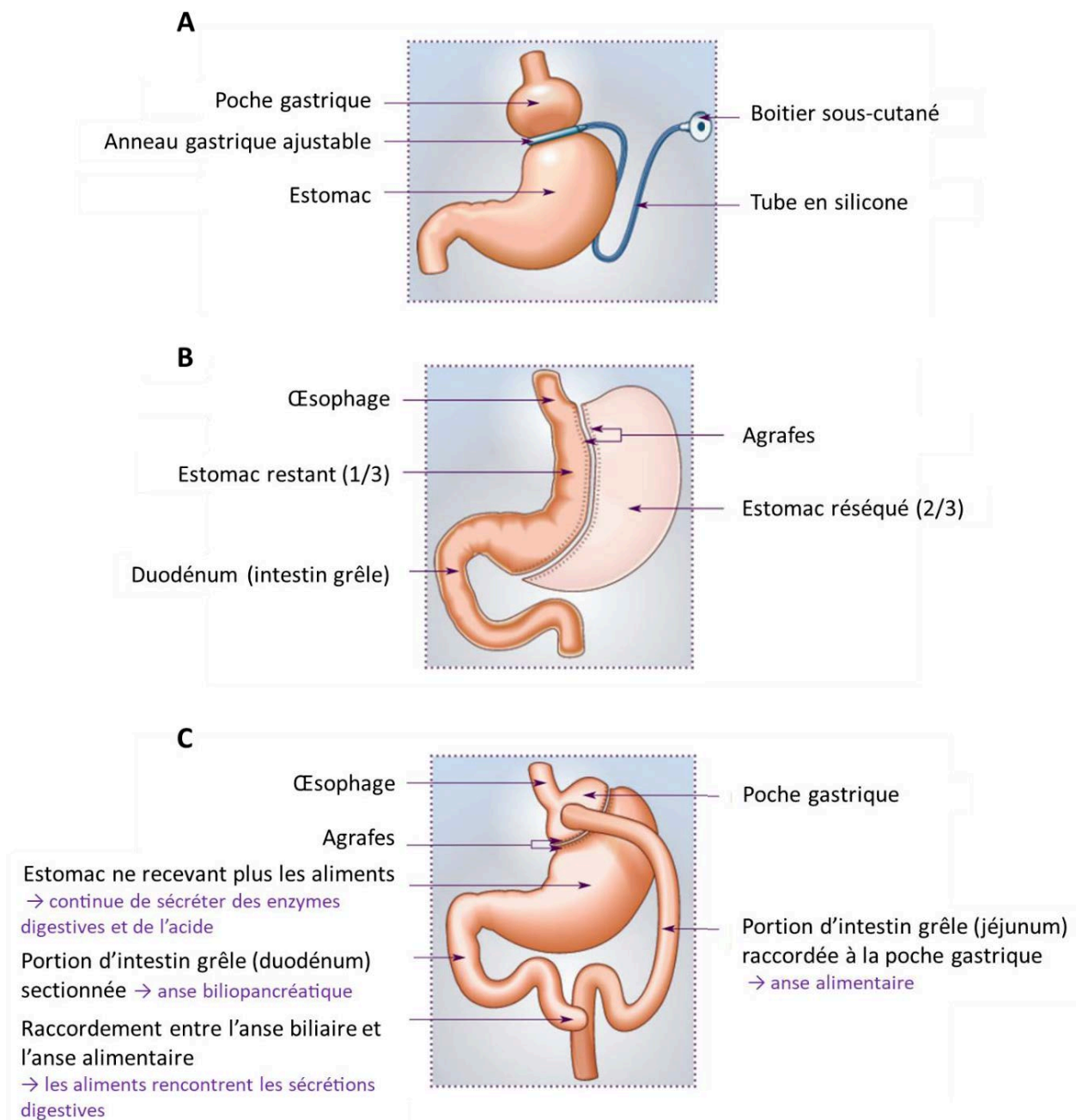
Tous les inhibiteurs de la DPP-IV conduisent à une augmentation du GLP-1 de 1,5 à 3 fois, revenant à une concentration proche des conditions physiologiques (Deacon, 2011).

**Les analogues du GLP-1 et les inhibiteurs de la DPP-IV permettent d'améliorer les effets du GLP-1 et notamment l'effet incrétine. Il est également possible d'augmenter les concentrations plasmatiques de GLP-1 et de traiter le diabète de type 2 et l'obésité en effectuant une chirurgie bariatrique.**

## 2) Chirurgie bariatrique

La chirurgie bariatrique est utilisée pour réduire le poids des sujets obèses et induire la rémission du DT2. Selon la Haute Autorité de Santé (HAS), la chirurgie bariatrique peut être pratiquée sur des individus ayant un IMC supérieur à 40 kg/m<sup>2</sup> ou supérieur à 35 kg/m<sup>2</sup> associé à au moins une comorbidité susceptible d'être améliorée après la chirurgie telle que l'hypertension ou le diabète de type 2. La chirurgie n'est pratiquée qu'en seconde intention, en cas d'échec de la prise en charge médicale et nutritionnelle.

Il existe différentes techniques de chirurgie bariatrique, restrictives pures ou restrictives et malabsorptives.



**Figure 19: A) Anneau gastrique ajustable, B) Sleeve gastrectomie et C) Bypass gastrique.**

L'anneau gastrique ajustable est positionné autour de l'estomac pour former une poche gastrique qui nécessite moins d'aliments pour être remplie et la sensation de satiété apparaît rapidement. La sleeve gastrectomie consiste à retirer les 2/3 de l'estomac qui forme alors un tube vertical rapidement traversé par les aliments pour accéder à l'intestin. Le bypass gastrique permet de diminuer d'une part la quantité d'aliments ingérés via une réduction de la taille de l'estomac, et d'autre part l'absorption des aliments grâce à un court-circuit d'une partie de l'estomac et du jéjunum.

*D'après l'HAS 2009*

**L'anneau gastrique** ajustable est une technique restrictive qui diminue le volume de l'estomac et ralentit le passage des aliments sans altérer leur digestion. Le principe est basé sur le placement d'un anneau, dont le diamètre est modifiable, autour de l'estomac (figure 19A). Cet anneau forme donc une poche gastrique qui se remplit rapidement et accélère l'apparition du sentiment de satiété (Brami *et al.*, 2009).

La seconde chirurgie restrictive pratiquée est **la sleeve gastrectomie** ou gastrectomie longitudinale. Il s'agit de la chirurgie bariatrique la plus pratiquée au monde (Angrisani *et al.*, 2017). Cette technique consiste à retirer environ les 2 tiers de l'estomac et notamment la partie contenant les cellules endocrines sécrétant la ghréline, hormone qui stimule l'appétit (figure 19B). L'estomac forme alors un tube vertical et les aliments passent rapidement à l'intestin. La digestion des aliments n'est pas altérée mais l'appétit est réduit (Brami *et al.*, 2009).

Ces deux techniques sont dites restrictives car elles visent à réduire la quantité d'aliments consommés.

Le **bypass gastrique selon la technique de Roux-en-Y (RYGB)** est la seconde chirurgie bariatrique la plus pratiquée au monde (Angrisani *et al.*, 2017). C'est une technique restrictive et malabsorptive car en plus de diminuer la quantité d'aliments ingérés, elle altère l'assimilation de ceux-ci par l'organisme. En effet, la taille de l'estomac est diminuée pour ne conserver qu'une poche de 30mL. Le duodénum ainsi que le jéjunum proximal sont court-circuités par un raccord du jéjunum distal directement à la poche gastrique de 30mL, créant une anse alimentaire (figure 19C). Aucun organe n'est prélevé, le jéjunum proximal restant libre est abouché à l'iléon, à 1 mètre de l'appendice, créant une anse exclue du circuit alimentaire : l'anse bilio-pancréatique (Brami *et al.*, 2009).

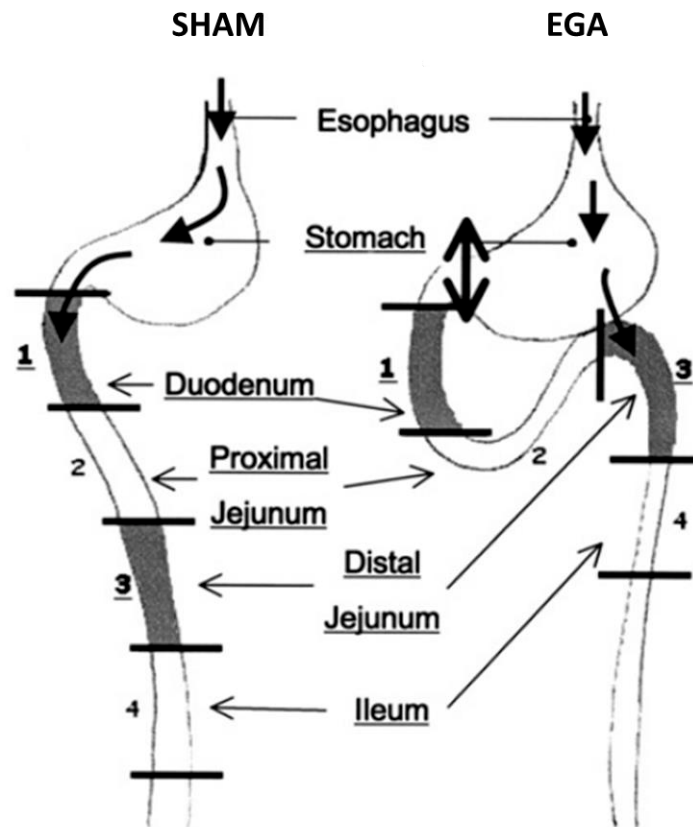
L'étude Swedish Obesity Study (SOS) a comparé l'effet de la chirurgie bariatrique (anneau gastrique, sleeve gastrectomie ou bypass gastrique) aux règles hygiéno-diététiques. Les résultats ont montré que le régime seul entraînait une reprise de poids après 2 ou 10 ans alors que la chirurgie permet une diminution du poids sur le long terme avec une perte de poids de 23% après 2 ans et 16% après 10 ans (Sjöström *et al.*, 2004). De plus les comorbidités associées à l'obésité étaient améliorées de façon significative par la chirurgie bariatrique sur les 10 ans de suivi. D'autres études montrent que dès la première semaine post-chirurgie, la glycémie

commence à se normaliser. Après 8 semaines, les concentrations plasmatiques maximum d'insuline reviennent à la normale (Taylor, 2013). De plus, les concentrations d'entérohormones et notamment d'incrétines sont augmentées après chirurgie.

Après bypass gastrique, les concentrations de GLP-1 atteignent des niveaux supérieurs à la normale, certainement parce que les nutriments atteignent plus rapidement les parties distales de l'intestin, où les cellules entéroendocrines sécrétrices de GLP-1 sont plus nombreuses (Larraufie *et al.*, 2019).

Les individus obèses étudiés dans le cadre de ma thèse ont subi une opération de type bypass gastrique en Roux-en-Y.

Chez la souris, la **chirurgie d'entéro-gastro-anastomose (EGA)** développé dans notre équipe est une façon d'obtenir un phénotype d'amélioration métabolique comparable à la rémission du diabète après RYGB chez l'Homme (Troy *et al.*, 2008). Il s'agit d'un modèle de remodelage intestinal dans lequel le pylore est ligaturé et le jéjunum distal est raccordé à l'estomac en excluant le duodénum et le jéjunum proximal du circuit du bol alimentaire (figure 20). Cette chirurgie, réalisée chez des souris rendues obèses via un régime gras, conduit à une perte de poids, une augmentation de la sensibilité à l'insuline et une amélioration de la tolérance au glucose (Troy *et al.*, 2008). Excepté la diminution de masse corporelle, ces effets sont également observés après chirurgie d'EGA chez des souris *ob/ob* déficientes pour la leptine et génétiquement obèses (Amouyal *et al.*, 2020).



**Figure 20: Chirurgie d'entéro-gastro-anastomose**

Une ligature ferme l'estomac au niveau du pylore et le jéjunum distal est raccordé à l'estomac en excluant le duodénum et le jéjunum proximal du circuit du bol alimentaire.

*D'après Troy et al, 2008*



# Objectifs

## Objectifs

Nous ingérons des glucides tous les jours dans notre alimentation, sous formes de mono-, di- oligo- ou polysaccharides (sucres, amidons, et fibres). Le système digestif humain est équipé en transporteurs de sucres nécessaires à l'absorption intestinale de ces nutriments et en détecteurs de sucres qui participent à leur absorption et aux réponses hormonales qui affectent à leur tour le métabolisme énergétique, le transit gastrointestinal et le comportement alimentaire.

Dans l'intestin, les sucres sont détectés au pôle apical des cellules par deux systèmes, les transporteurs SGLT-1 et GLUTs et le récepteur du goût sucré. Les sucres sont absorbés par les entérocytes via SGLT-1, GLUT5 et GLUT2. Par ailleurs, GLUT2 classiquement localisé à la membrane basolatérale des entérocytes, est susceptible d'être transloqué à la membrane apicale lorsque la concentration en glucose intraluminaire est supérieure à 5 mmol/L (Kellett and Brot-Laroche, 2005). Les sucres, sous forme de monomères, rejoignent ensuite la circulation sanguine via le transporteur GLUT2. Dans les cellules entéroendocrines, les sucres sont également transportés par les transporteurs SGLT-1 et GLUT5. Le métabolisme du glucose dans la cellule entéroendocrine, par la production d'ATP et la fermeture / ouverture de canaux ioniques, entraîne l'exocytose des granules de sécrétion contenant le GLP-1. Les glucides mais aussi les édulcorants sont détectés au pôle apical de la cellule entéroendocrine par le récepteur du goût sucré formé par l'hétérodimère T1R2/T1R3. Ces récepteurs sont couplés à une protéine G, la gustducine, composée de trois sous-unités  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$  codées respectivement par les gènes *GNAT3*, *GNB3* et *GNG13* (Ren *et al.*, 2009). L'activation du récepteur du goût sucré stimule la phospholipase C- $\beta$ 2 et provoque une élévation de la concentration de calcium au sein de la cellule entéroendocrine, signal qui est à l'origine de l'exocytose des vésicules de sécrétion contenant les entérohormones comme le GLP-1. Le GLP-1, en rejoignant la circulation sanguine, agit au niveau pancréatique en potentialisant la sécrétion d'insuline en réponse aux glucides (effet incrétine), contribuant ainsi à la régulation de la glycémie.

Dans les maladies métaboliques telles que l'obésité et le diabète de type 2 (DT2), les concentrations plasmatiques en entérohormones et l'effet incrétine sont amoindris. Notre

équipe s'intéresse au remodelage des cellules endocrines de l'intestin dans les pathologies métaboliques et en particulier à la dérégulation de la sécrétion du GLP-1. **Mon hypothèse est que la diminution de sécrétion de GLP-1 dans les maladies métaboliques est en partie due à un défaut intestinal de la transduction du goût sucré.**

**Le premier objectif de ma thèse a été d'étudier l'expression des gènes de la voie de transduction du goût sucré, et en particulier *GNAT3*, le gène codant pour l' $\alpha$ -gustducine, lors de la mise en place des maladies métaboliques et de la rémission du diabète.** En effet, l'inactivation de *GNAT3* chez la souris entraîne une diminution de l'effet incrétine (Jang *et al.*, 2007). Pour observer la mise en place de l'obésité, de l'intolérance au glucose et de l'insulinorésistance, j'ai utilisé un modèle murin soumis à un régime riche en gras ou un régime riche en gras et en fructose afin d'obtenir des phénotypes métaboliques de sévérité graduelle. J'ai développé une méthode permettant d'obtenir des populations cellulaires enrichies en cellules entéroendocrines à partir d'intestin de souris. L'expression de *GNAT3* a donc pu être étudiée dans les cellules entéroendocrines à différents stades du développement des maladies métaboliques.

Il a été montré que la chirurgie bariatrique, en plus de la perte de poids, est souvent à l'origine de la rémission du diabète (Debédats *et al.*, 2018). C'est pourquoi j'ai étudié l'expression de *GNAT3* dans différents segments d'intestin lors de l'amélioration métabolique induite par un remodelage intestinal après entéro-gastro-anastomose, chirurgie développée dans notre équipe par le Pr Fabrizio Andreoli (Troy *et al.*, 2008).

**Le deuxième objectif de ma thèse a été d'évaluer l'impact du microbiote intestinal sur l'expression de *GNAT3* dans le jéjunum.** Nous savons que la fermentation des prébiotiques et glucides par le microbiote produit des acides gras à chaîne courte qui stimulent la sécrétion de GLP-1 (Pais, Gribble and Reimann, 2016). Cependant, le microbiote intestinal est altéré par les maladies métaboliques notamment la diversité bactérienne (Ley *et al.*, 2006; Pascale *et al.*, 2018). Pour étudier l'impact du microbiote intestinal sur l'expression de *GNAT3*, j'ai réalisé un transfert de microbiote fécal à partir de souris obèses et hyperglycémiques vers de jeunes souris au sevrage chez lesquelles le microbiote n'est pas encore totalement développé.

**Le troisième objectif de ma thèse a été d'analyser l'expression des gènes de la voie de transduction du goût sucré dans les cellules entéroendocrines humaines dans un contexte**

**d'obésité avec ou sans diabète de type 2.** En effet, avant mon arrivée dans le laboratoire, une analyse transcriptomique par RNA-sequencing a été réalisée sur des populations enrichies en cellules entéroendocrines issues de fragments de jéjunum humains collectés durant des bypass gastriques de patients obèses ou obèses diabétiques. Au cours de ma thèse, j'ai analysé les résultats de ce RNA-sequencing pour : 1/ étudier l'expression des gènes impliqués dans la voie de transduction du goût sucré, et notamment *GNAT3*, dans les cellules entéroendocrines des patients obèses ou obèses diabétiques ; 2/ mettre en évidence la signature transcriptomique spécifique des cellules entéroendocrines dans les maladies métaboliques ainsi que des gènes différentiellement exprimés de ces deux groupes de patients.

# Résultats

## Résultats 1 : Etude de l'expression des gènes de la voie de transduction du goût sucré lors de la mise en place des maladies métaboliques et de la rémission du diabète.

Le Glucagon Like-Peptide-1 (GLP-1) est une hormone sécrétée par les cellules entéroendocrines qui amplifie la sécrétion d'insuline en réponse au glucose (effet incrétine). Les mécanismes conduisant à la sécrétion de GLP-1 en réponse à une détection de glucose impliquent des transporteurs (SGLT-1 et GLUT) et le récepteur du goût sucré T1R2/T1R3. Plusieurs arguments démontrent que T1R2/T1R3 et la sous-unité  $\alpha$  de la protéine G associée à ces récepteurs sont nécessaires à la sécrétion de GLP-1 dans l'intestin grêle. Ce récepteur est présent à la membrane apicale des cellules entéroendocrines. De plus, les agonistes du récepteur T1R2/T1R3 tels que le sucrose, le glucose, le fructose ou le sucralose, permettent la sécrétion de GLP-1 dans l'intestin de souris et dans des lignées de cellules entéroendocrines murines (GLUTag) et humaines (NCI-H716). L'inactivation de *Gnat3*, *TAS1R2* ou *TAS1R3* chez la souris inhibe la sécrétion de GLP-1 en réponse au glucose. L'inhibition de ces gènes dans des lignées de cellules entéroendocrines réduit également la sécrétion de GLP-1 en réponse au sucralose. Enfin, le lactisol, inhibiteur du récepteur du goût sucré, réduit les concentrations systémiques de GLP-1 après administration intragastrique ou intraduodénale de glucose chez l'Homme (Jang *et al.*, 2007; Margolskee *et al.*, 2007; Geraedts, Troost and Saris, 2011; Gerspach *et al.*, 2011; R. E. Steinert *et al.*, 2011).

Aussi, il a été démontré que les sujets atteints de maladies métaboliques présentaient une moindre concentration plasmatique en entérohormones, notamment GLP-1, et une réduction de l'effet incrétine (Campbell and Drucker, 2013; Holst and Deacon, 2013) sans que les mécanismes de cette dérégulation soient bien connus.

**J'ai fait l'hypothèse que la voie de transduction du goût sucré pouvait être une des voies clés par laquelle la sécrétion d'entérohormones est diminuée chez les patients atteints d'obésité et/ou de diabète de type 2. Dans ce contexte, le travail réalisé dans le cadre de ma thèse vise à étudier l'expression des gènes de la voie de transduction du goût sucré lors de la mise en place des maladies métaboliques et de la rémission de diabète dans un modèle murin. J'ai étudié l'expression de *Gnat3* codant pour la sous-unité  $\alpha$  de la gustducine ; *Plcb2* codant pour la phospholipase C-beta-2 ; *Itpr3* codant pour le récepteur à l'inositol**

trisphosphate ; *Scn2a* et *Trpm5* codant pour des canaux sodiques et *Cacna1a* codant pour un canal calcique.

***Ces résultats sont présentés à la fin du chapitre « résultats » de mon manuscrit, sous la forme d'un l'article dans lequel je suis première auteure (Le Gléau et al., soumis à American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism).***

## **A/ Etude de l'expression des gènes de la voie de transduction du goût sucré dans les cellules entéroendocrines murines lors de la mise en place des maladies métaboliques.**

### **1) Mise au point d'une méthode de tri cellulaire pour obtenir une population enrichie en cellules entéroendocrines murines.**

Mon étude étant focalisée sur l'expression de gène de la transduction du goût sucré dans les cellules entéroendocrines, j'ai développé une méthode permettant de trier ces cellules, qui sont rares et dispersées, à partir des cellules épithéliales isolées du jéjunum de souris.

Pour cela 3 marqueurs antigéniques membranaires sont utilisés en plus de l'iodure de propidium (IP), utilisé comme marqueur de viabilité. Après avoir sélectionné les cellules vivantes, négatives au marquage par l'iodure de propidium (IP), nous utilisons le CD45 pour marquer les cellules immunitaires. Le second marqueur CD326, spécifique des cellules épithéliales est également utilisé car il est difficile de séparer la muqueuse de la musculuse chez la souris. Enfin, le troisième marqueur CD24 est ensuite utilisé pour marquer les cellules entéroendocrines comme nous l'avons préalablement décrit (Osinski *et al.*, 2021). Nous avons ainsi collecté 3 populations cellulaires, toutes les trois sélectionnées pour leur viabilité 1/ la population CD45+ correspondant aux cellules immunitaires, 2/ la population CD45-/326+/24- (nommée CD24-) correspondant aux entérocytes et aux cellules mucosécrétrices et 3/ la population CD45-/326+/24+ (nommée CD24+) correspondant aux cellules entéroendocrines ainsi qu'aux cellules de Paneth et aux cellules souches.

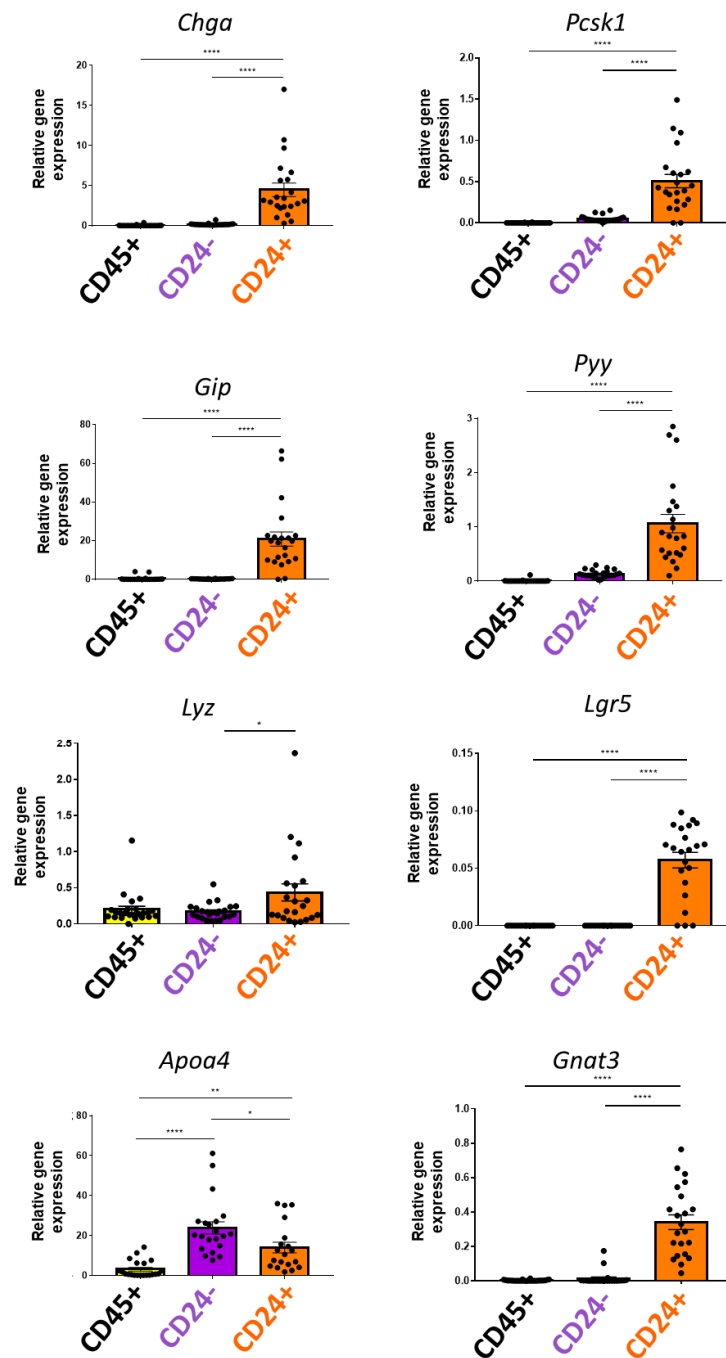
L'analyse de l'expression génique de marqueurs spécifiques des différents types de cellules épithéliales a permis de valider le tri cellulaire. En effet, nous observons que les marqueurs chromogranin-A (*Chga*), Prohormone convertase 1 (*PCsk1*), Glucose-dependent insulintropic polypeptide (*Gip*) et Peptide YY (*Pyy*), spécifiques des cellules entéroendocrines, le lysozyme (*Lyz*) caractéristique des cellules de Paneth et le leucine-riche repeat-containing G-protein coupled receptor 5 (*Lgr5*) des cellules souches sont exprimés principalement dans

la population CD24+. Aussi, comme attendu, l'expression de l'apolipoprotéines-A4 (*Apoa4*), spécifique des entérocytes, est sur-exprimé dans la population CD24-. Cependant, son expression dans la population CD24+ montre une contamination ou une expression non documentée à ce jour par les autres types cellulaires (figure 21).

**Ces résultats montrent que la population CD24+ contient principalement des cellules entéroendocrines avec des cellules de Paneth et des cellules souches.**

**De plus, l'étude de l'expression de *Gnat3* dans ces différentes populations montre que ce gène n'est exprimé que dans la population CD24+ (figure 21), il est donc spécifique des cellules entéroendocrines.**





**Figure 21: Expression de marqueurs spécifiques des différentes cellules épithéliales intestinales dans des cellules murines triées.**

La chromogranin-A (*Chga*), la Prohormone convertase 1 (*Pcsk1*), le Glucose-dépendant insulino-tropique polypeptide (*Gip*) et le peptide YY (*Pyy*) sont spécifiques des cellules entéroendocrines, le lysozyme (*Lyz*) est exprimé dans les cellules de Paneth, le récepteur couplé à la protéine G riche en leucine (*Lgr5*) est caractéristique des cellules souches. L'apolipoprotéine A-IV (*Apoa4*) est connue pour être exprimée spécifiquement dans les entérocytes. *Gnat3* est un gène impliqué dans la transduction du goût sucré dans les cellules entéroendocrines. n = 24 par groupe ; \* : p < 0.05 ; \*\* : p < 0.01 ; \*\*\* : p < 0.001 et \*\*\*\* : p < 0.0001.

## 2) Mise en place des maladies métaboliques

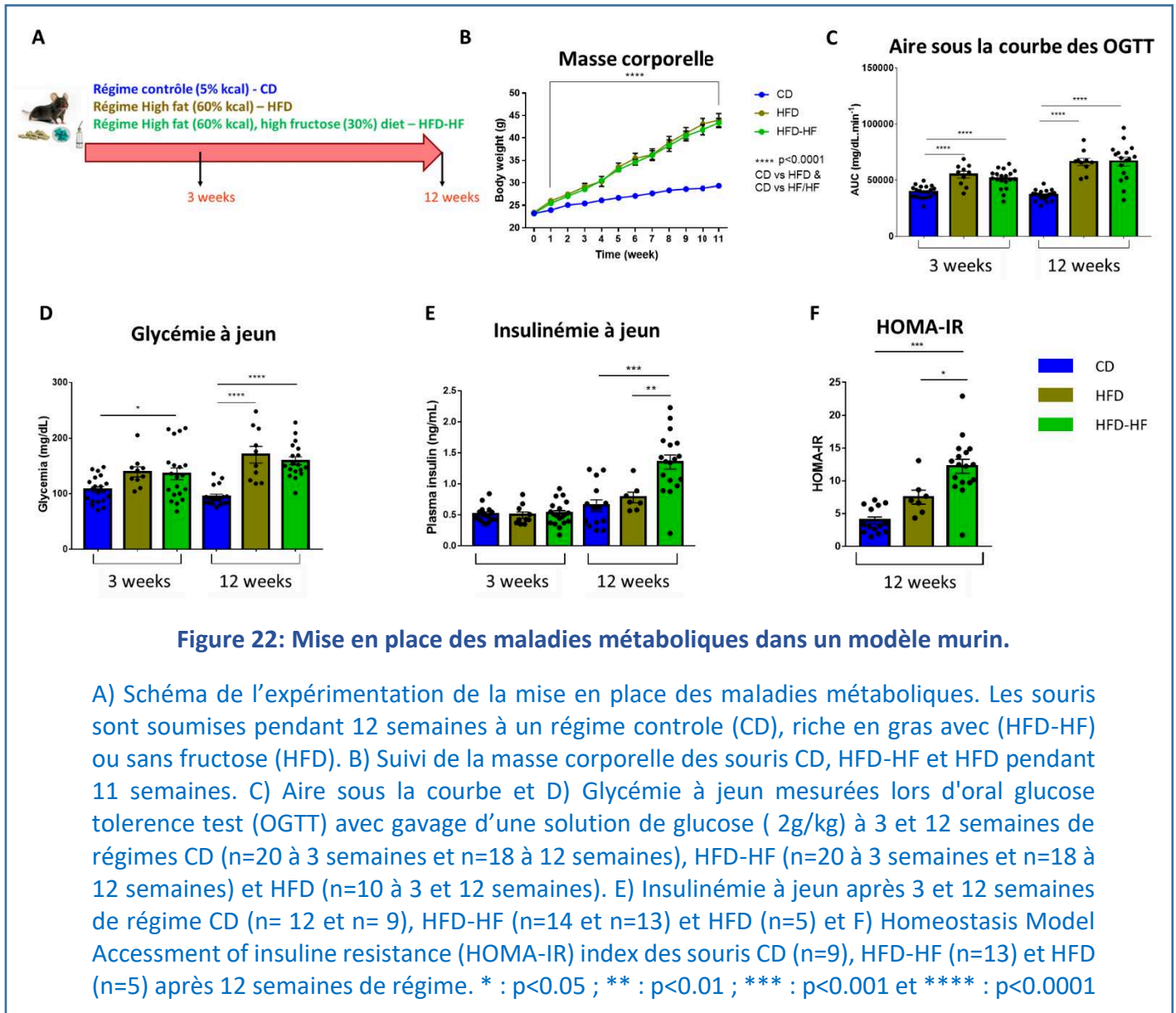
Des souris C57Bl6 ont été réparties en 3 groupes selon le régime alimentaire auquel elles ont été soumises : régime contrôlé (5%Kcal : CD), régime riche en gras (high fat diet 60%Kcal : HFD) ou régime riche en gras et en sucre (high fat 60%Kcal / high fructose 30% : HFD-HF). L'objectif de ces régimes était d'obtenir des degrés de sévérité graduelle de perturbations métaboliques (figure 22A).

Comme attendu, les régimes HFD et HFD-HF conduisent à une augmentation de la prise de poids (figure 22B) et notamment de la masse grasse qui est 2 fois supérieure après 3 semaines de régime et 4 fois supérieur après 12 semaines de régime HFD et HFD-HF comparés au CD. Après gavage avec une solution de glucose, la tolérance au glucose, représentée par l'aire sous la courbe de l'oral glucose tolérance test (OGTT) est altérée. En effet, l'aire sous la courbe est augmentée respectivement de 1,3 et 1,4 fois dès 3 semaines de régimes HFD et HFD-HF (figure 22C).

De plus, comme le montre la figure 2D, la glycémie à jeun des souris HFD-HF est supérieure à celle des souris CD après 3 semaines de régime. Les souris HFD-HF deviennent hyperglycémiques dès 3 semaines, et les souris HFD après 12 semaines de régime.

Par ailleurs, l'insulinémie à jeun des souris HFD-HF est 2 fois supérieure à celle des souris contrôles (figure 22E) et leur HOMA-IR, index de la résistance à l'insuline, est 3 fois supérieure à celui des souris CD (figure 22F).

**Ces modèles murins nous permettent d'obtenir des degrés de sévérité graduelle de perturbations métaboliques. A la fois, les souris HFD et HFD-HF sont obèses, hyperglycémiques et intolérantes au glucose mais seules les souris HFD-HF sont hyperinsulinémiques et insulino-résistantes.**



**Figure 22: Mise en place des maladies métaboliques dans un modèle murin.**

A) Schéma de l'expérimentation de la mise en place des maladies métaboliques. Les souris sont soumises pendant 12 semaines à un régime contrôle (CD), riche en gras avec (HFD-HF) ou sans fructose (HFD). B) Suivi de la masse corporelle des souris CD, HFD-HF et HFD pendant 11 semaines. C) Aire sous la courbe et D) Glycémie à jeun mesurées lors d'oral glucose tolerance test (OGTT) avec gavage d'une solution de glucose ( 2g/kg) à 3 et 12 semaines de régimes CD (n=20 à 3 semaines et n=18 à 12 semaines), HFD-HF (n=20 à 3 semaines et n=18 à 12 semaines) et HFD (n=10 à 3 et 12 semaines). E) Insulinémie à jeun après 3 et 12 semaines de régime CD (n= 12 et n= 9), HFD-HF (n=14 et n=13) et HFD (n=5) et F) Homeostasis Model Assessment of insuline resistance (HOMA-IR) index des souris CD (n=9), HFD-HF (n=13) et HFD (n=5) après 12 semaines de régime. \* : p<0.05 ; \*\* : p<0.01 ; \*\*\* : p<0.001 et \*\*\*\* : p<0.0001

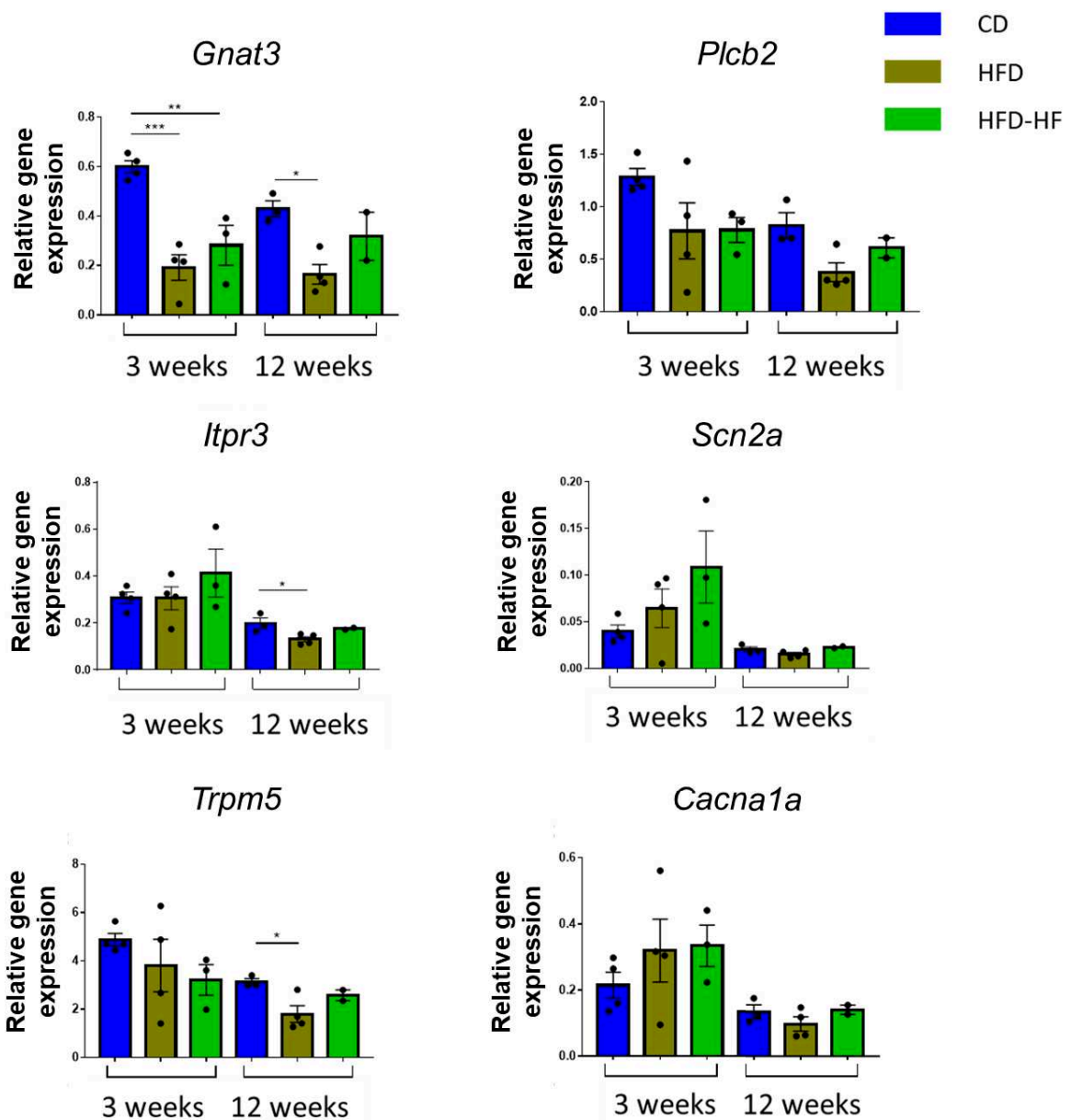
### 3) Etude de l'expression des gènes de la transduction du goût sucré dans les cellules entéroendocrines murines.

Les gènes de la transduction du goût sucré ont été étudiés dans les cellules entéroendocrines murines obtenues par tri cellulaires à partir de jéjunum de souris après 3 et 12 semaines de régimes CD, HFD, et HFD-HF,

Après le tri cellulaire, la quantité d'ARN extrait des cellules est trop faible pour réaliser une RT-qPCR. L'expression des différents gènes cibles a donc été analysée par la technique de quantigene plex. Il s'agit d'une technique qui permet la détection et la quantification de l'ARN sans RT-qPCR, en utilisant des billes fluorescentes comme support pour la capture d'ARN. Nous avons étudié l'expression du récepteur du goût sucré T1R2/T1R3, de *Gnat3* codant pour la sous-unité  $\alpha$  de la gustducine, de *Plcb2* codant pour la phospholipase C $\beta$ 2, d'*Itpr3* codant pour le récepteur à l'inositol triphosphate, de *Cacna1a* codant pour un récepteur calcique et de *Scn2a* et *Trpm5* codant pour des récepteurs sodiques.

L'expression des gènes TAS1R2 et TAS1R3 ne dépassant pas le seuil de détection, nous ne pouvons conclure pour ce récepteur de goût sucré. En revanche, nous montrons que l'expression des gènes ITPR3 et TRPM5 est diminuée respectivement de 1,5 fois et 1,7 fois dans les cellules entéroendocrines après 12 semaines de régime HFD. Les régimes HFD et HFD-HF conduisent à une expression de *Gnat3* réduite de 2 et 3 fois respectivement après 3 semaines de régimes, et 2,6 fois après 12 semaines de régime HFD (figure 23).

**Ces résultats montrent que la voie de transduction du goût sucré des cellules entéroendocrines murines est altérée dans l'obésité.**



**Figure 23: Expression des gènes de la transduction du goût sucré dans des cellules entéroendocrines murines triées après 3 et 12 semaines de régimes.**

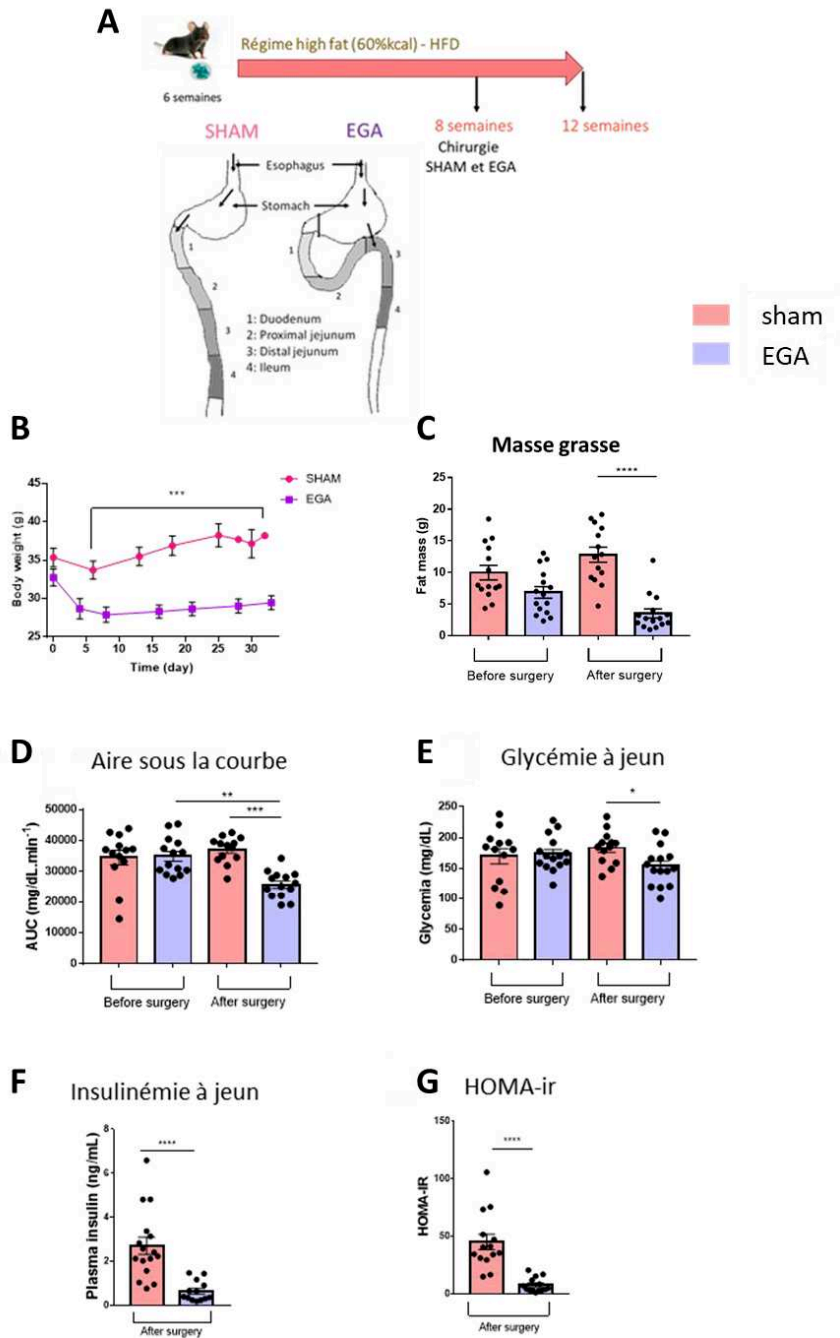
*Gnat3*, *Plcb2*, *Itpr3*, *Scn2a*, *Trpm5* et *Cacna1a* codent respectivement pour la sous-unité  $\alpha$  de la gustducine, la phospholipase C $\beta$ 2, le récepteur à l'inositol triphosphate, des canaux sodiques et un canal calcique. L'expression de ces gènes a été étudié après 3 et 12 semaines de régimes CD (n=3 à 3 et 12 semaines) ; HFD-HF (n=3 à 3 semaines et n=2 à 12 semaines) et HFD (n=3 à 3 et 12 semaines). \* : p<0.05 ; \*\* : p<0.01 ; \*\*\* : p<0.001 et \*\*\*\* : p<0.0001.

## **B/ Etude de l'expression des gènes de la voie de transduction du goût sucré dans les cellules entéroendocrines murines lors de la rémission du diabète.**

### **1) Amélioration métabolique après remodelage intestinal**

Chez l'Homme, la chirurgie bariatrique est utilisée chez les patients atteints d'obésité massive pour réduire le poids corporel et obtenir une rémission du diabète de type 2. Après bypass gastrique, les concentrations plasmatiques en entérohormones, en notamment en GLP-1, sont rétablies (Jirapinyo *et al.*, 2018). Chez la souris, la chirurgie d'entéro-gastro-anastomose (EGA), mise au point dans notre équipe, reproduit ces effets (Troy *et al.*, 2008). Cette technique consiste à ligaturer le pylore et raccorder le jéjunum distal à l'estomac des souris en excluant le duodénum et le jéjunum proximal du circuit emprunté par le bol alimentaire (Figure 24A).

Des souris rendues obèses, intolérantes au glucose et hyperglycémiques par 8 semaines de régimes HFD ont été opérées selon la technique EGA, et comparées à des souris ayant eu une laparotomie (sham), toutes maintenues sous régime HFD pendant 1 mois après la chirurgie (figure 24A). Comme attendu, l'EGA entraîne une perte de masse corporelle (figure 24B) et notamment de masse grasse (résultats non montrés). En effet, un mois après la chirurgie, la masse grasse des souris EGA est 4 fois moins élevée que celle des sham (figure 24C). Parallèlement, la tolérance au glucose est améliorée 1 mois après la chirurgie d'EGA (figure 24D). La glycémie à jeun des EGA est diminuée et est 1,2 fois moins élevée que celle des sham après la chirurgie (figure 24E). Après chirurgie d'EGA les souris diminuent également leur insulïnémie à jeun (figure 24F) et HOMA-ir (figure 24G). De plus, l'insuline et le peptide C et le GLP-1 actif plasmatique ont été dosés lors de l'OGTT, avant et 15, 30 et 60 minutes après le gavage au glucose. Les résultats présentés dans le tableau 4 montrent que l'EGA diminue les concentrations basales et stimulées de peptide-C et insuline. Chez les souris sham, Les concentrations en GLP-1 évaluées au cours de l'OGTT des souris sham ne sont pas détectables. En revanche, l'EGA, rétablit la concentration plasmatique en GLP-1 actif. On observe également une augmentation de la concentration en GLP-1 en réponse au glucose et notamment un pic de GLP-1 plasmatique 30 minutes après le gavage au glucose. **L'EGA améliore donc l'homéostasie glucidique des souris obèses ainsi que leur poids.**



**Figure 24: Modèle murin d'amélioration métabolique**

A) Schéma de l'expérimentation pour la rémission des maladies métaboliques. Après 8 semaines de régime HFD, les souris ont subi un remodelage intestinal par entéro-gastro-anastomose. Le jéjunum distal des souris est raccordé à l'estomac en excluant le duodénum et le jéjunum proximal. B) Suivi de la masse corporelle des souris sham et EGA pendant 1 mois après chirurgie. C) Aire sous la courbe et D) Glycémie à jeun mesurées lors d'oral glucose tolerance test (OGTT) avec gavage d'une solution de glucose (2g/kg) avant et après chirurgie (n= 13 SHAM et n= 14 EGA). E) Insulinémie à jeun après et F) Homeostasis Model Assessment of insuline resistance (HOMA-IR) index des souris SHAM (n=14) et EGA (n=14) après chirurgie. H) Etude de l'expression de *Gnat3* dans le duodénum et le jéjunum proximal des SHAM (n=16) et EGA (n=13). \* : p<0.05 ; \*\* : p<0.01 ; \*\*\* : p<0.001 et \*\*\*\* : p<0.0001

**Tableau 4: Concentration plasmatique en peptide C, insuline et GLP-1 mesurée lors d'un**

		plasma level (pg/mL)			
		T0	T15	T30	T60
C-peptide	sham	1 763 ± 203	3 382 ± 436 *	2 282 ± 276	1 459 ± 151
	EGA	669 ± 74	1 969 ± 285 *	721 ± 90	565 ± 94
Insulin	sham	2 709 ± 393	6 748 ± 852 *	3 578 ± 385	2 813 ± 524
	EGA	639 ± 128	3 197 ± 587 *	813 ± 119	533 ± 117
GLP-1	sham	ND	ND	ND	ND
	EGA	70 ± 9	92 ± 10	117 ± 17*	91 ± 17

OGTT, avant et 15, 30 et 60 après le gavage de 2g/kg de glucose chez des souris sham et ayant subi une chirurgie d'entéro-gastro-anastomose (EGA). \* : p< 0.05

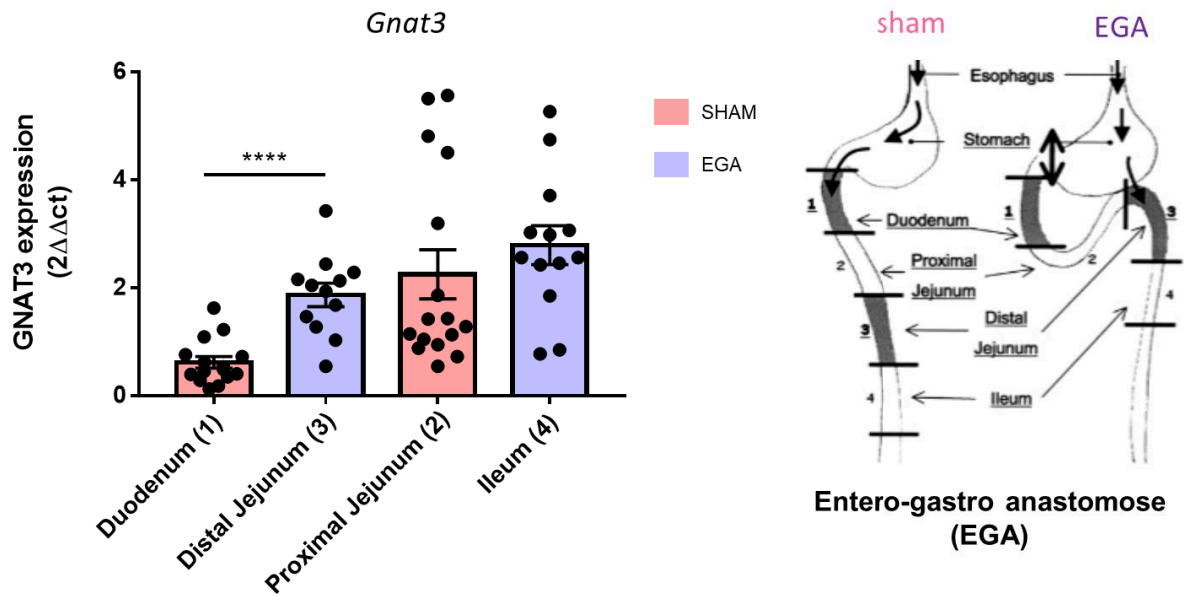
## 2) Etude de l'Expression de *Gnat3* dans l'intestin de souris après amélioration métabolique.

La chirurgie d'EGA forme une anse qui exclue le duodénum et le jéjunum proximal. Le bol alimentaire contenu par l'estomac est alors déversé directement dans le jéjunum distal qui devient, chez les souris opérées, le premier segment en contact avec les nutriments. Pour cette étude nous avons donc comparé les segments d'intestins qui sont les premiers à recevoir le bol alimentaire, c'est à dire : le duodénum et le jéjunum proximal des souris sham et le jéjunum distal et l'iléon des souris EGA.

Pour cette étude nous nous sommes intéressés à l'expression de *Gnat3* qui est fortement sous-exprimé chez les souris obèses et hyperglycémiques. Après amélioration métabolique, nous montrons que l'expression de *Gnat3* est 3 fois plus élevée dans le jéjunum distal des souris EGA comparé au duodénum des sham (figure 25).

**Ces résultats montrent que la perte d'obésité et la rémission du diabète de type 2 après remodelage intestinal chez la souris conduit à la restauration de la sécrétion de GLP-1 et une sur-expression de *Gnat3* dans l'anse alimentaire.**





**Figure 25: Expression de *Gnat3* dans l'intestin des souris sham et EGA après chirurgie.**

Les fragments d'intestins sont numérotés 1, 2, 3, 4 selon l'axe proximo-distal : duodénum, jéjunum proximal, jéjunum distal et iléon. Chez les souris EGA, le jéjunum distal est raccorder à l'estomac et devient donc le segment le plus proximal, comparable au duodénum des sham. L'expression de *Gnat3* a été étudié dans le duodénum et le jéjunum proximal des sham (n=16) et le jéjunum distal et l'iléon des souris EGA (n=13). \*\*\*\* : p<0.0001.

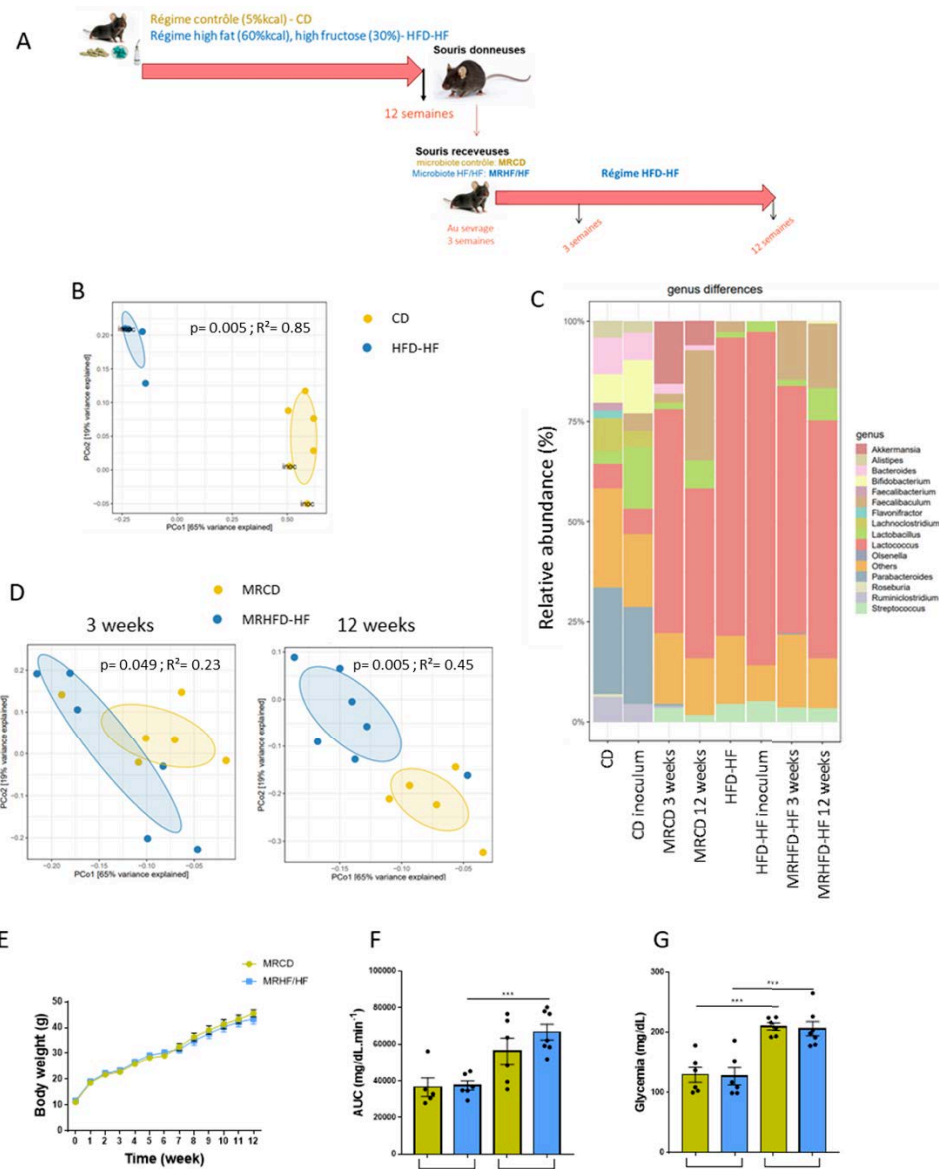
## Résultats 2 : Etude de l'impact du microbiote intestinal sur l'expression de *Gnat3* dans le jéjunum de souris.

Depuis plusieurs années, le microbiote intestinal est de plus en plus étudié. La mise au point de techniques de séquençage haut débit du matériel génétique a permis de montrer que le microbiote intestinal contient entre  $10^{12}$  et  $10^{14}$  bactéries dont les principaux phyla sont : *Bactéroïdetes*, *Firmicutes*, *Actinobacteria* et *Proteobacteria*. Nous savons désormais que le microbiote intestinal est altéré dans les maladies métaboliques, notamment la diversité bactérienne avec une diminution des *Bactéroïdetes* et des *Firmicutes* (Arumugam *et al.*, 2011; Dave *et al.*, 2012). Le microbiote intestinal a un rôle dans la fermentation des résidus alimentaires non digestibles et contribue également à l'absorption des vitamines et des acides gras. De plus, il est important dans le développement et la maturation du système immunitaire et il participe à l'effet barrière contre les pathogènes (Blottière and Doré, 2016).

**J'ai fait l'hypothèse que le microbiote intestinal, altéré dans les maladies métaboliques était responsable de la diminution de l'expression de *Gnat3*, *Itpr3* et *Trpm5* observé dans un contexte d'obésité. Dans le cadre de ma thèse je m'intéresse à l'impact du microbiote sur l'expression des gènes de la voie de transduction du goût sucré, en particulier *Gnat3*. Pour cela, j'ai réalisé un transfert de microbiote de souris obèses vers de jeunes souris au sevrage. Ces résultats sont présentés à la fin du chapitre « résultat » de ce manuscrit, sous la forme d'un l'article dans lequel je suis première auteure (Le Gléau *et al.*)**

### **A/ Vérification de l'altération du microbiote intestinal par un régime gras.**

Après 12 semaines de régime HFD-HF, les souris présentent une obésité, une intolérance au glucose, une hyper-insulinémie accompagnée d'une résistance à l'insuline (*cf. Résultats 1*). Les fèces de ces souris ainsi que des fèces de souris nourries avec un régime CD ont été collectées afin de réaliser un transfert de microbiote vers de jeunes souris au sevrage, elles-mêmes soumises à un régime HFD-HF pendant 12 semaines après le transfert de microbiote. Le transfert de microbiote a été réalisé par gavage d'une solution nommée inoculum, préparée avec un pool de fèces de souris donneuses (figure 26A).



**Figure 26: Transfert de microbiote dysbiotique chez la souris.**

A) Schéma de l'expérimentation de transfert de microbiote fécal. Des fèces de souris nourries 12 semaines de régime CD ou HFD-HF sont collectées afin de préparer un inoculum permettant de réaliser des gavages vers des souris âgées de 3 semaines, au sevrage. Ces souris receveuses sont soumises à un régime HFD-HF pendant 12 semaines après le transfert de microbiote. B) Analyse en composantes principales du microbiote des souris donneuses (CD : n=4 ; HFD-HF : n=2) et des inoculum (CD : n=2 ; HFD-HF : n=2). C) Abondance des genres de bactéries dans le microbiote des souris CD, l'inoculum CD, les receveuses MRCD et les donneuses HFD-HF, inoculum HFD-HF et les receveuses MRHFD-HF. D) Analyse en composantes principales du microbiote des souris receveuses 3 (MRCD : n=6 ; MRHFD-HF : n=6) et 12 semaines après le transfert de microbiote (MRCD : n=5 ; MRHFD-HF : n=7). E) Masse corporelle des souris mesurée chaque semaine pendant 12 semaines après le transfert de microbiote fécal. F) Tolérance au glucose représentée par l'aire sous la courbe de l'OGTT (mg/dL/min). G) Glycémie à jeun des souris lors de l'OGTT (mg/dL). Les OGTT ont été réalisés avec 2g/kg de glucose sur 6 souris MRCD et 6 MRHFD-HF 3 et 12 semaines après le transfert de microbiote. \* :  $p < 0.05$  ; \*\* :  $p < 0.01$  ; \*\*\* :  $p < 0.001$  and \*\*\*\* :  $p < 0.0001$

L'ADN bactérien des fèces des souris donneuses et receveuses ainsi que des inoculums a été extrait puis séquencé via la technique de séquençage de l'ADN par nanopore minION, (Oxford Nanopore Technologies). L'ADN bactérien est déposé sur une membrane contenant des nanopores (trous de diamètre de l'ordre du nanomètre). Une différence de potentiel est appliquée de part et d'autre de la membrane, générant un courant électrique qui est spécifique de la base du nucléotide au passage de l'ADN et peut être traduit en séquence nucléotidique.

Dans un premier temps, nous nous intéressons à l'effet du régime alimentaire sur le microbiote fécal des souris donneuses. Comme attendu, l'analyse en coordonnées principales des données issues de ce séquençage montre que le régime alimentaire modifie le microbiote intestinal (figure 26B).

De plus, les genres de bactéries présents dans les fèces ou les inoculums de souris CD sont plus diversifiés que dans les fèces ou inoculums de souris HFD-HF. En effet, le microbiote intestinal de souris HFD-HF est principalement composé de bactéries du genre *Lactococcus* (environ 75%) alors que ce genre ne représente qu'une faible proportion dans le microbiote de souris CD qui contient davantage de bactéries du genre *Bacteroides* ou *Parabacteroides* (figure 26C).

## **B/ Impact du transfert de microbiote des souris donneuses sur le microbiote des souris receveuses**

Les inoculums préparés à partir de fèces des souris donneuses minces CD et obèses, intolérantes au glucose et insulino-résistantes HFD-HF ont permis de réaliser un transfert de microbiote chez de jeunes souris receveuses au sevrage soumises à un régime HFD-HF pendant 12 semaines après le transfert de microbiote. Les fèces de ces souris ont été collectées 3 et 12 semaines après le transfert pour séquencer l'ADN des bactéries qu'elles contiennent. L'analyse en composantes principales des genres de bactéries contenus dans ces fèces présente peu de différences de composition entre les souris ayant reçu le microbiote CD (MRCD) et celles ayant reçu le microbiote HFD-HF (MRHFD-HF) 3 semaines après le transfert. La différence semble s'accroître 12 semaines après le transfert (figure 26D).

De plus, l'étude de l'abondance des différents genres de bactéries dans les fèces de souris montre que la mise sous régime HFD-HF a conduit à une augmentation de la proportion des

*Lactococcus* chez les MRCD comparés aux souris CD. Cependant la composition du microbiote des souris MRCD est différente de celui des souris MRHFD-HF, nous observons notamment la présence de bactéries du genre *Akkermansia*, connu pour son rôle de protection contre l'obésité (Cani and de Vos, 2017). Le transfert du microbiote de souris minces semble favoriser le développement de ces bactéries.

Nous nous sommes également intéressés aux effets du transfert de microbiote fécal sur le métabolisme des souris receveuses. Nous avons ainsi montré que le transfert de microbiote n'avait pas d'effet sur la masse corporelle car les souris MRCD et MRHFD-HF suivent la même évolution de prise de poids après le transfert de microbiote (figure 26E). En revanche, nous remarquons que la tolérance au glucose s'aggrave de manière plus sévère chez les souris MRHFD-HF que chez les souris MRCD 12 semaines après le transfert de microbiote (figure 26F) alors que leur glycémie à jeun augmente de la même façon (figure 26G).

Nos résultats montrent donc que le régime HFD-HF altère le microbiote intestinal des souris, notamment la diversité bactérienne et cette altération est préservée après transfert de microbiote. **Ces résultats suggèrent que le microbiote fécal transféré s'est bien implanté chez les souris receveuses.**

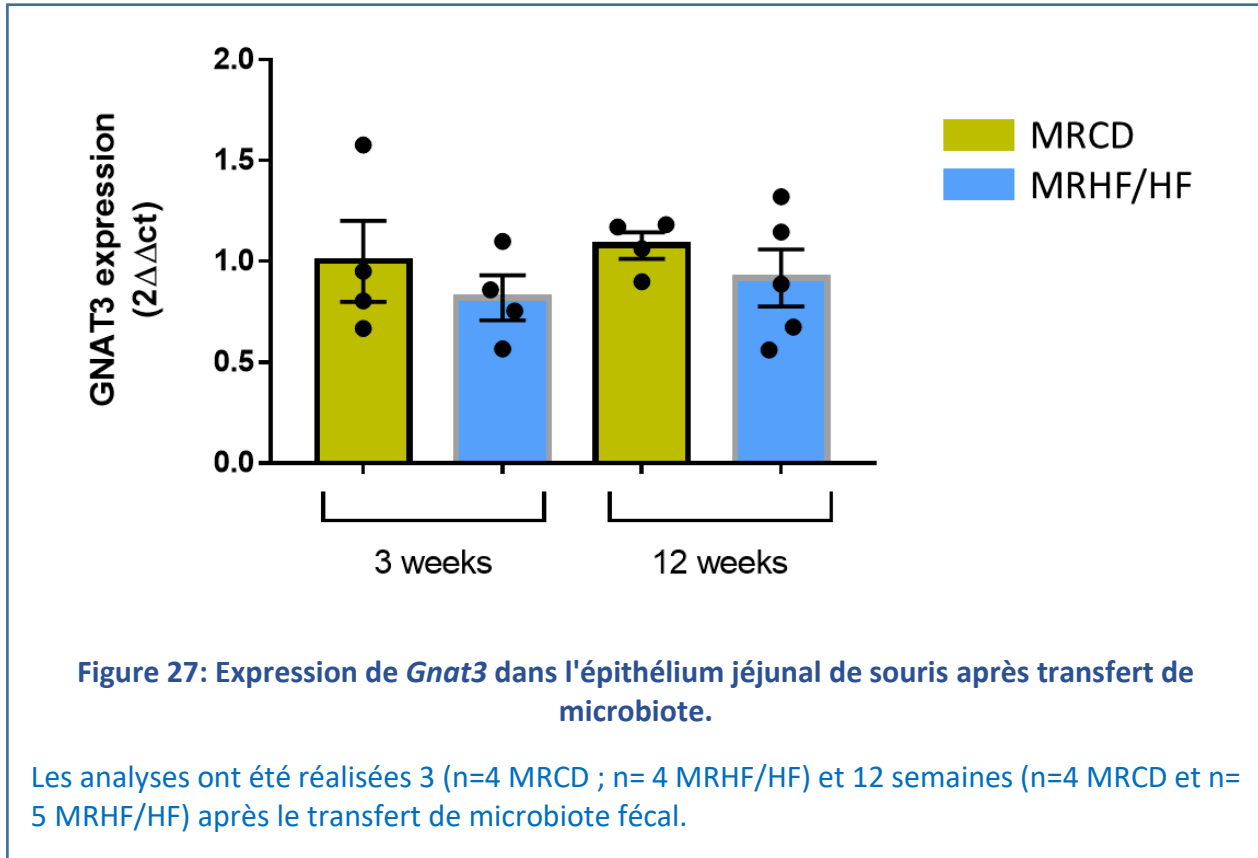
### **C/ Le microbiote intestinal a-t-il un rôle dans l'expression de *Gnat3*?**

La voie de transduction du goût sucré dans l'intestin est altérée lors de l'obésité et notamment présente une expression réduite de *Gnat3* qui pourrait conduire à la diminution de sécrétion de GLP-1 par la cellule entéroendocrine. Le régime HFD-HF induit chez la souris une obésité, une intolérance au glucose, une hyperglycémie, une insulino-résistance et une dysbiose du microbiote intestinal. Nous avons émis l'hypothèse que la sous-expression de *Gnat3* pourrait être dû à la dysbiose du microbiote intestinal dans l'obésité.

L'expression de *Gnat3* a été étudiée par RT-qPCR dans l'épithélium jéjunal de souris 3 et 12 semaines après le transfert de microbiote fécal (figure 27).

Aucune différence d'expression de *Gnat3* n'est observée dans l'épithélium jéjunal des souris MRHFD-HF comparé aux souris MRCD, démontrant que le microbiote n'a pas d'impact significatif sur l'expression intestinal de *Gnat3*.

La diminution de l'expression de *Gnat3* dans l'obésité ne semble donc pas être causée par l'altération du microbiote intestinal mais plutôt par un effet direct du régime.



### Résultats 3 : Analyse de l'expression des gènes de la voie de transduction du goût sucré dans les cellules entéroendocrines humaines dans un contexte d'obésité avec ou sans diabète de type 2.

L'épithélium intestinal a une capacité d'adaptation rapide grâce au renouvellement de ses cellules tous les 3 à 5 jours chez l'Homme (Darwich *et al.*, 2014). Les cellules entéroendocrines sont obtenues à partir des cellules souches via l'activation de nombreux facteurs de transcription tels que *NGN3*, *FOXA1/FOXA2*, *NEUROD1*, *PAX4* et *PAX6*. Une récente étude a identifié de nouveaux régulateurs pour le lignage des cellules entéroendocrines et mis en évidence la complexité du réseau de facteurs de transcription ainsi que la temporalité à laquelle ils sont exprimés (Gehart *et al.*, 2019).

Les cellules entéroendocrines sécrètent de nombreuses entérohormones telles que PYY, GLP-1, CCK et GIP qui contrôlent la prise alimentaire et l'homéostasie énergétique chez les individus sains. Leur influence sur le développement des maladies métaboliques est encore incertaine mais il est connu que les sujets obèses présentent un déséquilibre dans leurs concentrations plasmatiques en entérohormones (Holst and Deacon, 2013). De plus, comme nous l'avons montré précédemment chez la souris obèse (*cf. Résultats 1*), nous observons une altération de l'expression des gènes de la transduction du goût sucré, et notamment de *Gnat3*, dans les cellules entéroendocrines. Ces résultats étant obtenus chez la souris nous pouvons nous questionner sur leur pertinence chez l'humain.

La première analyse transcriptomique des cellules entéroendocrines humaines a été publiée récemment (Roberts *et al.*, 2019) mais les données dans le jéjunum de sujets souffrant d'obésité et de diabète de type 2 n'ont pas été rapportées.

**Dans le cadre de ma thèse, j'ai eu accès à des fragments jéjunaux prélevés lors de chirurgies bariatriques de patients obèses (Ob) et obèses diabétiques (ObD), ce qui m'a permis : 1/ d'analyser le profil transcriptomique des cellules entéroendocrines humaines. Ces résultats sont présentés à la fin du chapitre « résultats » de ce manuscrit, sous la forme d'un article dans lequel je suis deuxième auteure, (Osinski *et al.*, *International Journal of Obesity*, 2021) ; 2/ d'étudier l'expression des gènes de la transduction du goût sucré dans les cellules entéroendocrines. Ces résultats sont présentés à la fin de ce chapitre sous la forme d'un**

*l'article dans lequel je suis première auteure (Le Gléau et al., soumis à American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism).*

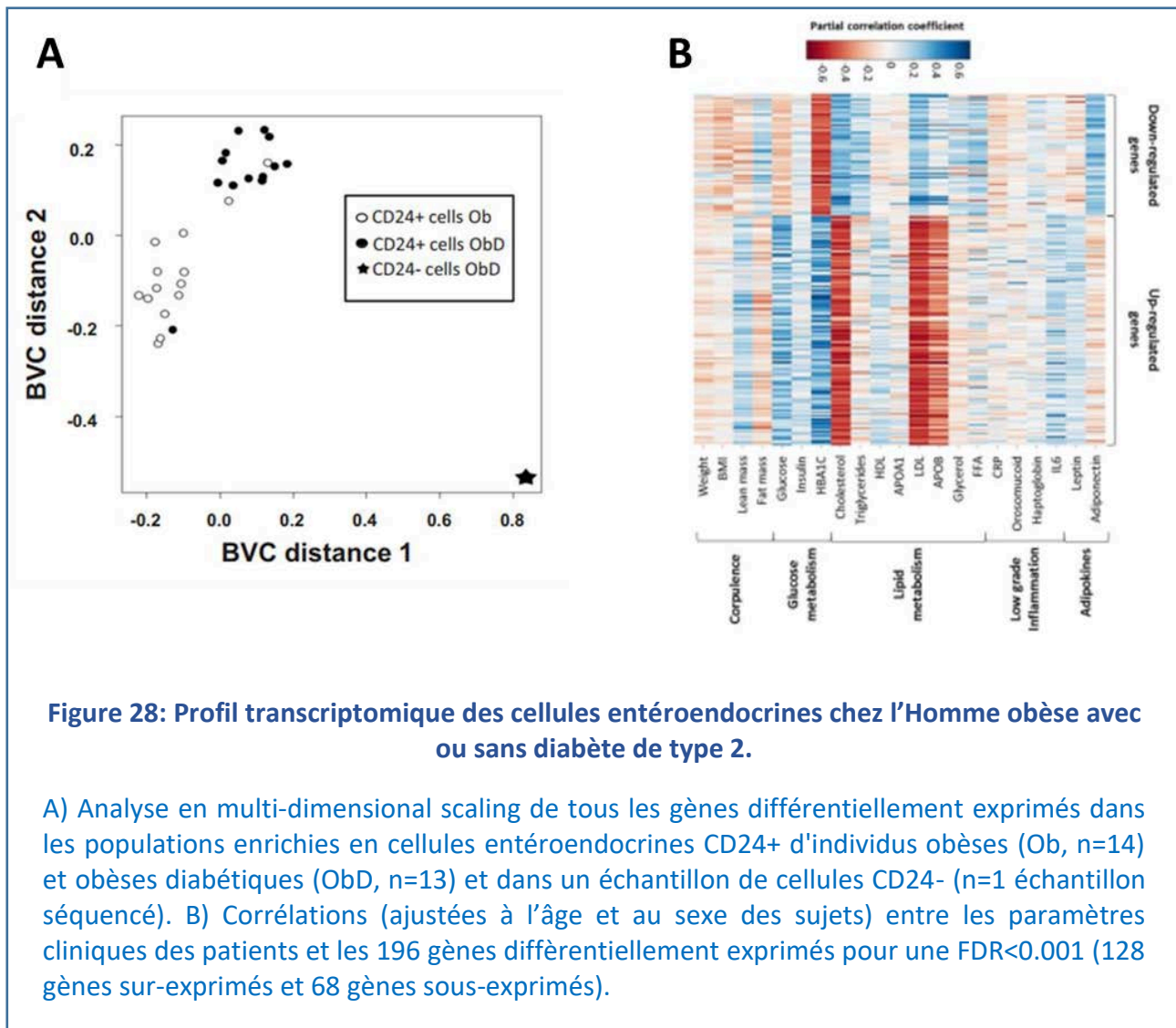
## **A/ Analyse du profil transcriptomique des cellules entéroendocrines humaines dans les maladies métaboliques**

A partir des fragments jéjunaux prélevés lors de chirurgies bariatriques, nous avons étudié l'impact de l'obésité et du DT2 sur le profil transcriptomique des cellules entéroendocrines humaines par RNA sequencing.

Avant mon arrivée dans le laboratoire, une méthode de tri cellulaire a été développée par Céline Osinski dans l'équipe afin de préparer des populations enrichies en cellules entéroendocrines à partir de fragments de jéjunum provenant de by-pass gastrique de patients obèses. La muqueuse jéjunale a été disséquée et hachée avant incubation dans un tampon chélatant. Les cellules épithéliales libérées ont été filtrées et triées par fluorescence activated cell sorting (FACS). Pour cela, l'iodure de propidium a été utilisé comme marqueur de viabilité afin d'éliminer les cellules mortes, positives pour ce marqueur. Nous avons ensuite éliminé les cellules immunitaires grâce au marqueur CD45 pour lequel elles sont positives. Enfin, le marqueur CD24 a permis de collecter une population CD24+ contenant les cellules entéroendocrines ainsi que les cellules de Paneth et les cellules souches.

Les cellules entéroendocrines collectées à partir de sujets Ob (n= 14) et ObD (n= 13) ont été analysées par RNA-sequencing. Pour un seul sujet, les cellules CD45-/CD24+ ainsi que les cellules CD45-/CD24- ont été séquencées. Dans le cadre de ma thèse, j'ai réalisé l'analyse des données issues du RNA-seq. Comme attendu, les marqueurs spécifiques des cellules entéroendocrines, tels que *CHGA*, *GCG*, *GIP*, *CCK* et *PYY* sont exprimés dans les cellules CD24+ ainsi que les marqueurs des cellules de Paneth (lysozyme ou *LYZ*) et cellules souches (Leucine-rich repeat-containing G-protein coupled receptor 5 ou *LGR5*). Nous avons également montré que le profil transcriptomique des cellules entéroendocrines (CD24+) était d'une part très éloigné du profil des cellules CD24- (un échantillon séquencé) et d'autre part très différent en fonction du statut métabolique des patients, Ob ou ObD (figure 28A).





Le RNA seq a mis en évidence 128 gènes différentiellement exprimés chez les ObD comparés aux Ob pour une FDR < 0.001 dont 128 gènes sur-exprimés et 68 sous-exprimés. Ces gènes sont positivement corrélés aux paramètres biologiques du diabète (glycémie, HbA1c) et négativement corrélés aux paramètres associés à la dyslipidémie (cholestérol, LDL, apoB ; figure 28B).

**Ces résultats montrent que la signature transcriptomique des cellules entéroendocrines est différente chez les individus obèses selon leur statut métabolique, avec ou sans DT2.**

De plus, l'étude des facteurs de transcription précoces a montré que *RPS3*, *NEUROG3*, *SOX4*, *RUN1XT1*, *PAX4* et *HMGB3* sont sous-exprimés chez les ObD comparés aux Ob alors que *SMARCD2* et *CELF3* sont sur-exprimés. L'étude des facteurs de transcription intermédiaires et tardifs montre une sur-expression de *FOXA1* et *TRIM35* chez les ObD comparés aux Ob. Parmi

les marqueurs spécifiques des cellules entéroendocrines, nous avons également mis en évidence la sous-expression chez les ObD comparés aux Ob de *CHGA*, *PYY*, *GCG* et *TPH1*.

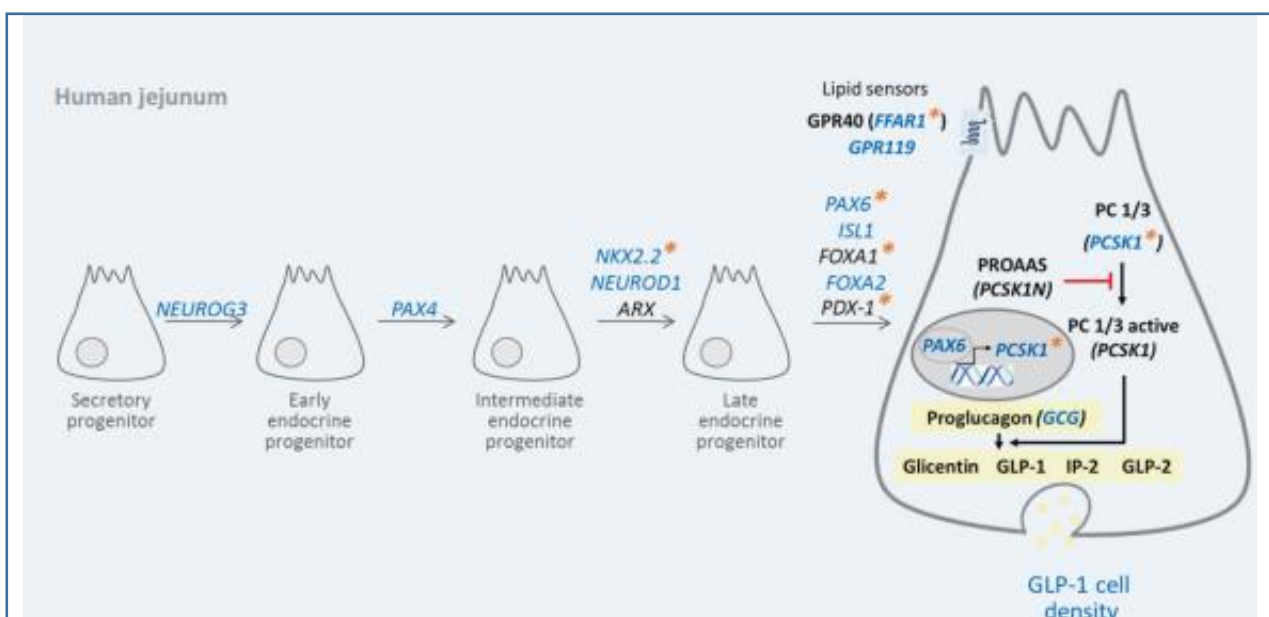
**Ces résultats démontrent l'altération de la différenciation des cellules entéroendocrines chez les patients obèses ayant un diabète de type 2.**

En parallèle, une analyse gène candidat a été réalisée et montre que l'obésité altère l'expression des facteurs de transcription *NKX2.2*, *PAX6*, *FOXA1* et *PDX-1* ainsi que la *PCSK1*. De plus, le DT2 dans un contexte d'obésité diminue également l'expression des facteurs de transcription *NEUROG3*, *PAX4*, *NKX2.2*, *NEUROD1*, *PAX6*, *ISL1* et *FOXA2*. *PAX6* régule des gènes impliqués dans la maturation du proglucagon en GLP-1 tels que *PCSK1*, *PCSK1N* (inhibiteur de *PCSK1*) et *PCSK2*. Ces trois gènes sont sous-exprimés chez les obèses (avec ou sans diabète) comparés aux sujets non obèses. Aussi, *PCSK1* est sous-exprimé chez les obèses diabétiques comparés aux obèses.

L'analyse de l'expression des gènes codant pour les détecteurs de lipides *FFAR1* et *GPR119* impliqués dans la sécrétion de GLP-1 et contrôlés par Pax6, montre que *FFAR1* est sous-exprimé dans l'obésité. *FFAR1* et *GPR119* sont tous-deux sous-exprimés chez les sujets ObD comparés aux Ob (figure 29).

Une analyse histologique par immunochimie a également permis de montrer que la densité des cellules GLP-1 endocrine est diminuée chez les sujets ObD comparés aux Ob (figure 29).

**Le diabète de type 2 dans un contexte d'obésité humaine altère le lignage entéroendocrine et la densité des GLP-1 positives.**



**Figure 29: Le diabète dans un contexte d'obésité altère le lignage entéroendocrine et la densité des cellules sécrétrices de GLP-1.**

La diminution, dans le DT2, de l'expression de GCG et de la densité des cellules sécrétrices de GLP-1 peut être liée à la diminution d'expression des facteurs de transcription NEUROG3, PAX4, NKX2.2, NEUROD1, PAX6, ISL1 et FOXA2. De plus, l'expression de PCSK1 et des détecteurs de lipides GPR119 et FFAR1 est également diminuée dans le DT2. Le bleu indique la diminution de la densité des cellules GLP-1 et les noms de gènes dont l'expression est diminuée par le DT2. Les astérisques orange indiquent les gènes dont l'expression est altérée par l'obésité (avec ou sans diabète) comparé à des sujets minces.

## **B/ Expression des gènes de la voie de transduction du goût sucré dans l'intestin dans un contexte d'obésité humaine avec ou sans diabète de type 2.**

Les 128 gènes différentiellement exprimés chez les ObD comparés aux Ob peuvent être classés dans des voies selon la nomenclature de la base de données Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG). Par exemple:

Voie « insulin secretion », 11 gènes sont différentiellement exprimés :

- 8 sur-exprimés : ITPR3, AIM1, TMEM8A, TRPM4, FAM84A, C1orf106, KIAA116 et MTCO1P12
- 3 sous-exprimés : ATP5G1, ATP5G2 et HIST1H4C

Voie « metabolic pathway », 9 gènes sont différentiellement exprimés :

- 7 sur-exprimés : SMPD3, OGDH, PFKL, DGKQ, B3GNT5, PI4KA et MGAM2
- 2 sous-exprimés : CAT et TALDO1

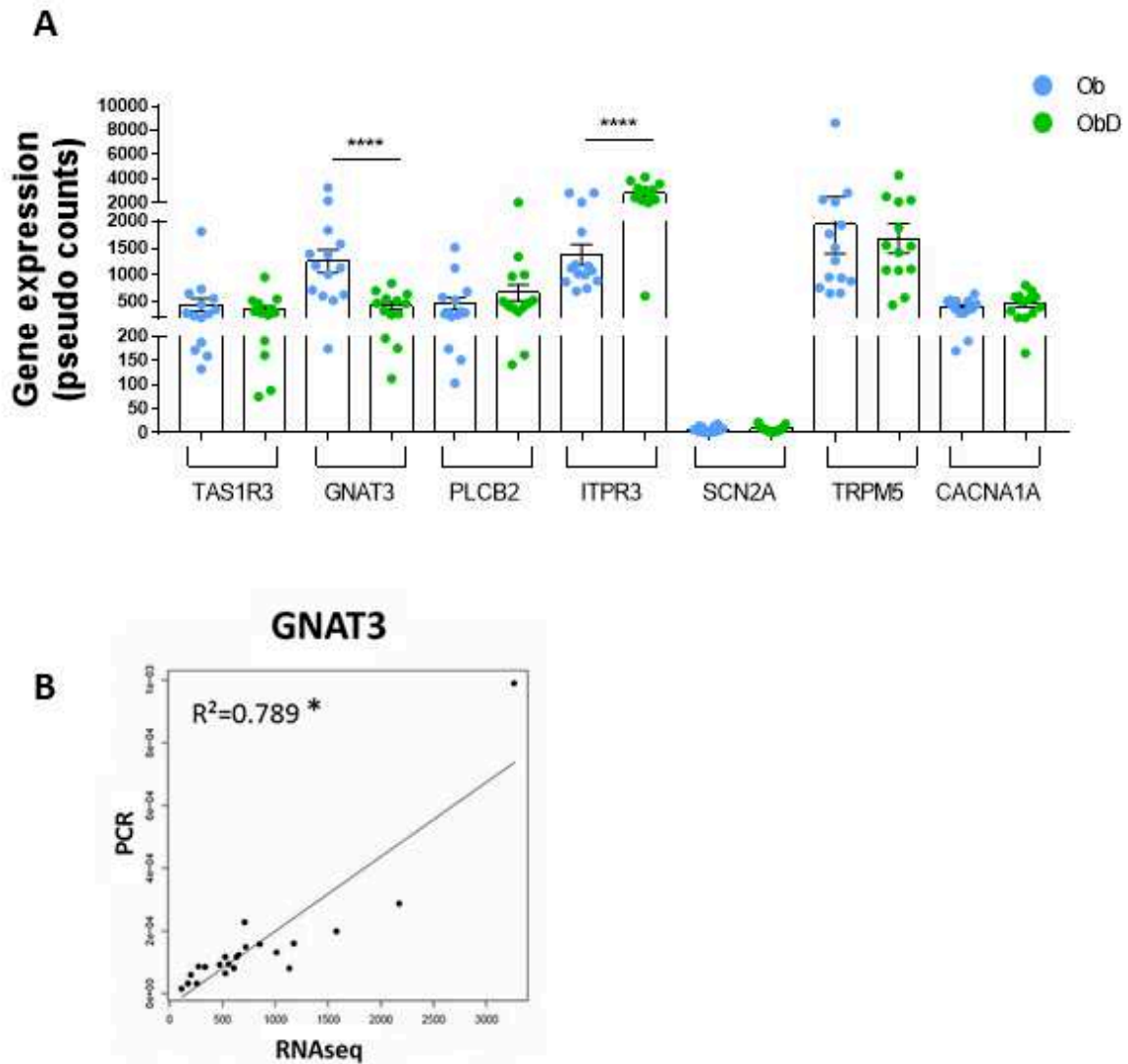
Voie « taste transduction », 2 gènes sont différentiellement exprimés :

- 1 sur-exprimé : *ITPR3*
- 1 sous-exprimé : *GNAT3*

Dans le cadre de ma thèse, je me suis intéressée à la voie de signalisation nommée « taste transduction » et plus particulièrement l'expression des gènes impliqués dans la transduction du goût sucré dans les cellules entéroendocrines : le récepteur T1R2/T1R3, *GNAT3*, la phospholipase C $\beta$ 2 *PLCB2*, *ITPR3*, les canaux sodiques *SCN2A* et *TRPM5* et le canal calcique *CACNA1A*.

Dans cette étude, nous montrons que l'expression du gène *ITPR3* est 2 fois plus importante chez les sujets ObD comparés aux Ob et *GNAT3* est 3 fois moins exprimé chez les ObD comparés aux Ob (figure 30A). Parmi les 68 gènes sous-exprimés chez les ObD comparés aux Ob, *GNAT3* est le gène le plus sous-exprimé. De plus, l'expression de *GNAT3* a également été étudiée par RT-qPCR dans l'ARN des populations enrichies en cellules entéroendocrines de 11 patients Ob et 11 ObD parmi la cohorte de patients utilisée pour le RNA-seq. Ceci nous a permis de montrer une forte corrélation positive entre les résultats obtenus par RNA-seq et ceux obtenus par RT-qPCR (figure 30B). En effet, nous remarquons que les sujets exprimant le plus *GNAT3* par RNA-seq sont ceux qui montrent également l'expression de *GNAT3* la plus élevée par RT-qPCR.

**Ces résultats confirment la sous-expression de *GNAT3* chez les patients obèses diabétiques comparés aux patients obèses.**



**Figure 30 : Etude de la voie de transduction du goût sucré dans les cellules entéroendocrines de sujets obèses avec ou sans diabète de type 2.**

A) Expression des gènes de la transduction du goût sucré dans les cellules entéroendocrines de patients obèses (Ob, n=14) et les obèses diabétiques (ObD, n=13). *TAS1R3*, *GNAT3*, *PLCB2*, *ITPR3*, *SCN2A*, *TRPM5* et *CACNA1A* codent respectivement pour le récepteur T1R3, la sous-unité  $\alpha$  de la gustducine, la phospholipase  $C\beta 2$ , le récepteur à l'inositol triphosphate, des canaux sodiques et un canal calcique B) Corrélation entre l'expression de *GNAT3* obtenue par RT-qPCR et RNA-seq chez les patients Ob (n=11) et ObD (n=11). \* :  $p < 0.05$  ; \*\* :  $p < 0.01$  ; \*\*\* :  $p < 0.001$  et \*\*\*\* :  $p < 0.0001$ .

# Articles correspondant aux résultats

**Article 1 soumis Le Gléau *et al*, American Journal of Physiology – Endocrinology and Metabolism**

**« Intestinal alteration of  $\alpha$ -gustducin and sweet taste signaling pathway in metabolic diseases in partly rescued after weight loss and diabetes remission »**

Léa Le Gléau, Christine Rouault, Céline Osinski, Edi Pfrifti, Hédi Antoine Soula, Jean Debédât, Pauline Busieau, Chloé Amouyal, Karine Clément, Fabrizio Andreelli, Agnès Ribeiro et Patricia Serradas

Soumis à American Journal of Physiology – Endocrinology and Metabolism

1 **Intestinal alteration of  $\alpha$ -gustducin and sweet taste signaling pathway in metabolic**  
2 **diseases is partly rescued after weight loss and diabetes remission**

3  
4 **Running Head:** Intestinal  $\alpha$ -gustducin in metabolic diseases

5  
6 Léa Le Gléau<sup>1</sup>, Christine Rouault<sup>1</sup>, Céline Osinski<sup>1</sup>, Edi Prifti<sup>1,2</sup>, Hédi Antoine Soula<sup>1</sup>, Jean  
7 Debédât<sup>1</sup>, Pauline Busieau<sup>1</sup>, Chloé Amouyal<sup>1,3,4</sup>, Karine Clément<sup>1,3</sup>, Fabrizio Andreelli<sup>1,3,4</sup>,  
8 Agnès Ribeiro<sup>1\*</sup> and Patricia Serradas<sup>1\*</sup>

9  
10 1- Sorbonne Univ           INSERM, Nutrition and obesities: systemic approaches (NutriOmics),  
11 F-75013 Paris, France

12 2- IRD, Sorbonne University, UMMISCO, 32 Avenue Henri Varagnat, F-93143 Bondy, France

13 3- Assistance Publique/Hôpitaux de Paris, APHP, Nutrition department, Pitié-Salpêtrière  
14 hospital, Paris F-75013

15 4- Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, APHP, Diabetology-Metabolisms Department,  
16 Pitié-Salpêtrière Hospital, Paris F-75013, France.

17  
18 \* Co-Corresponding authors and contributed equally to this work:

19 Dr. Agnès Ribeiro : agnes.ribeiro@sorbonne-universite.fr / ORCID ID: 0000-0003-2063-6084  
20 Sorbonne Université / INSERM UMR\_S 1269

21 Prof. Patricia Serradas : patricia.serradas\_pacheco@sorbonne-universite.fr / ORCID ID:  
22 0000-0002-6652-9746

23 NutriOmics - Nutrition and obesities: systemic approaches

24 Faculté de Médecine

25 91 Bd de l'Hôpital, 6ème ge

26 75013 Paris FRANCE

27  
28 **Word count:** 5321

29



## Abstract

Carbohydrates and sweeteners are detected by sweet taste receptors in enteroendocrine cells (EEC). These receptors are coupled to the gustducin G-protein, which  $\alpha$ -subunit is encoded by the *GNAT3* gene. In the intestine, the activation of sweet taste receptors triggers a signaling pathway leading to the secretion of GLP-1, an incretin hormone. In metabolic diseases GLP-1 concentration and the incretin effect are reduced while partly restored after Roux-en-Y gastric bypass (RYGB). We wondered if the decreased GLP-1 secretion in metabolic diseases is caused by an intestinal defect in sweet taste transduction pathway. In our RNA-sequencing of EECs *GNAT3* expression is decreased in patients with obesity and type 2 diabetes compared to normoglycemic obese patients. This prompted us to explore sweet taste signaling pathway in mice with metabolic deteriorations. During obesity onset in mice *Gnat3* expression was downregulated in EECs. After metabolic improvement with entero-gastro-anastomosis surgery in mice (a surrogate of the RYGB in humans), the expression of *Gnat3* increased in the new alimentary tract and glucose-induced GLP-1 secretion was improved. In order to evaluate if high-fat diet-induced dysbiotic intestinal microbiota could explain the changes in the expression of sweet taste  $\alpha$ -subunit G protein, we performed a fecal microbiota transfer in mice. We observed that a diet-induced dysbiotic microbiota does not directly modify the intestinal *Gnat3* expression. Our data highlight that metabolic diseases were associated with a deterioration of sweet taste signaling pathway and contribute to impaired GLP-1 secretion that is partly rescued after intestinal remodeling.

**Key words:** Intestinal endocrine cells,  $\alpha$ -gustducin, obesity, type 2 diabetes, microbiota

## Abbreviations

CD: control diet; EEC: enteroendocrine cell; EGA: entero-gastric anastomosis; FMT: fecal microbiota transfer; GLP-1: glucagon-like peptide-1; HFD: high-fat diet; HFD-HF: high-fat diet-high fructose; HOMA-IR: Homeostasis Assessment of insulin resistance; PYY: peptide YY; RYGB: Roux-en-Y gastric bypass; T2D: Type 2 diabetes

57

58 **INTRODUCTION**

59 Glucagon Like-Peptide-1 (GLP-1) is an incretin hormone secreted from specialized L-  
60 enteroendocrine cells (EECs) which enhances glucose-dependent insulin secretion by  
61 approximately two-fold in the postprandial state. The mechanisms by which gut EEC link  
62 glucose detection to GLP-1 secretion is still debated but they involve both sugar transporters  
63 and sweet taste receptors (32). These heterodimeric TAS1R2-TAS1R3 receptors are coupled  
64 to the taste G-protein gustducin composed of  $\alpha$ ,  $\beta$  and  $\gamma$  subunits encoded respectively by  
65 *GNAT3*, *GNB3* and *GNG13* genes (34). Several lines of evidence support that TAS1R2-  
66 TAS1R3 and  $\alpha$ -gustducin are required for glucose-stimulated GLP-1 secretion from the small  
67 intestine. Indeed, these three proteins are present in human and rodent L-cells of the small  
68 intestine (16, 36, 39). Furthermore, GLP-1 secretion can be elicited from mouse intestinal  
69 explants, and/or mouse (GLUTag) and human (NCI-H716) EEC lines by using several sweet  
70 taste receptor agonists — sucrose, glucose, fructose and sucralose (12, 16, 24). Moreover,  
71 glucose-stimulated GLP-1 secretion is nearly or fully abolished in  $\alpha$ -gustducin<sup>-/-</sup>, TAS1R2<sup>-/-</sup>  
72 and TAS1R3<sup>-/-</sup> mice (12, 16). This is also the case, when sweet taste receptor are inhibited  
73 or silenced using RNA of  $\alpha$ -gustducin on GLUTag and NCI-H716 cells (16, 24). Finally, the  
74 sweet taste receptor inhibitor, lactisole, reduces circulating levels of GLP-1 and PYY after  
75 intragastric or intraduodenal administration of glucose in humans (13, 39). In EECs, the  
76 detection of carbohydrates and sweeteners by sweet taste receptors and the activation of  $\alpha$ -  
77 gustducin stimulate phospholipase C $\beta$ 2 and produce inositol-trisphosphate (IP3). IP3 binds to  
78 its receptor in the endoplasmic reticulum and causes an increase in intracellular calcium  
79 contributing to the GLP-1 release. TRPM5 and SCN2A sodium channels and CACNA1A  
80 calcium channel are also involved in this sweet taste transduction leading to GLP-1 secretion  
81 (10).

82 EECs are affected by local environmental or metabolic signals, including those arising from  
83 differing dietary habits, diabetes or obesity. The incretin effect seems to be impaired in

84 individuals with type 2 diabetes (T2D) owing to the combined effects of reduced GLP-1  
85 secretion and impaired GIP action (25, 28). Gastric bypass surgery is an effective tool in  
86 reducing body weight in individuals with severe obesity (26) and results in the improvement or  
87 even complete remission of T2D (9). The rise of post-prandial GLP-1 secretion after Roux-en-  
88 Y gastric bypass (RYGB) may contribute to this improvement (7, 14, 23, 33, 44). After RYGB  
89 the rapid delivery of undigested nutrients to the lower small intestine may affect the regulation  
90 of taste receptors and/or glucose transporters on EECs, resulting in an enhanced release of  
91 GLP-1 (2, 20, 45) although a recent study questioned this (27). Therefore, the mechanisms  
92 driving the alteration of enterohormone secretion in obesity and after RYGB might not be  
93 restricted to GLP-1 incretin effects alone (23). Moreover, gut microbiota, participates in  
94 environmental cues that affect EEC and is altered in metabolic diseases, especially in terms  
95 of bacterial diversity and composition-(31). RYGB improves microbial gene richness, but it is  
96 partially restored, most patients remain with low microbial gene richness despite major  
97 metabolic improvement and weight loss(4).

98 We have previously showed a positive association between jejunal GLP-1 positive cell density  
99 and fat-consumption in individuals with severe obesity (3). Moreover, we showed that T2D is  
100 associated with impaired jejunal enteroendocrine GLP-1 cell lineage in human obesity (30).

101 Our hypothesis is that the sweet taste transduction pathway and the taste gustducin G-protein  
102 are altered in metabolic diseases contributing to a defective sugar detection, inappropriate  
103 plasma enterohormone concentrations and reduced incretin effect.

104 Taking advantage of a RNA sequencing previously performed in human EECs, we examined  
105 the relationship between obesity and T2D and the *GNAT3* expression in these cells. We  
106 studied the expression of *Gnat3* and other genes involved in sweet taste transduction pathway  
107 during the onset of metabolic diseases in mouse models fed for 1 to 12 weeks, either on  
108 control, high-fat (HFD) or high-fat and high-fructose (HFD-HF) diets as well as in metabolic  
109 improvement induced by an entero-gastro-anastomosis (EGA) mouse model (40).  
110 Furthermore, we investigated the role of gut microbiota on this pathway alteration.

111

## **MATERIAL AND METHODS:**

### **Human study**

This study is ancillary to a previously published studies (30) that included subjects with severe obesity involved in a bariatric surgery program (RYGB) carried out at the Pitié-Salpêtrière University Hospital, Nutrition and visceral Surgery Departments (Paris, France). Obese subjects were stratified according to their metabolic status, and two groups were constituted: obese subjects without T2D (Ob, n= 14) and obese subjects with T2D (ObD, n= 13) receiving antidiabetic treatments or yet untreated (30). Results related to EEC preparation, RNA-sequencing and its subsequent analysis have been already published (30). The RNA-Seq gene expression data and raw fastq files are available on the GEO repository ([www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/)) under accession number GSE132831.

### **Animals and diets**

Six- and 3-week-old C57BL/6j male mice were obtained from Janvier Labs (France). For the EGA surgical procedure, 7-week-old C57BL/6j male mice were obtained from Charles River Laboratories (France). Mice were housed in groups and maintained on a 12-hour light-dark cycle with *ad libitum* access to water and diet: chow diet (CD: 5% Kcal fat - reference A03-10, Safe-Diets) or high fat diet (60% Kcal fat - D12492, Research Diets) with (HFD-HF) or without (HFD) 30% fructose (Sigma) in drinking water. Food and bedding were irradiated at 10 kGy. Experimental procedures agreed with the French ethical guidelines for animal studies and were approved by the Regional Animal Care and Use Ethic Committee Charles Darwin C2EA – 05, agreement number (#17401).

### **EGA surgical procedure**

The EGA surgical procedure was performed as previously described (40). In brief, HFD mice undergoing surgery were fasted for 6 h and anaesthetized with 2% isoflurane (Abbott) and air/oxygen. Analgesia was delivered intraperitoneally 30 min before surgery (Buprenorphine,

140 0.03 mg/kg, Axience SAS) and at the end of the procedure (Ketoprofen, Merial, 1%, diluted  
141 1/100, 200  $\mu$ L per mouse). Antibioprophylaxy was delivered sub-cutaneous at beginning of the  
142 surgery (ceftriaxone 100 mg/kg, Hospira,). The procedure consisted of a pyloric sphincter  
143 ligature, followed by an entero-gastric anastomosis connecting the distal jejunum to the  
144 stomach, excluding the duodenum and the proximal jejunum from the alimentary tract. Sham-  
145 operated mice (simple laparotomy) underwent the same duration of anaesthesia as EGA-  
146 operated mice. In both groups, the laparotomy was repaired in two layers. All mice were  
147 maintained on a standardized post-operative protocol to monitor pain, body weight and  
148 hydration, subcutaneous injection of saline serum and additional analgesia was given as  
149 necessary. The mice had access to water and high fat diet right after surgery. Experimental  
150 procedures were agreed with the French ethical guidelines for animal studies and approved  
151 by the Regional Animal Care and Use Ethic Committee Charles Darwin C2EA – 05, agreement  
152 number (#2762).

#### 154 **Fecal microbiota transfer**

155 Mice undergoing 12 weeks of CD and HFD-HF diets were used as fecal microbiota donors. In  
156 the morning, feces from the donor mice were collected in sterile containers and immediately  
157 diluted in sterile, anoxic Ringer buffer containing 1 g/L L-cysteine as a reducing agent. An  
158 aliquot of inoculum was snap frozen in liquid nitrogen and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  for subsequent  
159 bacterial composition analysis.

160 Colonization was achieved by intragastric gavage with 200  $\mu$ L of inoculum once per day for 3  
161 consecutive days as described previously (21). 3-week old mice received by gavage with  
162 inoculum of CD microbiota (MRCD) or HFD-HF microbiota (MRHFD-HF) and were kept on  
163 HFD-HF diet. Gloves were changed between the handling of each group, and all instruments  
164 and working area were disinfected with hydrogen peroxyde 3% vol/vol.

165

### 166 **Microbiome composition analysis**

167 Feces from donor mice after 12 weeks of diet, as well as those from recipient mice 3 and 12  
168 weeks after microbiota transfer and the inoculum solution were frozen in liquid nitrogen and  
169 stored at -80°C. Fecal DNA was extracted using the PureLink™ Microbiome DNA Purification  
170 Kit (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. Bacterial DNA from these samples  
171 was sequenced using the minION nanopore DNA sequencing method (Oxford Nanopore  
172 Technologies) (22).

173 After sequencing, fast5 reads were basecalled and demultiplexed with the Guppy software.  
174 Then, taxonomic binning was performed using Centrifuge and Minimap. From this step,  
175 species-level abundance tables were built and integrated with taxonomic information and  
176 sample metadata in *phyloseq* objects for subsequent analyses with phyloseq R package.  
177 Samples were rarified to 35000 reads per sample before quantitative analyses. Detailed  
178 pipeline information is presented in (1).

179

### 180 **Body composition**

181 Mouse body composition was measured in vigil mice using the Bruker Minispec mq10 NMR  
182 (Bruker Optics) after 3 and 12 weeks of diet, 3 and 12 weeks after microbiota transfer, 1 week  
183 before the EGA surgery and at day 28 after the EGA surgery. Animals were placed in a clear  
184 plastic cylinder (50 mm in diameter) lowered into the device for the duration of the scan (<2  
185 min).

186

### 187 **Plasma parameter measurements**

188 Blood was withdrawn from the tail vein using EDTA as the anticoagulant. Blood glucose levels  
189 were evaluated using a glucometer (Accucheck performa®, Roche). Plasma triglycerides were  
190 measured using Triglycerides FS kit from Diasys (Diagnostic Systems). Plasma insulin was  
191 determined by Elisa (Alpco, Eurobio). For active GLP-1 determination, blood was collected into  
192 EDTA coated Microvettes (SARSTEDT) preloaded with Dipeptidyl peptidase-4 inhibitor

193 (Merck, Millipore). Blood was immediately centrifuged at 4 °C to separate the plasma from the  
194 whole blood and stored at -20°C until analysis. Plasma insulin, glucagon, C-peptide, PYY,  
195 pancreatic polypeptide, active GLP-1, GIP and Leptin concentrations were assessed by  
196 MILLIPLEX assays (MMHE-44 K Milliplex, EMD Millipore).

### 198 **Glucose and insulin tolerance tests**

199 All experiments were performed on conscious mice. A glucose tolerance test (2g/kg body  
200 weight) was performed on mice fasted overnight for 14-16 h (diet and microbiota transfer  
201 experiments) or fasted for 6 hours (EGA experiment). For the insulin tolerance test, animals  
202 fasted for 6 hours were injected intraperitoneally with 0.5 or 1 unit of insulin/kg body weight  
203 (Novorapid®, Novo-Nordisk). For both tests, blood glucose was measured at the tail vein with  
204 an AccuCheck Performa glucometer (Roche Diagnostics) at indicated times.

### 206 **Intestinal tissue collection**

207 Human epithelial cells from obese patient jejunum were collected as described in our previous  
208 study (30). Mice undergoing CD, HFD or HFD-HF were euthanized by cervical dislocation, the  
209 jejunum was dissected and the mucosa was scrapped to collect epithelial cells before FACS  
210 procedure.

211 EGA-operated and sham-operated mice were anesthetized and decapitated 4 weeks after  
212 surgery. Duodenum, proximal and distal jejunum and ileum were frozen in liquid nitrogen and  
213 stored at -80°C. Total RNA was extracted using Rneasy mini kit (Qiagen).

214 Mice undergoing fecal microbiota transfer (FMT) were euthanized by cervical dislocation. The  
215 jejunum was turned over and cut before dissociating the epithelium in a cell recovery solution  
216 (corning). Total RNA was extracted using Tri-reagent® (Molecular Research Center. Inc.).

### 218 **FACS for enriched-EEC preparation in mouse**

219 We adapted to mice the FACS method for enriched-EEC preparation in humans described in  
220 (30). Epithelial cells were scrapped and rinsed in FACS buffer (PBS, 3% FCS, 2 mM EDTA),

221 blocked with Fc Receptor Binding Inhibitor Antibody (eBioscience) and stained with the  
222 following antibodies: CD45-BV421 (Bio Legend), CD326-APC (Biolegend) and CD24-FITC  
223 (Biolegend). Dead cells were excluded with propidium iodide (eBiosciences). During sorting  
224 experiments, cells were placed in FACS buffer with RNase inhibitor (Life Technologies). CD24  
225 marker was used to select enteroendocrine, Paneth and stem differentiated cells, CD45 to get  
226 rid of B lymphocytes that also expressed CD24 and CD326-APC to select epithelial cells.  
227 CD45-negative, CD326 positive, CD24-positive EEC enriched cell fraction was on a jet-in-air  
228 flow cytometer, the MoFlo Astrios with Summit software (Beckman Coulter).

### 230 **Gene expression analysis**

231 In CD45+, CD24- and CD24+ sorted mouse cells, gene expression was measured using  
232 QuantiGene™ Plex assay kit (QGP-150-M20021104, ThermoFisher). HPRT, PPIB, PGK1 and  
233 RPS18 were used for normalization (41). Relative quantification was determined by the median  
234 fluorescent intensity.

235 Otherwise, reverse transcription using M-MLV reverse transcriptase (Promega) and  
236 quantitative PCR with SybrGreen were performed. Gene expression was normalized with  
237 RPLP0 expression in mice and cyclophilin expression in humans to obtain relative  
238 quantification using the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method. All primers are presented in Table 1.

### 240 **Statistical analysis**

241 We used GraphPad Prism and R software for all statistical analysis. For human data, details  
242 of all analyses and tests are described in Osinski & al (30). Briefly, to assess differential  
243 expression on semi-quantitative techniques such as RNAseq data, EdgeR (Biocomputing)  
244 package was used using negative binomial test. P-values were adjusted using the false  
245 discovery rate (FDR) method with a threshold of 0.001. Only genes with count per million (cpm)  
246 over 100 for at least 2 individuals were considered. Statistical differences in mice have been  
247 demonstrated with ANOVA or t-tests. For intestinal microbiota analyses, statistics on principal  
248 component were computed by permanova with 1000 permutations using adonis function



249 (VEGAN R package) and statistics on cliff-delta were calculated with Wilcoxon-Mann-Whitney  
250 analysis using EFFSIZE R package.  $p < 0.05$  was considered as statistically significance.

## 252 RESULTS

### 253 **Severe obesity and T2D are associated with reduced sweet taste transduction pathway** 254 **gene expression in human EEC.**

255 The RNA-sequencing transcriptome of jejunal sorted EEC from severely obese patients with  
256 (ObD) or without T2D (Ob) has been reported in Osinski & al (30). Here, we analyzed the gene  
257 expression of sweet taste transduction pathway, namely *TAS1R3*, *GNAT3*, *PLCB2*, *ITPR3*,  
258 *SCN2A*, *TRPM5*, *CACNA1A*, *SLC2A2* and *SLC2A5* (Fig. 1A). We showed that *GNAT3* gene  
259 expression was decreased 3-fold ( $fdr \leq 0.0001$ ) in ObD patients compared to Ob patients  
260 whereas *ITPR3* was increased 2-fold ( $fdr \leq 0.0001$ ) (Fig. 1A). Furthermore, we showed a strong  
261 correlation between *GNAT3* gene expression analysis by RNA-sequencing and by RT-qPCR  
262 in Ob and ObD patients (Fig. 1B), confirming the down-regulation of *GNAT3* by T2D in obesity.  
263 This prompted us to explore the regulation of sweet taste transduction pathway genes in animal  
264 models with metabolic degradation and after metabolic improvement.

### 266 **High-fat high-fructose diet induces more severe metabolic deterioration compared to** 267 **high-fat diet.**

268 To induce different severity of metabolic disorders, mice were fed either with control (CD),  
269 high-fat (HFD) or high-fat and high-fructose (HFD-HF) diets for 1 to 12 weeks. Both HFD and  
270 HFD-HF prompted a similar weight gain (Fig. 2A) compared to CD. Body composition analyses  
271 showed an increased lean mass after 12 weeks regardless of the diets (Fig. 2B). As expected,  
272 increased fat mass and plasma triglycerides were exacerbated after HFD and HFD-HF  
273 compared to CD from 3 weeks of diets (Fig. 2C and D). Glucose homeostasis was then  
274 analyzed. The area under the curve (AUC) of glycaemia during oral glucose tolerance test  
275 (OGTT) revealed glucose intolerance as early as 3 weeks of HFD an HFD-HF diets and the  
276 glucose intolerance was accentuated after 12 weeks (Fig. 2E to G). After 3 weeks of diets,

277 fasted glycemia was significantly higher in HFD than in CD mice but after 12 weeks of diets,  
278 similar high levels of blood glucose was observed in mice fed with both HFD and HFD-HF (Fig.  
279 2H). Mice fed 12 weeks with HFD-HF displayed higher basal insulin level (Fig. 2I), insulin  
280 resistance in accordance with elevated HOMA-IR (Fig. 2J) and deteriorated insulin tolerance  
281 test (Fig. 2K and L). Together, these results showed that metabolic phenotype of HFD fed mice  
282 is characterized by obesity, glucose intolerance, and basal hyperglycemia. HFD-HF fed mice  
283 displayed a more severe metabolic deterioration. Indeed, HFD-HF fed mice also displayed  
284 basal hyperinsulinemia and insulin resistance.

### 285 286 **The expression of sweet taste transduction genes is altered in sorted EEC from mice** 287 **with metabolic deterioration**

288 EEC are rare and scattered along the crypt-villus axis. Therefore, to enable the study of sweet  
289 taste pathway gene expression in EEC, a mouse epithelial cell preparation, enriched in EEC,  
290 was adapted from our previous work in humans (30) with the addition of CD326 marker to select  
291 epithelial cells (Fig. 3A). As shown in Figure 3, B to E, our cell sorting strategy in mice was  
292 validated. Indeed, gene expression of EEC specific markers, namely *ChgA*, *Gip*, *Pyy* and  
293 *Pcsk1* and specific markers of Paneth cells and stem cells, *Lyz* and *Lgr5* respectively, were  
294 specifically expressed in the CD24<sup>+</sup> cell fraction (Fig. 3F and G). The *ApoA4* gene expression,  
295 an enterocyte marker, was significantly higher in the CD24<sup>-</sup> cell fraction than in the CD24<sup>+</sup> cell  
296 fraction (Fig. 3H). However, an *ApoA4* gene expression in the CD24<sup>+</sup> cell fraction showed  
297 either a contamination or an unexpected gene expression. More strikingly, the *Gnat3* gene  
298 expression was specific of CD24<sup>+</sup> cell fraction, indicating that  $\alpha$ -gustducin subunit, encoded  
299 by this gene, is specific of EEC (Fig. 3I).

300 We examined the expression of sweet taste transduction pathway genes (Fig. 4), namely: the  
301 sweet taste receptors (*Tas1r2* and *Tas1r3*), the  $\alpha$  gustducin subunit (*Gnat3*), the inositol  
302 trisphosphate receptor (*Itpr3*), the phosphatidylinositol bisphosphate phosphodiesterase  $\beta$ 2  
303 (*Plcb2*), the voltage-dependent calcium channel (*Cacna1a*), the 2 voltage-dependent sodium  
304 channel (*Scn2A*) and the transient receptor potential cation channel subfamily M member 5

305 (*Trpm5*). We also analyzed *Slc2a2* and *Slc2a5* gene expression, which encode respectively  
306 for GLUT2 and GLUT5, two sugar transporters. The expression of *Tas1r2* and *Tas1r3* were  
307 not detectable. We showed that *Itpr3* and *Trpm5* gene expression was significantly decreased  
308 in EEC only after 12 weeks of HFD (Fig. 4B and F) whereas *Gnat3* gene expression in EEC  
309 was decreased as early as 3 weeks of HFD and HFD-HF (Fig. 4A). Interestingly, at 3 weeks of  
310 HFD and HFD-HF diets, *Gnat3* ( $p=0.014$ ), *Plcb2* ( $p=0.019$ ) and *Trpm5* ( $p=0.019$ ) gene  
311 expression was negatively correlated with body weight of mice (*data not shown*). *Slc2a5* gene  
312 expression, coding the fructose transporter GLUT5, was increased by 3 weeks of HFD-HF  
313 (Fig. 4H). We concluded that expression of genes involved in sweet taste transduction pathway  
314 in EEC was altered by obesity, glucose intolerance, and basal hyperglycemia. However,  
315 aggravated basal hyperinsulinemia and insulin resistance observed in HFD-HF did not further  
316 amplify the alteration of the sweet taste transduction pathway.

### 317 318 **The $\alpha$ -gustducin gene expression is partly rescued by surgery-induced hyperglycemia** 319 **remission in mice**

320 To evaluate if the altered sweet taste transduction pathway gene expression within EEC could  
321 be corrected after weight loss and diabetes remission, we used EGA surgery in mice (a  
322 surrogate of the RYGB in humans), as described before (2, 40). EGA surgery forms a loop that  
323 excludes the duodenum and proximal jejunum from alimentary tract. After surgery, the food  
324 contained in the stomach is then discharged directly into the distal jejunum which becomes the  
325 first segment in contact with the nutrients (Fig. 5A). EGA surgery was performed in obese mice  
326 fed 8 weeks on HFD and metabolic parameters and gene expression were evaluated 4 weeks  
327 after surgery. After surgery, the HFD was maintained in sham-operated (control mice) and  
328 EGA-operated mice. In agreement with previous experiments (40) in sham-operated mice,  
329 body weight recovered 30 days after surgery whereas a long-term decreased body weight was  
330 observed in EGA-operated mice during the follow-up (Fig. 5B). Body composition analyses  
331 confirmed a stable lean mass in both sham-operated and EGA-operated mice whereas fat

332 mass decreased in EGA-operated mice after surgery (Fig. 5C and D) as well as plasma leptin  
333 level (Table 2). The AUC of glycemia during an OGTT were significantly lower in EGA-operated  
334 than in sham-operated mice as well as fasted basal glycemia (Fig. 5 E to H). The improvement  
335 of glucose tolerance in EGA-operated mice resulted from an increase in insulin and C-peptide  
336 secretions (Table 2). Glucagon levels were similarly reduced during OGTT in all groups during  
337 glucose challenge (Table 2). Insulin sensitivity was improved in EGA-operated mice since  
338 plasma insulin levels and HOMA-IR decreased (Fig. 5I and J). Thus, gut anatomy modifications  
339 performed with EGA surgery allowed to induce body weight loss, and improvement of basal  
340 glycemia, glucose tolerance, insulin secretion and insulin sensitivity. The gut anatomy  
341 modifications were concomitant with an increased glucose-induced GLP-1 secretion and  
342 elevated basal PYY level (Table 2). In contrast, glucose-induced GIP secretion was decreased  
343 in EGA-operated compared to sham-operated mice (Table 2).

344 *Gnat3* expression was determined in duodenum, proximal and distal jejunum, and ileum in sham-  
345 and EGA-operated mice. *Gnat3* expression in sham-operated increased in proximal jejunum,  
346 distal jejunum and ileum compared to duodenum segment (Fig. 6A). In EGA-operated, *Gnat3*  
347 expression also increased in proximal jejunum and in ileum compared to duodenum segment  
348 (Fig. 6A).

349 We therefore compared the intestinal segments which are the first to receive the alimentary  
350 bolus, i.e. the duodenum and proximal jejunum of sham- and the distal jejunum and ileum of  
351 EGA-operated mice. After metabolic improvement, *Gnat3* expression was increased 3-fold in  
352 the distal jejunum of EGA-operated mice compared to the duodenum of sham-operated mice  
353 (Fig. 6B). These results show that the EGA surgery in mice restores *Gnat3* expression in the  
354 new alimentary tract of the gut which subsequently improves the glucose-induced GLP-1  
355 secretion.

356  
357 **A diet-induced dysbiotic intestinal microbiota does not directly modify the intestinal**  
358 ***Gnat3* expression**

359 In order to determine if changes in the expression of sweet taste  $\alpha$  G protein in the gut are  
360 dependent of microbiota composition, we performed fecal microbiota transfer (FMT) from  
361 donor mice fed 12 weeks with HFD-HF diet or CD to young recipient mice at weaning and then  
362 fed 3 and 12 weeks with a HFD-HF (Fig. 7A). We chose to transfer the fecal microbiota at  
363 weaning period when the gut microbiota is not well established in recipient mice, to facilitate  
364 the transferred microbiota implantation (21). The fecal microbiota and the inoculum of donor  
365 mice either fed CD or fed HFD-HF were sequenced and analyzed. The principal coordinate  
366 analysis showed that overall, HFD-HF microbiota and inoculum were statistically different in  
367 terms of composition from CD microbiota and inoculum (Fig. 7B). The analysis of fecal  
368 microbiota from CD recipient mice (MRCD) and from HFD-HF recipient mice (MRHF-HF) were  
369 statistically different 3 and 12 weeks after the FMT despite an overlap at 3 weeks, indicating  
370 differences between microbiota (Fig. 7C). Furthermore, the differences between MRCD and  
371 MRHFD-HF were increased at 12 weeks after FMT compared to 3 weeks (Fig. 7C).

372 The species analysis in CD and HFD-HF inoculum showed that the CD inoculum was  
373 characterized by a high abundance of *Bacteroides cellulosilyticus* and *Faecalibaculum*  
374 *rodentium* and that HFD-HF inoculum was characterized by a high abundance of *Lactococcus*  
375 *lactis* and *Streptococcus thermophilus* (Fig. 7D). The high abundance of *Lactococcus lactis* is  
376 mainly due to a contamination in high-fat diet (6) The relative abundance of bacteria genus  
377 showed the presence of *Akkermansia* and *Bacteroidetes* in MRCD at 3 and 12 weeks after  
378 transfer (Fig. 7E, lanes 3 and 4) but not in MRHFD-HF (Fig. 7E, lanes 7 and 8). The species  
379 analysis showed that MRCD microbiota at 3 and 12 weeks after transfer was characterized by  
380 a high abundance of *Akkermansia municipihila* whereas there were 8 species highly  
381 represented in MRHFD-HF at 12 weeks after transfer (Fig. 7F). Furthermore, at 12 weeks after  
382 FMT, *Faecalibaculum rodentium*, characteristic of the CD inoculum, and *Streptococcus*  
383 *thermophilus*, characteristic of the HFD-HD inoculum, were found in a high abundance in  
384 MRCD and in MRHFD-HF, respectively (Fig. 7F). We conclude that the transferred fecal  
385 microbiota was partly implanted in the recipient mice.

386 Despite differences in species abundance between MRCD microbiota and MRHFD-HF  
387 microbiota, we did not observe differences in body weight gain between MRCD mice and  
388 MRHFD-HF mice (Fig. 8A). As expected, the fat mass and lean mass of MRCD mice and  
389 MRHFD-HF mice increased between 3 and 12 weeks under HFD-HF but there was no  
390 difference between MRCD mice and MRHFD-HF mice (Fig. 8B and C). We next analyzed the  
391 glucose tolerance measured by the AUC of the OGTT. We showed that the MRHFD-HF mice  
392 presented a statistically significant increased glucose tolerance between 3 and 12 weeks after  
393 FMT whereas the MRCD mice did not (Fig. 8D), despite a similar increase in basal glycaemia  
394 between 3 and 12 weeks (Fig. 8E). We then measured the gene expression of *Gnat3* in the  
395 jejunal epithelial cells. We showed the *Gnat3* gene expression in MRCD and MRHFD-HF mice  
396 was similar between 3 and 12 weeks after FMT (Fig. 8F). However we observed a tendency  
397 to decrease in *Gnat3* gene expression at 3 and 12 weeks after FMT when we compared MRCD  
398 mice and HFD-HF mice. These results showed that FMT from HFD-HF mice with metabolic  
399 disorders (obesity, glucose intolerance and insulin-resistance) did not directly impact the sweet  
400 taste G protein expression.

## 401 402 **DISCUSSION**

403 In this study we demonstrated that T2D decreased the expression of the sweet taste  $\alpha$ -  
404 gustducin in EEC in individuals with severe obesity. In mice diet-induced obesity, glucose  
405 intolerance and basal hyperglycemia, the expression of different genes involved in sweet taste  
406 transduction pathway were decreased in sorted EEC, namely *Gnat3*, *Itpr3* and *Trpm5*.  
407 Interestingly, the loss of obesity and the improved glucose homeostasis after surgical intestinal  
408 modifications in mice led to the restoration of *Gnat3* expression in the new alimentary tract and  
409 improved glucose-induced GLP-1 secretion. However, metabolic disorders-induced dysbiotic  
410 microbiota did not modify the sweet taste  $\alpha$ -gustducin gene expression in mouse intestine. We  
411 showed here for the first time, that sweet taste transduction pathway in intestinal endocrine  
412 cells is a target of metabolic diseases and is associated to GLP-1 secretion improvement after  
413 metabolic rescue.

EEC are rare, scattered in the intestinal epithelium and difficult to isolate. Recently, the surface marker CD24 was successfully used to enrich EEC from jejunum of obese patients (30). Here, we adapted to mice the EEC sorting method previously described in human (30). Since the mucosa is more difficult to separate from the muscle tissue in mice, we added the CD326 marker to select the epithelial cells (18). CD24 was initially used in mice to separate stem cells that weakly express CD24 from Paneth cells and EEC that strongly express this antigenic marker (43). As expected, the CD326+/CD24+ fraction expressed *Lyz*, a Paneth cell marker and *Lgr5*, a stem cell marker, and the CD326+/CD24- fraction expressed *Apoa4*, an enterocyte marker. In the present study, we showed that EEC markers such as *Chga*, and enterohormones, such as *Gip* and *Pyy* were specifically expressed in the CD326+/CD24+ cell fraction. *Pcsk1* expression indicated that GLP-1 EECs were present in the CD326+/CD24+ cell fraction. Indeed, *Pcsk1* codes the PC1/3 pro-hormone convertase that cleaves the proglucagon into GLP-1 specifically in intestine. Although we could not exclude having selected a type of EEC, our previous study showed that enriched human EEC fraction displayed no less than 12 enterohormones (30). More strikingly, we showed here that *Gnat3* gene expression is specifically expressed in the EEC cell fraction. The sweet taste transduction pathway was first described at the level of taste buds in the tongue (29, 35). Nevertheless, the existence of this signaling pathway in the EEC was now recognized (24). Indeed,  $\alpha$ -gustducin, as well as the  $\beta$  and  $\gamma$  subunits of the gustducin G protein, the sweet taste receptors T1R2, T1R3, the phospholipase C  $\beta$ 2, and the sodium channel TRPM5 were expressed in EEC (16). In addition, expression of T1R2, T1R3 receptors and  $\alpha$ -gustducin has been described in the murine EEC line STC-1 but not in the enterocyte absorptive cell lines CaCo2-TC7, IEC-6 or FHs74Int (11).

Taste perception and food preferences were shown to be important determinants of dietary practices which in turn contribute to the development of metabolic diseases (42). Sweet taste thresholds are modified by multiple factors including genetics. Interestingly, polymorphisms of *TAS1R3* and *GNAT3* genes were associated with taste disorder (5). Mice lacking  $\alpha$ -gustducin

441 displayed a defective glucose-induced GLP-1 secretion, an abnormal insulin response to  
442 glucose and glucose intolerance (16). Furthermore, invalidation of the T1R3 receptor-mediated  
443 glucose sensing in mice resulted in a decreased GLP-1 release in response to glucose (19).  
444 Interestingly, it has been demonstrated that the gene expression of T1R2 and T1R3 receptors  
445 was decreased in the duodenum of diet-induced obesity in mice or in genetically obese *Ob/Ob*  
446 mice. Moreover, *Trpm5* gene expression was also decreased in obese fat-diet mice (15).  
447 Recently, Smith et al, suggested that sweet taste receptors have evolved to modulate glucose  
448 absorption via the regulation of its transport and to prevent the development of exacerbated  
449 hyperglycemia due to the ingestion of high levels of sugars (38). Here we analyzed the gene  
450 expression of the sweet taste transduction pathway in metabolic diseases in human EEC. We  
451 showed that T2D decreased expression of *GNAT3* and increased expression of *ITPR3* in EEC  
452 in obese individuals. These results highlighted the alteration of the intestinal sweet taste  
453 signaling pathway in individuals with metabolic diseases for several years. Our mouse models  
454 exposed to either HFD or HFD-HF diets allowed us to analyze the sweet taste transduction  
455 pathway during the metabolic disorder onset with severity degrees. In EEC the impaired *Gnat3*  
456 expression occurred in the early stages of obesity as early as 3 weeks of HFD or HFD-HF diet,  
457 whereas decreased *Trpm5* and *Itrpr3* expression occurred after 12 weeks of diets. We  
458 concluded that in EEC the sweet taste transduction pathway was altered by obesity, glucose  
459 intolerance, and basal hyperglycemia and this alteration was aggravated by the metabolic  
460 disorder duration. However, additional basal hyperinsulinemia and insulin resistance  
461 contributing to a more severe metabolic phenotype did not aggravate the alteration of the sweet  
462 taste transduction pathway. Moreover, the down-regulation of *Gnat3* was similar regardless  
463 the high-fat diet, with or without fructose. It has been previously described an alteration of the  
464 sweet taste transduction pathway in duodenum of high-fat diet-induced obese mice or of  
465 genetically *Ob/Ob* mice (15). Together, those results suggested that obesity impairs the sweet  
466 taste transduction pathway.

467 We previously showed that obesity itself did not impact the GLP-1+, CCK+, GIP+ and PYY+  
468 cell density in obese patients when compared to non-obese patients (30). But rather T2D was



469 associated to a decreased GLP-1+ cell density and an impaired lineage in human obesity (30).  
470 Thus, in our mouse models of diet-induced obesity and insulin resistance, we could  
471 hypothesize that the EEC density was not decreased and did not contribute to *Gnat3* down-  
472 regulation, although without excluding it.

473 Bariatric surgery is associated with metabolic improvement, a rapid remission of T2D and a  
474 restoration of gut hormone release, particularly of GLP-1 which increases insulin secretion (17,  
475 37). In mice, entero-gastro-anastomosis results in weight loss, improved glucose tolerance and  
476 increased GLP-1 secretion in response to glucose (40). Here, we reported an over-expression  
477 of *Gnat3* in the most proximal segments of the intestine after EGA surgery. In this context, we  
478 compared the *Gnat3* expression in the duodenum of sham-operated mice to the distal jejunum  
479 of EGA-operated mice and the proximal jejunum of sham-operated to the ileum of EGA-  
480 operated mice because these segments were the first in contact with the flow of nutrients after  
481 surgical intestinal remodeling. The increased expression of *Gnat3*-sweet taste transduction  
482 pathway gene could contribute to the improving of GLP-1 secretion in response to glucose.  
483 The over-expression of *Gnat3* after EGA surgery was thought to be explained by intestinal  
484 remodeling. Indeed, enteroendocrine GLP-1+ cells are distributed according to an increasing  
485 proximo-distal gradient along the gut. By connecting the distal jejunum to the stomach with  
486 EGA surgery, the flow of nutrients stimulated more distal EEC, present in a greater number,  
487 that release GLP-1 via the sweet taste transduction pathway (20) although a recent study  
488 questioned this (27).

489 Metabolic diseases leading to dysbiosis of the intestinal microbiota (31), we hypothesized that  
490 dysbiotic microbiota from diet-induced obese mice would cause intestinal alteration of gene  
491 expression involved in sweet taste pathway. Our results showed that the HFD-HF FMT to  
492 recipient mice kept on HFD-HF diet (MRHFDHF) did not impact the weight gain and the basal  
493 glycaemia compared to the CD FMT (MRCD). However, we observed a higher aggravation of  
494 glucose intolerance in MRHFDHF mice than in MRCD. This could be due to the presence of  
495 *Akkermansia municipihilla* in MRCD mice which is absent in MRHFD-HF mice. Indeed,  
496 *Akkermansia municipihilla* is usually associated with a healthy metabolic status (8). However,

497 the FMT induced only a trending decrease in *Gnat3* gene expression in MRHFDHF mice. Thus,  
498 we could not conclude to an impact of intestinal microbiota on the sweet taste transduction  
499 pathway.

500 In conclusion, our data highlighted: 1/ the sweet taste transduction pathway in EECs plays  
501 pivotal role for glucose homeostasis; 2/ metabolic disorders led to deteriorate sweet taste  
502 signaling pathway in intestine contributing to impaired GLP-1 secretion; 3/ after surgical  
503 intestinal modifications, increased expression of  $\alpha$ -gustducin contributed to metabolic  
504 improvement.

505 We speculated that targeting the sweet taste transduction pathway in intestine, and in  
506 particular sweet taste receptors, could ameliorate the endogenous secretion of GLP-1 in  
507 individuals with obesity and T2D.

508  
509 **Acknowledgements.** The authors thank F. Deknuydt for EEC sorting (CytolCANplatform,  
510 ICAN) and A. Lacombe for EGA surgery procedure (PreClinICAN platform, ICAN).

511 **Author Contributions.** LLG, CR, CO, AR, PS, FA conceived and designed experiments; LLG,  
512 CR, CO, PB, CA performed experiments; LLG, CR, CO, EP, JD, FA, PS, AR, HAS analyzed  
513 data; LLG, FA, AR, PS, KC interpreted results of experiments; LLG prepared figures; LLG, AR,  
514 PS drafted manuscript; LLG, AR, PS, KC, FA edited and revised manuscript; AR, PS approved  
515 final version of manuscript.

516 **Fundings.** This work was supported by INSERM, Sorbonne University, MSDAvenir, LLG and  
517 JD received a doctoral fellowship from Sorbonne University and Fondation pour la Recherche  
518 Médicale.

519 **Competing Interests.** No potential conflict of interest relevant to this article were reported

520  
521 **References**

- 522 1. **Alili R, Belda E, Clément K, Le P, Prifti E, Zucker J-D, Wirth T.** Exploring  
523 Quantitative Metagenomics Studies using Oxford Nanopore Sequencing: A  
524 Computational and Experimental Protocol. .
- 525 2. **Amouyal C, Castel J, Guay C, Lacombe A, Denom J, Migrenne-Li S, Rouault C,  
526 Marquet F, Georgiadou E, Stylianides T, Luquet S, Le Stunff H, Scharfmann R,  
527 Clément K, Rutter GA, Taboureau O, Magnan C, Regazzi R, Andreelli F.** A  
528 surrogate of Roux-en-Y gastric bypass (the enterogastro anastomosis surgery)  
529 regulates multiple beta-cell pathways during resolution of diabetes in ob/ob mice.  
530 *EBioMedicine* 58, 2020. doi: 10.1016/j.ebiom.2020.102895.
- 531 3. **Aranias T, Grosfeld A, Poitou C, Omar AA, Le Gall M, Miquel S, Garbin K, Ribeiro  
532 A, Bouillot J-L, Bado A, Brot-Laroche E, Clément K, Leturque A, Guilmeau S,  
533 Serradas P.** Lipid-rich diet enhances L-cell density in obese subjects and in mice  
534 through improved L-cell differentiation. *J Nutr Sci* 4: e22, 2015. doi:  
535 10.1017/jns.2015.11.
- 536 4. **Aron-Wisnewsky J, Prifti E, Belda E, Ichou F, Kayser BD, Dao MC, Verger EO,  
537 Hedjazi L, Bouillot J-L, Chevallier J-M, Pons N, Le Chatelier E, Levenez F, Ehrlich  
538 SD, Dore J, Zucker J-D, Clément K.** Major microbiota dysbiosis in severe obesity: fate  
539 after bariatric surgery. *Gut* 68: 70–82, 2019. doi: 10.1136/gutjnl-2018-316103.
- 540 5. **Bae J-W, Kim U-K, Kwon T-J, Choi S-J, Ye M-K.** Polymorphisms of TAS1R3 and  
541 GNAT3 Genes Are Associated with Patients with Taste Disorder. *Journal of Life  
542 Science* 21: 412–416, 2011. doi: 10.5352/JLS.2011.21.3.412.
- 543 6. **Bisanz JE, Upadhyay V, Turnbaugh JA, Ly K, Turnbaugh PJ.** Meta-Analysis  
544 Reveals Reproducible Gut Microbiome Alterations in Response to a High-Fat Diet. *Cell  
545 Host & Microbe* 26: 265-272.e4, 2019. doi: 10.1016/j.chom.2019.06.013.
- 546 7. **Borg CM, le Roux CW, Ghatei MA, Bloom SR, Patel AG, Aylwin SJB.** Progressive  
547 rise in gut hormone levels after Roux-en-Y gastric bypass suggests gut adaptation and  
548 explains altered satiety. *British Journal of Surgery* 93: 210–215, 2006. doi:  
549 10.1002/bjs.5227.
- 550 8. **Dao MC, Everard A, Aron-Wisnewsky J, Sokolovska N, Prifti E, Verger EO, Kayser  
551 BD, Levenez F, Chilloux J, Hoyles L, Consortium M-O, Dumas M-E, Rizkalla SW,  
552 Doré J, Cani PD, Clément K.** Akkermansia muciniphila and improved metabolic health  
553 during a dietary intervention in obesity: relationship with gut microbiome richness and  
554 ecology. *Gut* 65: 426–436, 2016. doi: 10.1136/gutjnl-2014-308778.
- 555 9. **Debédât J, Sokolovska N, Coupaye M, Panunzi S, Chakaroun R, Genser L,  
556 Turenne G de, Bouillot J-L, Poitou C, Oppert J-M, Blüher M, Stumvoll M, Mingrone  
557 G, Ledoux S, Zucker J-D, Clément K, Aron-Wisnewsky J.** Long-term Relapse of  
558 Type 2 Diabetes After Roux-en-Y Gastric Bypass: Prediction and Clinical Relevance.  
559 *Diabetes Care* 41: 2086–2095, 2018. doi: 10.2337/dc18-0567.
- 560 10. **Depoortere I.** Taste receptors of the gut: emerging roles in health and disease. *Gut* 63:  
561 179–190, 2014. doi: 10.1136/gutjnl-2013-305112.
- 562 11. **Dyer J, Salmon KSH, Zibrik L, Shirazi-Beechey SP.** Expression of sweet taste  
563 receptors of the T1R family in the intestinal tract and enteroendocrine cells. *Biochemical  
564 Society Transactions* 33: 302–305, 2005. doi: 10.1042/BST0330302.

- 565  
566  
567  
568  
569
12. **Geraedts MCP, Takahashi T, Vignes S, Markwardt ML, Nkobena A, Cockerham RE, Hajnal A, Dotson CD, Rizzo MA, Munger SD.** Transformation of postingestive glucose responses after deletion of sweet taste receptor subunits or gastric bypass surgery. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 303: E464–E474, 2012. doi: 10.1152/ajpendo.00163.2012.
- 570  
571  
572  
573
13. **Gerspach AC, Steinert RE, Schönenberger L, Graber-Maier A, Beglinger C.** The role of the gut sweet taste receptor in regulating GLP-1, PYY, and CCK release in humans. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 301: E317–E325, 2011. doi: 10.1152/ajpendo.00077.2011.
- 574  
575  
576  
577
14. **Harvey EJ, Arroyo K, Korner J, Inabnet WB.** Hormone Changes Affecting Energy Homeostasis after Metabolic Surgery. *Mount Sinai Journal of Medicine: A Journal of Translational and Personalized Medicine* 77: 446–465, 2010. doi: <https://doi.org/10.1002/msj.20203>.
- 578  
579  
580  
581
15. **Herrera Moro Chao D, Argmann C, Van Eijk M, Boot RG, Ottenhoff R, Van Roomen C, Foppen E, Siljee JE, Unmehopa UA, Kalsbeek A, Aerts JMFG.** Impact of obesity on taste receptor expression in extra-oral tissues: emphasis on hypothalamus and brainstem. *Sci Rep* 6, 2016. doi: 10.1038/srep29094.
- 582  
583  
584  
585
16. **Jang H-J, Kokrashvili Z, Theodorakis MJ, Carlson OD, Kim B-J, Zhou J, Kim HH, Xu X, Chan SL, Juhaszova M, Bernier M, Mosinger B, Margolskee RF, Egan JM.** Gut-expressed gustducin and taste receptors regulate secretion of glucagon-like peptide-1. *PNAS* 104: 15069–15074, 2007. doi: 10.1073/pnas.0706890104.
- 586  
587  
588
17. **Jirapinyo P, Jin DX, Qazi T, Mishra N, Thompson CC.** A Meta-Analysis of GLP-1 After Roux-En-Y Gastric Bypass: Impact of Surgical Technique and Measurement Strategy. *OBES SURG* 28: 615–626, 2018. doi: 10.1007/s11695-017-2913-1.
- 589  
590  
591
18. **Kawasaki H, Yoshida T, Horiguchi K, Ohama T, Sato K.** Characterization of anoikis-resistant cells in mouse colonic epithelium. *J Vet Med Sci* 75: 1173–1180, 2013. doi: 10.1292/jvms.13-0005.
- 592  
593  
594
19. **Kokrashvili Z, Mosinger B, Margolskee RF.** T1r3 and  $\alpha$ -Gustducin in Gut Regulate Secretion of Glucagon-like Peptide-1. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1170: 91–94, 2009. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2009.04485.x>.
- 595  
596  
597  
598
20. **Larraufie P, Roberts GP, McGavigan AK, Kay RG, Li J, Leiter A, Melvin A, Biggs EK, Ravn P, Davy K, Hornigold DC, Yeo GSH, Hardwick RH, Reimann F, Gribble FM.** Important Role of the GLP-1 Axis for Glucose Homeostasis after Bariatric Surgery. *Cell Rep* 26: 1399-1408.e6, 2019. doi: 10.1016/j.celrep.2019.01.047.
- 599  
600  
601  
602
21. **Le Roy T, Debédât J, Marquet F, Da-Cunha C, Ichou F, Guerre-Millo M, Kapel N, Aron-Wisnewsky J, Clément K.** Comparative Evaluation of Microbiota Engraftment Following Fecal Microbiota Transfer in Mice Models: Age, Kinetic and Microbial Status Matter. *Front Microbiol* 9, 2019. doi: 10.3389/fmicb.2018.03289.
- 603  
604  
605
22. **Lu H, Giordano F, Ning Z.** Oxford Nanopore MinION Sequencing and Genome Assembly. *Genomics Proteomics Bioinformatics* 14: 265–279, 2016. doi: 10.1016/j.gpb.2016.05.004.
- 606  
607  
608
23. **Madsbad S, Holst JJ.** GLP-1 as a Mediator in the Remission of Type 2 Diabetes After Gastric Bypass and Sleeve Gastrectomy Surgery. *Diabetes* 63: 3172–3174, 2014. doi: 10.2337/db14-0935.

- 609 24. **Margolskee RF, Dyer J, Kokrashvili Z, Salmon KSH, Ilegems E, Daly K, Maillet EL,**  
610 **Ninomiya Y, Mosinger B, Shirazi-Beechey SP.** T1R3 and gustducin in gut sense  
611 sugars to regulate expression of Na<sup>+</sup>-glucose cotransporter 1. *PNAS* 104: 15075–  
612 15080, 2007. doi: 10.1073/pnas.0706678104.
- 613 25. **Meier JJ, Nauck MA.** Incretins and the development of type 2 diabetes. *Curr Diab Rep*  
614 6: 194–201, 2006. doi: 10.1007/s11892-006-0034-7.
- 615 26. **Mingrone G, Panunzi S, De Gaetano A, Guidone C, Iaiconelli A, Capristo E,**  
616 **Chamseddine G, Bornstein SR, Rubino F.** Metabolic surgery versus conventional  
617 medical therapy in patients with type 2 diabetes: 10-year follow-up of an open-label,  
618 single-centre, randomised controlled trial. *Lancet* 397: 293–304, 2021. doi:  
619 10.1016/S0140-6736(20)32649-0.
- 620 27. **Miras AD, Kamocka A, Pérez-Pevida B, Purkayastha S, Moorthy K, Patel A, Chahal**  
621 **H, Frost G, Bassett P, Castagnetto-Gissey L, Coppin L, Jackson N, Umpleby AM,**  
622 **Bloom SR, Tan T, Ahmed AR, Rubino F.** The Effect of Standard Versus Longer  
623 Intestinal Bypass on GLP-1 Regulation and Glucose Metabolism in Patients With Type  
624 2 Diabetes Undergoing Roux-en-Y Gastric Bypass: The Long-Limb Study. .
- 625 28. **Nauck M, Stöckmann F, Ebert R, Creutzfeldt W.** Reduced incretin effect in Type 2  
626 (non-insulin-dependent) diabetes. *Diabetologia* 29: 46–52, 1986. doi:  
627 10.1007/BF02427280.
- 628 29. **Nelson G, Hoon MA, Chandrashekar J, Zhang Y, Ryba NJP, Zuker CS.** Mammalian  
629 Sweet Taste Receptors. *Cell* 106: 381–390, 2001. doi: 10.1016/S0092-8674(01)00451-  
630 2.
- 631 30. **Osinski C, Le Gléau L, Poitou C, de Toro-Martin J, Genser L, Fradet M, Soula HA,**  
632 **Leturque A, Blugeon C, Jourdain L, Hubert EL, Clément K, Serradas P, Ribeiro A.**  
633 Type 2 diabetes is associated with impaired jejunal enteroendocrine GLP-1 cell lineage  
634 in human obesity. *Int J Obes (Lond)* 45: 170–183, 2021. doi: 10.1038/s41366-020-  
635 00694-1.
- 636 31. **Pascale A, Marchesi N, Marelli C, Coppola A, Luzzi L, Govoni S, Giustina A,**  
637 **Gazzaruso C.** Microbiota and metabolic diseases. *Endocrine* 61: 357–371, 2018. doi:  
638 10.1007/s12020-018-1605-5.
- 639 32. **Paternoster S, Falasca M.** Dissecting the Physiology and Pathophysiology of  
640 Glucagon-Like Peptide-1. *Front Endocrinol* 9, 2018. doi: 10.3389/fendo.2018.00584.
- 641 33. **Peterli R, Steinert RE, Woelnerhanssen B, Peters T, Christoffel-Courtin C, Gass M,**  
642 **Kern B, von Fluee M, Beglinger C.** Metabolic and Hormonal Changes After  
643 Laparoscopic Roux-en-Y Gastric Bypass and Sleeve Gastrectomy: a Randomized,  
644 Prospective Trial. *OBES SURG* 22: 740–748, 2012. doi: 10.1007/s11695-012-0622-3.
- 645 34. **Ren X, Zhou L, Terwilliger R, Newton S, De Araujo IE.** Sweet taste signaling  
646 functions as a hypothalamic glucose sensor. *Front Integr Neurosci* 3, 2009. doi:  
647 10.3389/neuro.07.012.2009.
- 648 35. **Roper SD.** Taste buds as peripheral chemosensory processors. *Seminars in Cell &*  
649 *Developmental Biology* 24: 71–79, 2013. doi: 10.1016/j.semcd.2012.12.002.
- 650 36. **Rozengurt N, Wu SV, Chen MC, Huang C, Sternini C, Rozengurt E.** Colocalization of  
651 the  $\alpha$ -subunit of gustducin with PYY and GLP-1 in L cells of human colon. *American*

- 652 *Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 291: G792–G802, 2006.  
653 doi: 10.1152/ajpgi.00074.2006.
- 654 37. **Sjöström L.** Review of the key results from the Swedish Obese Subjects (SOS) trial – a  
655 prospective controlled intervention study of bariatric surgery. *Journal of Internal*  
656 *Medicine* 273: 219–234, 2013. doi: <https://doi.org/10.1111/joim.12012>.
- 657 38. **Smith K, Karimian Azari E, LaMoia TE, Hussain T, Vargova V, Karolyi K, Veldhuis**  
658 **PP, Arnoletti JP, de la Fuente SG, Pratley RE, Osborne TF, Kyriazis GA.** T1R2  
659 receptor-mediated glucose sensing in the upper intestine potentiates glucose  
660 absorption through activation of local regulatory pathways. *Molecular Metabolism* 17:  
661 98–111, 2018. doi: 10.1016/j.molmet.2018.08.009.
- 662 39. **Steinert RE, Gerspach AC, Gutmann H, Asarian L, Drewe J, Beglinger C.** The  
663 functional involvement of gut-expressed sweet taste receptors in glucose-stimulated  
664 secretion of glucagon-like peptide-1 (GLP-1) and peptide YY (PYY). *Clinical Nutrition*  
665 30: 524–532, 2011. doi: 10.1016/j.clnu.2011.01.007.
- 666 40. **Troy S, Soty M, Ribeiro L, Laval L, Migrenne S, Fioramonti X, Pillot B, Fauveau V,**  
667 **Aubert R, Viollet B, Foretz M, Leclerc J, Duchamp A, Zitoun C, Thorens B,**  
668 **Magnan C, Mithieux G, Andreelli F.** Intestinal Gluconeogenesis Is a Key Factor for  
669 Early Metabolic Changes after Gastric Bypass but Not after Gastric Lap-Band in Mice.  
670 *Cell Metabolism* 8: 201–211, 2008. doi: 10.1016/j.cmet.2008.08.008.
- 671 41. **Verbist B, Adriaensen E, Keersmaekers V, Putri D, Crabbe M, Derks M,**  
672 **Bagdziunas R, Laenen G, De Wolf H.** Analyzing magnetic bead QuantiGene® Plex  
673 2.0 gene expression data in high throughput mode using QGprofiler. *BMC*  
674 *Bioinformatics* 20: 378, 2019. doi: 10.1186/s12859-019-2975-2.
- 675 42. **Wasalathanthri S, Hettiarachchi P, Prathapan S.** Sweet taste sensitivity in pre-  
676 diabetics, diabetics and normoglycemic controls: a comparative cross sectional study.  
677 *BMC Endocrine Disorders* 14: 67, 2014. doi: 10.1186/1472-6823-14-67.
- 678 43. **Wong VWY, Stange DE, Page ME, Buczacki S, Wabik A, Itami S, van de Wetering**  
679 **M, Poulosom R, Wright NA, Trotter MWB, Watt FM, Winton DJ, Clevers H, Jensen**  
680 **KB.** Lrig1 controls intestinal stem-cell homeostasis by negative regulation of ErbB  
681 signalling. *Nat Cell Biol* 14: 401–408, 2012. doi: 10.1038/ncb2464.
- 682 44. **Young LA, Buse JB.** GLP-1 receptor agonists and basal insulin in type 2 diabetes.  
683 *Lancet* 384: 2180–2181, 2014. doi: 10.1016/S0140-6736(14)61409-4.
- 684 45. **Young RL.** Sensing via Intestinal Sweet Taste Pathways. *Front Neurosci* 5, 2011. doi:  
685 10.3389/fnins.2011.00023.

686  
687

688

Table 1. RT-qPCR primer sequences

	Gene	Forward primer	Reverse primer
Murine primers	<i>Rplp0</i>	AATCAGCCAGAAGGTCCAAA	CGCAAATGCAGATGGATC
	<i>Gnat3</i>	AATCAGCCAGAAGGTCCAAA	TTTCCCAGATTCACCTGCTC
Human primers	cyclophilin	GCCTTAGCTACAGGAGAGAA	TTTCCTCCTGTGCCATCTC
	<i>GNAT3</i>	AGCGAGATGCAAGAACCGTA	CATTCTTATGGATGATCTTCATTTGT

689

Table 2. Plasma hormone concentrations during OGTT in sham- and EGA-operated mice.

[pg/mL]	Time (min)	0	15	30	60
Insulin	sham	2 709 ± 393	6 748 ± 852 *	3 578 ± 385	2 813 ± 524
	EGA	639 ± 128 #	3 197 ± 587 **	813 ± 119#	533 ± 117#
C-peptide	sham	1 763 ± 203	3 382 ± 436 *	2 282 ± 276	1 459 ± 151
	EGA	669 ± 74#	1 969 ± 285 **	721 ± 90#	565 ± 94 #
Glucagon	sham	26 ± 4	37 ± 6	30 ± 4	22 ± 4
	EGA	38 ± 4#	39 ± 3	44 ± 9	42 ± 5#
Leptin	sham	17 870 ± 8 791	16 129 ± 5 614	13 258 ± 2 979	11 856 ± 3 064
	EGA	757 ± 229#	786 ± 359#	1069 ± 405#	705 ± 238#
GLP-1	sham	Not detectable	Not detectable	Not detectable	Not detectable
	EGA	70 ± 9	92 ± 10	117 ± 17*	91 ± 17
GIP	sham	920 ± 282	2 026 ± 562	1 508 ± 353	1 020 ± 220
	EGA	370 ± 104	1 431 ± 381 *	549 ± 125#	361 ± 100#
PYY	sham	74 ± 7	138 ± 12 *	103 ± 7 *	72 ± 10
	EGA	598 ± 198#	674 ± 143#	982 ± 311#	846 ± 297#

691 OGTT was performed at 0, 15, 30 and 60 minutes after glucose gavage in sham (n= 14) and  
692 EGA (n=13) mice. \*: p<0.05 compared to 0 min for each group. # p<0.05 in EGA-operated mice  
693 compared to sham-operated mice at the same time point.



695 **FIGURE LEGENDS**

696 **Fig. 1. Sweet taste gene expression in human EEC from obese patients with or without**

697 **T2D.** A: Expression of genes involved in sweet taste transduction and glucose transporters in  
698 EEC from jejunum of obese individuals with (ObD, n=13) or without type 2 diabetes (Ob, n=14):  
699 *TAS1R3*, *GNAT3*, *ITPR3*, *PLCB2*, *CACNA1A*, *SCN2A* and *TRPM5* which code for taste  
700 receptor type 1 member 3,  $\alpha$ -gustducin subunit, inositol trisphosphate receptor,  
701 phosphatidylinositol bisphosphate phosphodiesterase  $\beta$ 2, a voltage-dependent calcium  
702 channel and 2 voltage-dependent sodium channel respectively, and *SLC2A2* and *SLC2A5*  
703 which code for GLUT2 and GLUT5, respectively. B: Correlation of *GNAT3* expression by RT-  
704 qPCR and RNAseq in human EEC of Ob (n=11) and ObD (n=11) subjects. \* : p <0.05 and \*\*\*\*:  
705 p<0.0001

706  
707 **Fig. 2. Set up of diet-induced metabolic disorders in mouse model.** A: Body weight is

708 measured weekly for each group of mice fed with diets: CD (black, n=75), HFD (light grey,  
709 n=15) and HFD-HF (dark grey, n=75). B: The lean mass and C: The fat mass determined after  
710 3 and 12 weeks of CD (n=10), HFD (n=10) and HFD-HF (n=10) diet by nuclear magnetic  
711 resonance. D: Fasting plasma triglycerides of mice fed 3 or 12 weeks with CD (n=13), HFD  
712 (n=5), HFD-HF (n=13). E: Area under the curve (AUC) during OGTT. Curves of OGTT after 3  
713 weeks (F) and 12 weeks (G) of diets. H: Fasting blood glucose and I: Fasting plasma insulin  
714 before OGTT. J: Homeostasis Assessment of insulin resistance (HOMA-IR). OGTT was  
715 performed after fasting overnight with 2g/kg of glucose on mice fed 3 weeks with CD (n=20),  
716 HFD (n=10) and HFD-HF (n=20) and on mice fed 12 weeks with CD (n=18), HFD (n=10) and  
717 HFD-HF (n=18). K: Insulin tolerance test (ITT) after 12 weeks of diets. L: Decrease of glycemia  
718 during the 10 first minutes of ITT. ITT was performed after 6h fasting with 1U/kg of insulin on  
719 mice fed 12 weeks with CD (n=10), HFD (n=10) and HFD-HF (n=10). \* : p <0.05 ; \*\* : p < 0.01  
720 ; \*\*\* : p < 0.001 and \*\*\*\*: p<0.0001

721  
722 **Fig. 3. EEC enrichment cell fraction from mouse jejunum.** A: Gating strategy for cell sorting

723 by FACS with Propidium iodide, CD45, CD326 and CD24 markers. Gene expression analysis  
724 of Chromogranin A (*Chga*). B: Glucose-dependent insulin releasing polypeptide (*Gip*) C),  
725 Peptide tyrosine tyrosine (*Pyy*) (D), Prohormone convertase 1 (*Pcsk1*) (E), Lysozyme (*Lyz*)  
726 (F), Leucine-rich repeat-containing G-protein coupled receptor 5 (*Lgr5*) (G), Apolipoprotein A-  
727 IV (*Apoa4*) (H) and  $\alpha$ -Gustducin (*Gnat3*) (I) in different isolated cell types using Quantigene  
728 plex assay. CD45+ cells (white) are mostly composed by immune cells (n=24), CD24- cells  
729 (light grey) are mostly composed by enterocytes (n=24) and CD24+ cells (dark grey) are mostly  
730 composed by EECs (n=22). \* : p < 0.05 ; \*\* : p < 0.01 ; \*\*\* : p < 0.001 and \*\*\*\*: p < 0.0001

731  
732 **Fig. 4. Expression of genes involved in sweet taste transduction and in glucose**  
733 **absorption in mouse EEC.** A:  $\alpha$ -gustducin (*Gnat3*), B: inositol trisphosphate receptor (*Itpr3*),  
734 C: phosphatidylinositol bisphosphate phosphodiesterase  $\beta$ 2 (*Plcb2*), D: voltage-dependent  
735 calcium channel (*Cacna1a*), E: voltage-dependent sodium channel (*Scn2a*), F: voltage-  
736 dependent sodium channel (*Trpm5*), G: glucose transporter GLUT2 (*Slc2a2*), H: glucose  
737 transporter GLUT5 (*Slc2a5*). Gene expression was measured by Quantigene plex assay in  
738 EEC from mice fed CD (n= 4 at 3 weeks and n= 3 at 12 weeks), HFD (n=4 at 3 and 12 weeks)  
739 and HFD-HF (n= 3 at 3 weeks and n= 2 at 12 weeks). \* : p < 0.05 ; \*\* : p < 0.01 ; \*\*\* : p < 0.001  
740 and \*\*\*\*: p < 0.0001

741  
742 **Fig. 5. Metabolic improvement 4 weeks after mouse intestinal surgery.** A: EGA surgery  
743 schema showing the pyloric sphincter ligation, followed by an entero-gastric anastomosis  
744 allowing the exclusion of the duodenum and the proximal jejunum of the alimentary tract. B:  
745 Body weight after surgery (EGA or sham) is measured for each group: sham-operated (n=16),  
746 EGA-operated (n=14). C: The lean mass and D: The fat mass of mice determined before and  
747 4 weeks after sham and EGA surgery by nuclear magnetic resonance (n=15 sham-operated,  
748 n=14 EGA-operated). E: Area under the curve (AUC) during OGTT before and 4 weeks after  
749 sham and EGA surgery. F: Fasting blood glucose before and 4 weeks after sham and EGA  
750 surgery. Curves of OGTT before (G) and 4 weeks after (H) surgery. I: Fasting plasma insulin

751 4 weeks after surgery. J: HOMA-IR 4 weeks after surgery. OGTT and ITT were performed after  
752 6 hours of fasting with 2g/kg of glucose and with 0.5U/kg of insulin, respectively (n=13 sham-  
753 operated, n=14 EGA-operated) \* : p <0.05 ; \*\* : p< 0.01 ; \*\*\* : p < 0.001 and \*\*\*\*: p<0.0001.

754  
755 **Fig. 6. *Gnat3* gene expression in gut 4 weeks after mouse intestinal surgery.** A: *Gnat3*  
756 expression has been measured by RT-qPCR in sham- and EGA-operated mice 4 weeks after  
757 surgery in four gut fragments: (1) duodenum, (2) proximal jejunum, (3) distal jejunum and (4)  
758 ileum. Statistical differences between segments (2), (3) and (4) and segment (1) for each group  
759 and the statistical differences between sham-operated and EGA-operated for each segment  
760 are described in the table under the graph. B: *Gnat3* expression is compared between sham-  
761 operated duodenum (1) and proximal jejunum (2) and EGA-operated distal jejunum (3) and  
762 ileum (4) which are the most proximal segments after surgery. n= 16 sham-operated mice and  
763 n= 13 EGA-operated mice. \*\*\*\*: p<0.0001

764  
765 **Fig. 7. Analysis of mouse fecal microbiota after FMT.** A: Experiment design of FMT: 6  
766 weeks old male donor mice are fed 12 weeks with CD or HFD-HF and feces are collected to  
767 prepare inoculum. The inoculum is used to transfer the fecal microbiota by gavage in 3 weeks  
768 old male recipient mice MRCD or MRHFD-HF. Recipient mice are kept on HFD-HF for 12  
769 weeks. Analyses were made 3 and 12 weeks after FMT. B: Principal component analysis of  
770 donor mice fecal microbiota from mice fed CD (n= 4) and HFD-HF (n=2) and inoculum solution  
771 composed of pooled feces from CD (n=2) or HFD-HF (n=2) C: Principal component analysis  
772 of recipient mice microbiota 3 and 12 weeks after microbiota transfer from CD (n=6 and n=5,  
773 respectively) and from HFD-HF (n=6 and n=7, respectively). D: Abundance of *Bacteroides*  
774 *cellulosilyticus*, *Lactococcus lactis*, *Faelibaculum rodentium* and *Streptococcus thermophilis* in  
775 the inoculum from CD and HFD-HF fed mice. Abundance is represented by the  
776 reads/rarefaction threshold. E: Genus abundance in donor mice, inoculum and recipient mice  
777 3 and 12 weeks after FMT. F: Magnitude difference of species expression in recipient mice  
778 according to microbiota 3 and 12 weeks after transfer (p<0.05)

779

780

**Fig. 8. Metabolic parameters and  $\alpha$ -Gustducin expression in mice after FMT.** A: Body

781

weight is measured weekly for each group of male mice during 12 weeks after FMT in MRCD

782

mice (n= 20) and in MRHFD-FD mice (n=20). B: The lean mass and C: The fat mass of mice

783

determined by nuclear magnetic resonance 3 and 12 weeks after the FMT. MRCD (n=6 and

784

n=5, respectively) and MRHFD-HF (n=6 and n=7, respectively). D: Area under the curve (AUC)

785

during OGTT 3 and 12 weeks after FMT. E: Fasting glycemia before OGTT. OGTT was

786

performed after fasting overnight with 2g/kg of glucose on 5 MRCD mice and 5 MRHFD-HF

787

mice at 3 weeks and 5 MRCD and 5 MRHFD-HF at 12 weeks. F: *Gnat3* gene expression

788

measured in epithelial jejunum of MRCD (n= 4 at 3 and 12 weeks after the FMT) and MRHFD-

789

HF (n=4 at 3 weeks and n= 5 at 12 weeks after the FMT). \* : p <0.05 ; \*\* : p< 0.01 ; \*\*\* : p <

790

0.001 and \*\*\*\*: p<0.0001

791

792

793

794

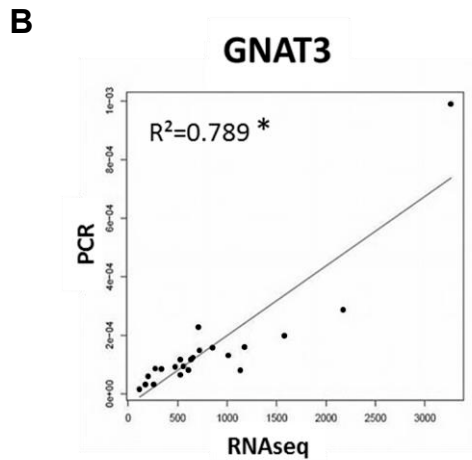
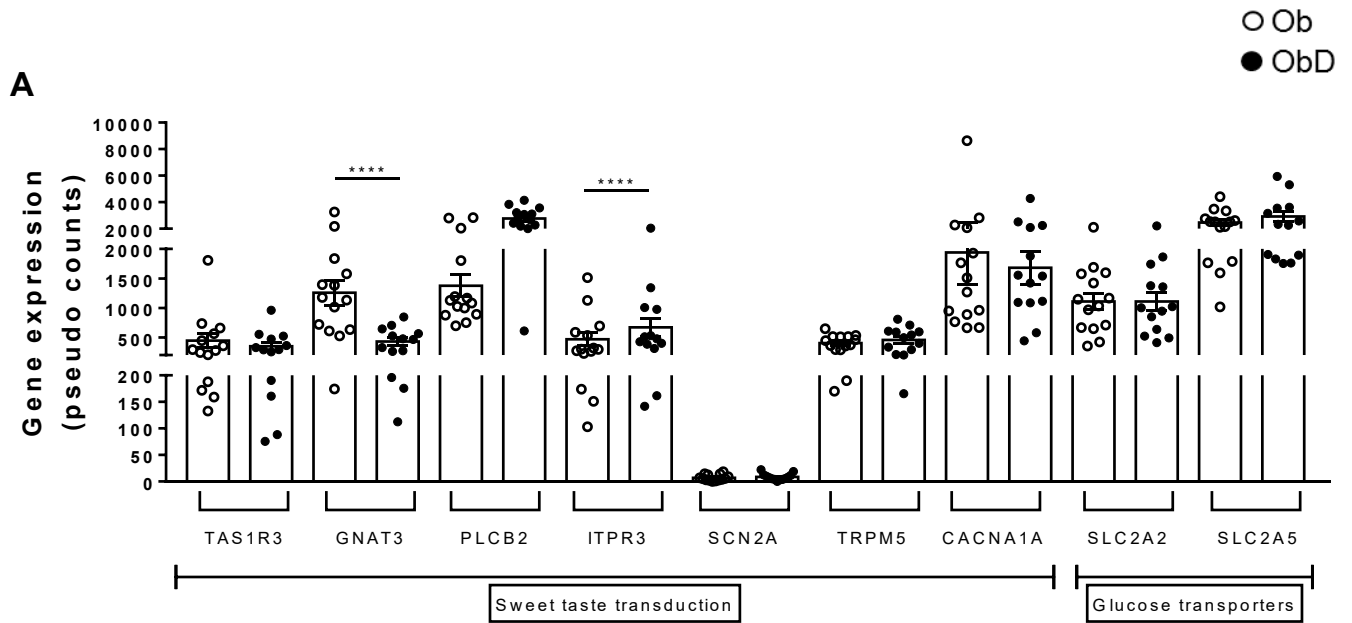


Figure 1, Le Gléau L & al

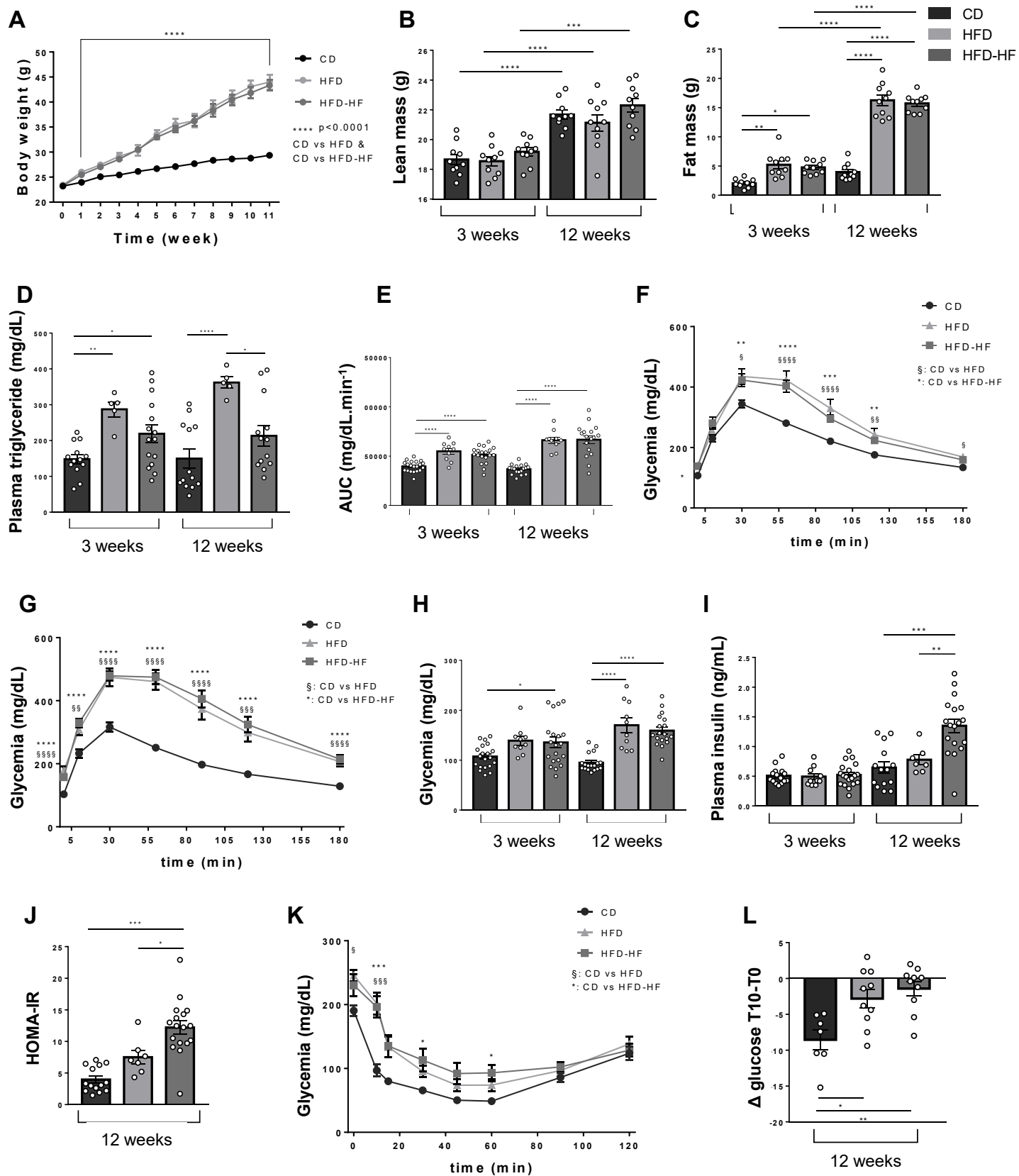
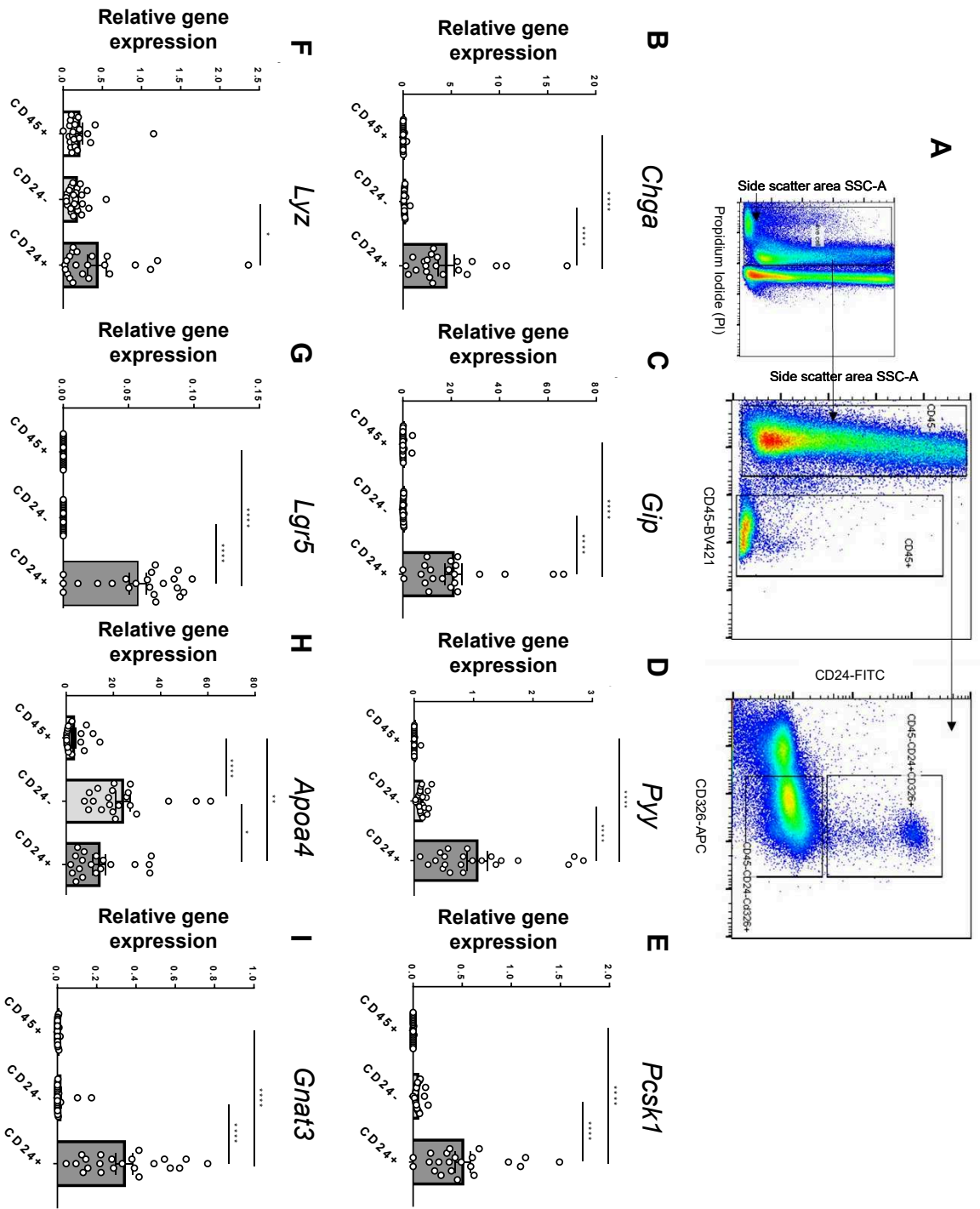
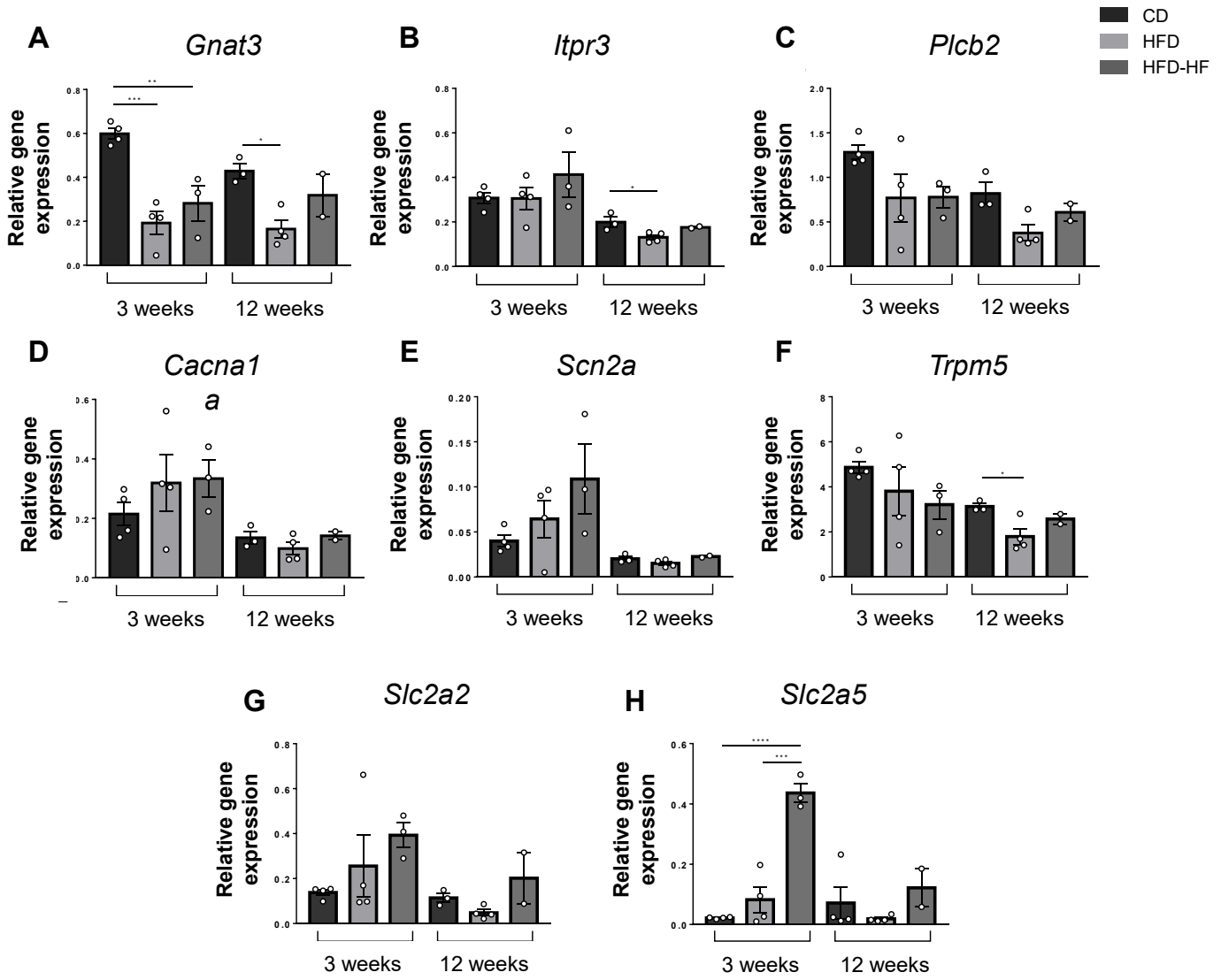


Figure 2, Le Gléau L & al



**Figure 3, Le Gléau L & al**



**Figure 4, Le Gléau L & al**



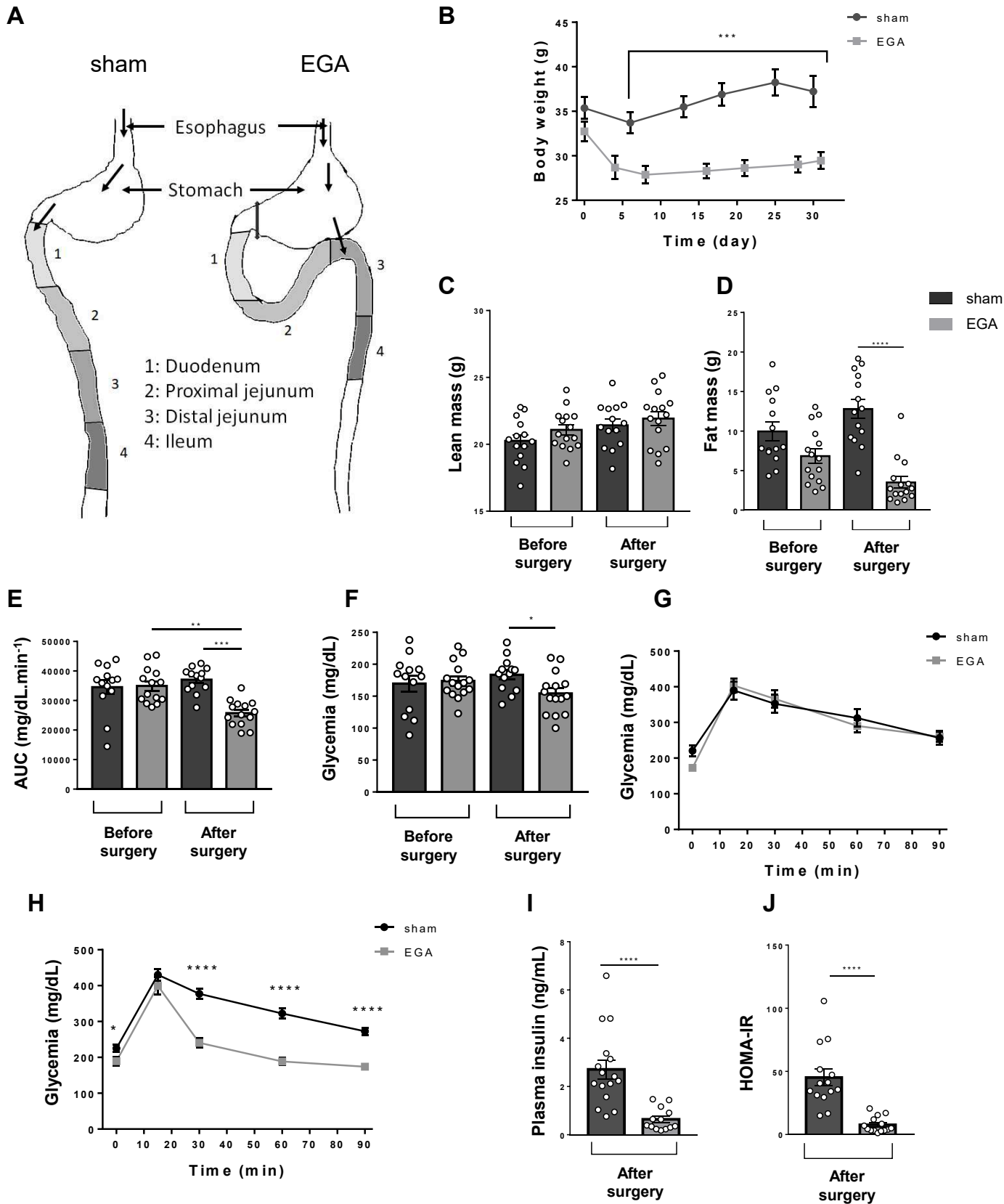
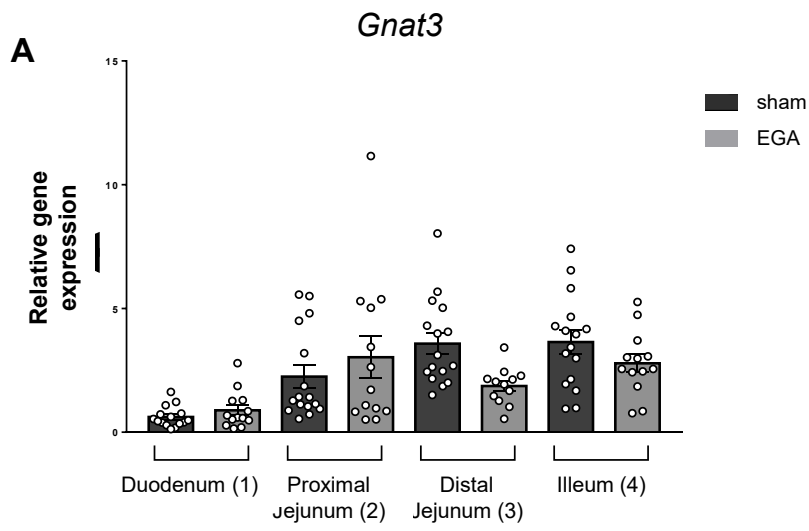
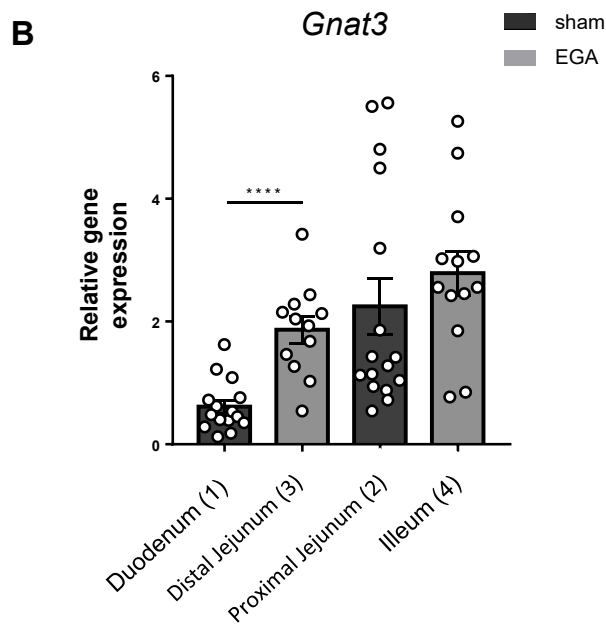


Figure 5, Le Gléau L & al



multiple comparison test	Duodenum	Proximal jejunum	Distal jejunum	Ileum
sham intestinal segments vs sham duodenum	-	*	****	****
EGA intestinal segments vs EGA duodenum	-	*	ns	*
EGA intestinal segments vs sham intestinal segments	ns	ns	**	ns



**Figure 6, Le Gléau L & al**

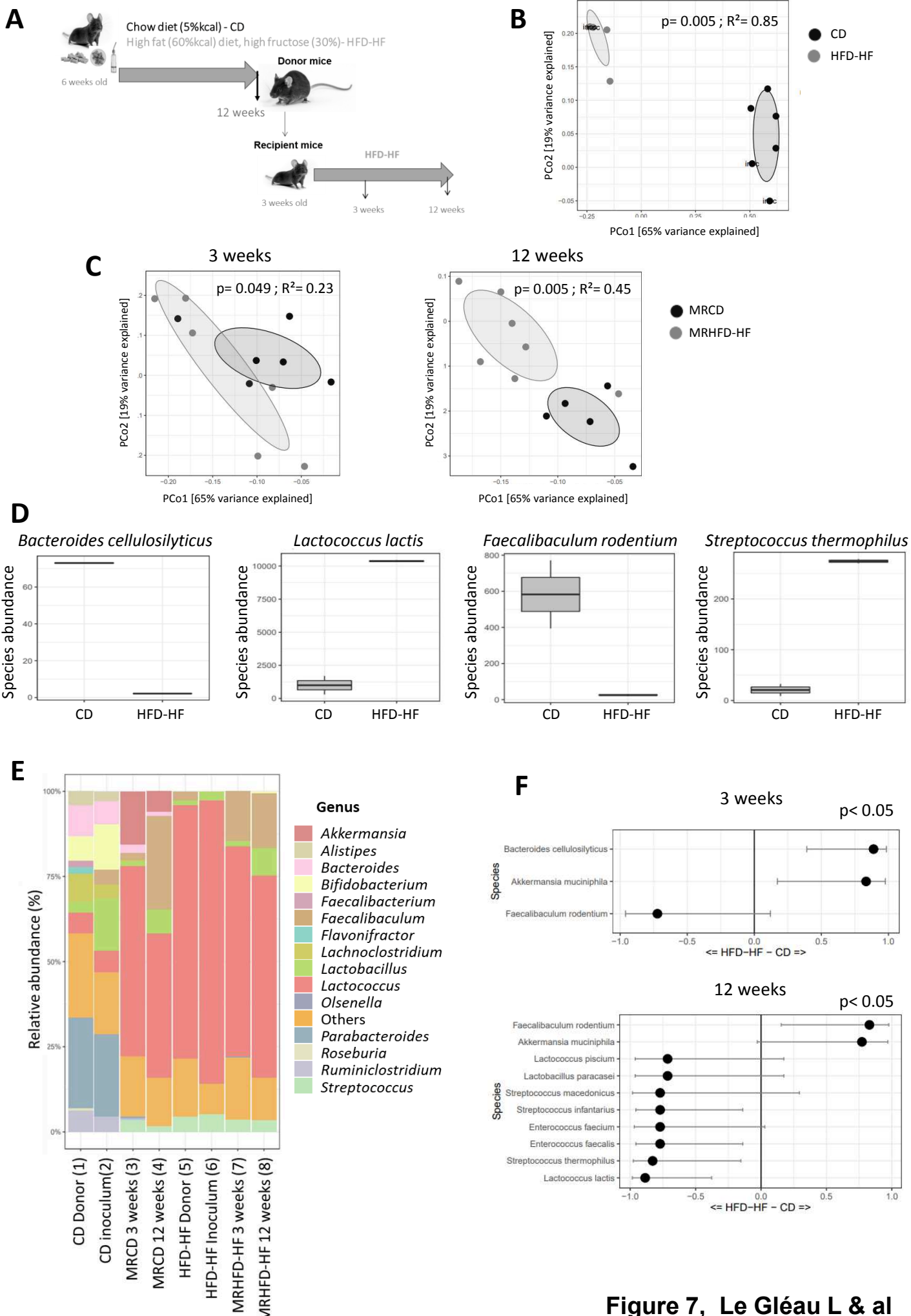


Figure 7, Le Gléau L & al

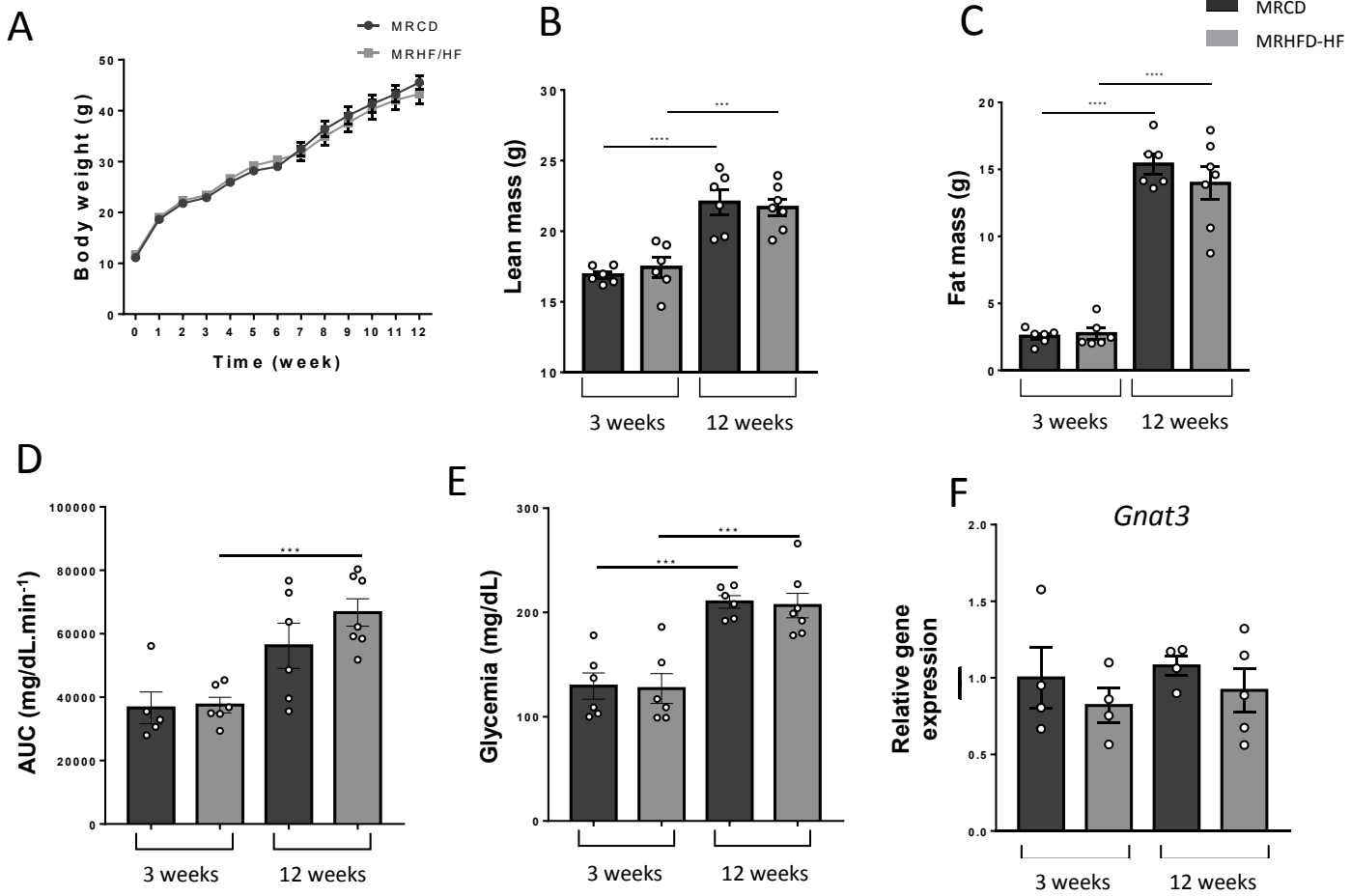


Figure 8, Le Gléau L & al

« Type 2 diabetes is associated with  
impaired jejunal enteroendocrine  
GLP-1 cell lineage in human obesity »

Céline Osinski, Léa Le Gléau, Christine Poitou, Juan de Toro-Martin, Laurent Genser, Magali Fradet, Hédi Antoine Soula, Armelle Leturque, Corrin Blugeon, Laurent Jourden, Edwige Ludiwyne Hubert, Karine Clément, Patricia Serradas et Agnès Ribeiro

Publié dans International Journal of Obesity, 2021.



Bariatric Surgery

# Type 2 diabetes is associated with impaired jejunal enteroendocrine GLP-1 cell lineage in human obesity

Céline Osinski<sup>1</sup> · Léa Le Gléau<sup>1</sup> · Christine Poitou<sup>1,2</sup> · Juan de Toro-Martin<sup>3,7</sup> · Laurent Genser<sup>1,4</sup> · Magali Fradet<sup>5,8</sup> · Hédi Antoine Soula<sup>1</sup> · Armelle Leturque<sup>1</sup> · Corinne Blugeon<sup>6</sup> · Laurent Jourden<sup>6</sup> · Edwige Ludwyne Hubert<sup>3,9</sup> · Karine Clément<sup>1,2</sup> · Patricia Serradas<sup>1</sup> · Agnès Ribeiro<sup>1</sup>

Received: 5 March 2020 / Revised: 7 September 2020 / Accepted: 26 September 2020 / Published online: 9 October 2020  
© The Author(s) 2020. This article is published with open access

## Abstract

**Objectives** Altered enteroendocrine cell (EEC) function in obesity and type 2 diabetes is not fully understood. Understanding the transcriptional program that controls EEC differentiation is important because some EEC types harbor significant therapeutic potential for type 2 diabetes.

**Methods** EEC isolation from jejunum of obese individuals with (ObD) or without (Ob) type 2 diabetes was obtained with a new method of cell sorting. EEC transcriptional profiles were established by RNA-sequencing in a first group of 14 Ob and 13 ObD individuals. EEC lineage and densities were studied in the jejunum of a second independent group of 37 Ob, 21 ObD and 22 non obese (NOB) individuals.

**Results** The RNA seq analysis revealed a distinctive transcriptomic signature and a decreased differentiation program in isolated EEC from ObD compared to Ob individuals. In the second independent group of ObD, Ob and NOB individuals a decreased GLP-1 cell lineage and GLP-1 maturation from proglucagon, were observed in ObD compared to Ob individuals. Furthermore, jejunal density of GLP-1-positive cells was significantly reduced in ObD compared to Ob individuals.

**Conclusions** These results highlight that the transcriptomic signature of EEC discriminate obese subjects according to their diabetic status. Furthermore, type 2 diabetes is associated with reduced GLP-1 cell differentiation and proglucagon maturation leading to low GLP-1-cell density in human obesity. These mechanisms could account for the decrease plasma GLP-1 observed in metabolic diseases.

## Introduction

Enterohormones, such as peptide YY (PYY), glucagon-like peptide-1 (GLP-1) cholecystokinin (CCK) and glucose-

dependent insulinotropic peptide (GIP) control food intake and energy homeostasis in healthy individuals. How they influence the development of obesity is still debated. Obese individuals present an imbalance in these plasma enterohormone [1]. Gastric bypass surgery is efficacious in reducing body weight and associated comorbidities while improving related metabolic parameters. The rise of postprandial GLP-1 secretion after Roux-en-Y gastric bypass (RYGB) may improve metabolic parameters in type 2 diabetes (T2D) individuals [2–6]. One mechanism for improving the GLP-1 secretion after RYGB is due to the arrival of the nutrient flow in a more distal region, following reshaping of the intestine after surgery [7]. Therefore, the mechanisms driving the alteration of enterohormone secretion in obesity and after RYGB might not be restricted to GLP-1 incretin effects alone [4].

The gut epithelium adapts rapidly to environmental changes with complete cell renewal every 3–5 days in humans [8]. From progenitors located in crypts, cell differentiation is

---

These authors contributed equally: Patricia Serradas, Agnès Ribeiro

Prior Presentation. Parts of these data were presented at 51<sup>st</sup> and 53<sup>rd</sup> annual meeting of the European Association for the Study of Diabetes (Diabetologia, 58 S28, 2015 and Diabetologia, 60 S91, 2017).

**Supplementary information** The online version of this article (<https://doi.org/10.1038/s41366-020-00694-1>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Patricia Serradas  
patricia.serradas\_pacheco@sorbonne-universite.fr

✉ Agnès Ribeiro  
agnes.ribeiro@sorbonne-universite.fr

Extended author information available on the last page of the article

orchestrated by a network of transcription factors with specific contributions. It was reported that Notch signaling [9] and MATH1 expression [10] drive intestinal progenitors toward the secretory lineage. Then, NGN3 transcription factor restricts cells to the endocrine lineage [11, 12]. FOXA1/FOXA2 and NEUROD1 act downstream NGN3 to commit cells into either D (somatostatin)- and L (GLP-1)-cell phenotypes or into the I (CCK)- and S (secretin)-cell phenotypes, respectively [13]. Within enteroendocrine cells (EEC), some transcription factors, such as PAX4, PAX6 and NEUROD1, trigger enterohormone gene transcription [10]. Moreover, NEUROD1 [14] and ARX [15] have also been identified as *in vivo* regulators of EEC differentiation. The recent identification of EEC lineage regulators in real-time unveils a higher complexity in the transcription factor network [16]. Transcription factors involved in EEC differentiation have distinct temporal expression profiles allowing to be classified into early and common (NGN3, SOX4, PAX4, ARX...), middle and late (PAX6, FOXA1, TRIM35...) [16]. Recent data demonstrate that an EEC can co-express more than one hormone, rendering the alphabetical classification obsolete [17–19] and a new EEC classification was proposed [20]. However, most of these data were obtained in mice. A previous study in human duodenum showed a deregulation of transcriptional factors controlling intestinal cell differentiation in morbidly obese subjects [21]. Although a transcriptomic analysis of EEC in humans has been published recently [22], data in jejunum of subjects with severe obesity and T2D have not yet been reported.

Suspecting that nutritional changes can modulate EEC differentiation and contribute to the modulation of gut hormone secretion in metabolic diseases, we previously showed a positive association between GLP-1-positive cell density in jejunum samples and fat-consumption in individuals with severe obesity [23]. Beside nutrient sensing, enterohormone secretion is dependent on nutrient absorption [20]. Within small intestine, jejunum is one of the major absorption sites. Taking advantage of jejunal samples collected during bariatric surgery, we examined the impact of obesity and T2D on human EEC using an integrated strategy combining transcriptomic profiles, cell lineage gene expression and cell density analysis.

## Subjects and methods

The study was conducted in accordance with Helsinki Declaration, received approval from the local ethics committee (CPP Ile de France I) and was registered on the [ClinicaITrials.gov](https://www.clinicaltrials.gov) website NCT01454232 and NCT02292121. Informed written consent was obtained from all individuals prior to study inclusion.

## Human individuals and jejunum sampling

This study is ancillary to previously published studies [24, 25] that included individuals with severe obesity involved in a bariatric surgery program carried out at the Pitié-Salpêtrière University Hospital, Nutrition and Visceral Surgery Departments (Paris, France). Medical history and clinical variables were recorded all patients before the gastric bypass surgery as described [25]. Patients were managed without any specific diet (ketogenic diet or other) or any change in the antidiabetic treatment just prior surgery. Patients have to be weight-stable before the intervention. Obese individuals were stratified according to their metabolic status, and two groups were constituted 1/ for EEC enrichment by FACS and transcriptomic, obese individuals without or with T2D (Ob,  $n = 14$  and ObD,  $n = 13$ , Table 1) and 2/ for jejunal epithelial study by RT-qPCR, obese individuals without or with T2D (Ob,  $n = 37$  and ObD,  $n = 21$ , Table 2). ObD individuals (fasting blood glucose  $>7$  mmol/L and/or 11.1 mmol/L 2 h after a 75 g glucose load) received antidiabetic treatments or yet untreated. Antidiabetic treatments in ObD groups are metformin and/or sulfonylurea and/or GLP-1 agonists or DDP4-inhibitors and/or insulin as described in Tables 1 and 2.

The use of a single group for all analyses was incompatible with the size of jejunum samples collected during bariatric surgery (4 cm). Indeed, EEC enrichment by FACS needs a large quantity of epithelial cells that does not allow to keep enough cells to perform RT-qPCR.

A group of non-obese individuals (NOB  $n = 22$ ; body mass index (BMI) = 22.7 kg/m<sup>2</sup> [range 17–27]) was constituted for jejunal epithelial study. Jejunal tissue from NOB individuals were jejunum biopsy donors ( $n = 3$ ) (double balloon endoscopy; normal histopathology, absence of anti-inflammatory treatment) or jejunum samples taken at distance of pancreatic or gastric tumor during duodenal resection in absence of chemotherapy or apparent metabolic consequence ( $n = 19$ ) (Table 2). Jejunum samples of NOB subjects with pancreatic or gastric tumor were collected at the same site as was performed RYGB in obese subjects, i.e., 60–70 cm distal to the ligament of Treitz as previously described [26]. We previously compared jejunum samples of Ob subjects to NOB [25, 27]. Importantly, NOB individuals with, renal- cardiac- or hepatic failure were not included in this study.

## Jejunum epithelial cells isolation

Proximal jejunal samples were collected during gastric bypass surgery and epithelial cells were prepared as previously described [27].

**Table 1** Clinical and biological baseline characteristics of non-obese (NOB), obese (Ob) and obese-diabetic (ObD) individuals.

	Individuals	NOB	Ob	ObD	<i>p</i> value		
Demographic data	<i>n</i>	22	37	21	<i>Ob/NOB</i>	<i>ObD/NOB</i>	<i>ObD/Ob</i>
	Age (years)	61.7 ± 2.01	41.2 ± 1.4	50.4 ± 1.5	8 e-10	0.014	0.002
	Sex (F/M)	7/15	31/6	11/10	0.0007		
Corpulence	BMI (Kg/m <sup>2</sup> )	22.7 ± 0.5	45.8 ± 0.9	45.6 ± 1.3	<0.0001 (NOB vs. Ob/ObD)		
	Lean mass (%)	nd	48.4 ± 0.6	43.4 ± 0.9	0.0022		
	Fat mass (%)	nd	49.3 ± 0.6	54.1 ± 0.9	0.0021		
Glucose metabolism	Glucose (mmol/L)	6.13 ± 0.26	4.99 ± 0.07	8.47 ± 0.50	0.089	5.3 e-04	3.7 e-9
	Insulin (μU/mL)	nd	18.76 ± 1.39	nd			
	HbA <sub>1c</sub> (%)	nd	5.64 ± 0.06	8.20 ± 0.24	0.0001		
	HOMA-IR	nd	4.2 ± 0.7	nd			
Lipid metabolism	Triglyceride (mmol/L)	nd	1.37 ± 0.10	2.63 ± 0.21	0.0004		
	Cholesterol (mmol/L)	nd	5.19 ± 0.14	4.49 ± 0.17	0.0334		
	HDL (mmol/L)	nd	1.17 ± 0.10	0.94 ± 0.05	0.0168		
	LDL (mmol/L)	nd	3.23 ± 0.23	2.48 ± 0.18	0.0071		
Comorbidities	T2D diabetes ( <i>n</i> )	0	0	21			
	T2D treatment (%)	0	0	90.5			
	T2D treatment ( <i>nb</i> )			2 (0–4)			
	Without treatment ( <i>n</i> )			2			
	Mono treatment ( <i>n</i> )	0	0	5			
	Combination of treatments ( <i>n</i> )			14			
	T2D duration (year)			8.74 ± 1.6 (0–35)			
	Dyslipidemia treatment (%)	0	8.1	57.1			
Hypertension (%)	22.7	27.0	80.9				

ObD patients (fasting blood glucose >7 mmol/L and/or 11.1 mmol/L 2 h after a 75 g glucose load) were treated with metformin and/or sulfonylureas and/or GLP-1 agonists and/or insulin. ObD individuals (*n* = 21) were untreated (*n* = 2), treated with monotherapy (*n* = 5), or combination therapy (*n* = 14). Among them, 52% individuals were taking DPP4-inhibitors or GLP-1 receptor agonists (*n* = 11) and 43% insulin therapy (*n* = 4). Mean ± SEM (min–max).

T2D type 2 diabetes.

### FACS for enriched enteroendocrine cell preparation

For cell sorting experiments, 100.10<sup>6</sup> intestinal epithelial cells were rinsed in FACS buffer (PBS, 3% FCS, 2 mM EDTA), blocked with Human Fc Receptor Binding Inhibitor Antibody (eBioscience) and stained with CD45-BV421 (Bio Legend) and CD24-PeCy7 (Bio Legend) antibodies. Dead cells were excluded with propidium iodide (eBiosciences). During sorting experiments, cells were placed in FACS buffer with RNase inhibitor (Life Technologies). CD24 marker was used to select EEC, and CD45 was used to get rid of immune cells, especially B cells that also expressed CD24. CD45-negative, CD24-positive EEC were sorted on a jet-in-air flow cytometer (MoFlo Astrios, Summit software, Beckman Coulter). After FACS, an EEC enriched population was obtained containing 1.3.10<sup>6</sup> cells.

The validation of the EEC sorting was performed in a limited number of independent subjects (*n* = 7). Gene expression in CD24+ cells was analyzed by RT-qPCR in

3 Ob subjects and protein expression was studied by Western Simple assay on 2 Ob and 2 ObD subjects.

### Protein analysis

Cell-sorted populations were lysed in ice-cold buffer (0.4% Triton 100X, 2 mM DTT, 5 μg/mL leupeptine, 0.4 mM PMSF). Protein homogenates (0.1 mg/mL) were analyzed by Simple Western assay (Wes<sup>TM</sup> instrument by ProteinSimple) for chromogranin A (Abcam) and actin (Novus).

### cDNA libraries and RNA sequencing

Total RNA from sorted-cells was extracted with RNAeasy Mini Plus Kit (Qiagen). RNA concentration and quality were assessed (2100 Bioanalyzer, Agilent Technologies). RIN values ranged between 6.0 and 8.2.

10 ng of total RNA were converted to cDNA using SMART-Seq v4 Ultra Low Input RNA kit (Clontech). An



**Table 2** Clinical and biological baseline characteristics of obese (Ob) and obese-diabetic (ObD) individuals.

	Individuals	Ob	ObD	<i>p</i> value
Demographic data	<i>n</i>	14	13	
	Age (years)	45.36 ± 2.17	49.69 ± 3.22	0.38
	Sex (F/M)	13/1	6/7	0.0056
Corpulence	Weight (Kg)	127.62 ± 3.76	125.05 ± 4.3	0.833
	BMI (Kg/m <sup>2</sup> )	46.47 ± 1.02	43.90 ± 1.53	0.23
	Lean mass (%)	46.45 ± 0.85	52.19 ± 1.42	0.0098
	Fat mass (%)	51.32 ± 0.87	45.41 ± 1.45	0.0098
Glucose metabolism	Glucose (mmol/L)	5.04 ± 0.12	8.18 ± 0.62	0.0011
	Insulin (μU/mL)	18.90 ± 2.53	26.20 ± 1.76 <sup>a</sup>	0.2532
	HbA <sub>1c</sub> (%)	5.64 ± 0.09	7.43 ± 0.24	1.27e-05
Lipid metabolism	Triglyceride (mmol/L)	1.48 ± 0.13	1.77 ± 0.19	0.3294
	Cholesterol (mmol/L)	4.97 ± 0.11	4.29 ± 0.17	0.0119
	Glycerol (mmol/L)	0.11 ± 0.01	0.086 ± 0.007	0.360
	Free fatty Acids (mmol/L)	0.53 ± 0.05	0.066 ± 0.07	0.283
	HDL (mmol/L)	1.21 ± 0.05	1.04 ± 0.04	0.0536
	Apo A-I (g/L)	1.45 ± 0.04	1.38 ± 0.04	0.298
	LDL (mmol/L)	3.09 ± 0.12	2.45 ± 0.17	0.0180
	Apo B (g/L)	0.94 ± 0.04	0.88 ± 0.05	0.267
Low-grade inflammation	CRP (mg/L)	7.21 ± 1.26	7.395 ± 1.36	0.940
	Orosomucoïd (mg/L)	0.92 ± 0.05	0.89 ± 0.07	0.817
	Haptoglobin (mg/L)	1.69 ± 0.172	1.65 ± 0.109	0.863
	IL-6 (pg/mL)	3.87 ± 0.31	7.24 ± 1.11	0.173
Adipokines	Leptin (ng/mL)	73.34 ± 7.89	62.31 ± 6.89	0.432
	Adiponectin (μg/mL)	4.98 ± 0.48	3.58 ± 0.298	0.086
Comorbidities	T2D treatment (%)	0	76.9	
	T2D treatments ( <i>nb</i> )		1 (0–4)	
	Without treatment ( <i>n</i> )		3	
	Mono treatment ( <i>n</i> )	0	5	
	Combination of treatments ( <i>n</i> )		5	
	T2D duration (years)		6.5 ± 1.49 (0–20)	
	Dyslipidemia (%)	78.6	84.6	
	Hypertension (%)	35.7	76.9	

ObD individuals (fasting blood glucose >7 mmol/L and/or 11.1 mmol/L 2 h after a 75 g glucose load) were treated with oral antidiabetic drugs and/or insulin and/or GLP-1 agonists.

ObD individuals (*n* = 13) were untreated (*n* = 3), treated with monotherapy (*n* = 5), or combination therapy (*n* = 5). Among them, 23% individuals were taking DPP4-inhibitors or GLP-1 receptor agonists (*n* = 3) and 31% on insulin therapy (*n* = 4).

T2D type 2 diabetes.

<sup>a</sup>Blood insulin levels in individuals not treated with exogenous insulin (*n* = 9). Mean ± SEM (min–max).

average of 150 pg of amplified cDNA was used to prepare libraries following instructions from the Nextera XT DNA kit (Illumina). Libraries were multiplexed by 28 on 2 high-output flow cells and sequenced on a NextSeq500 device (Illumina). A mean of 37 ± 8 million 75 bp reads passing Illumina quality filter reads were obtained for each of the 28 samples.

The analyses were performed using the Eoulsan pipeline [28]. Before mapping, poly N read tails were trimmed, reads

≤40 bases were removed, and reads with quality mean ≤30 were discarded. Reads were then aligned against the human genome from Ensembl version 88 using STAR (version 2.5.2b) [29]. Alignments from reads matching more than once on the reference genome were removed using Java version of samtools [30]. To compute gene expression, human GTF genome annotation version 88 from Ensembl database was used. All overlapping regions between alignments and referenced exons were counted using

HTSeq-count 0.5.3 [31]. The RNA-Seq gene expression data and raw fastq files are available on the GEO repository ([www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/)) under accession number GSE132831.

### Taqman low density arrays and RT-qPCR

Total RNA of epithelial cells was extracted with RNeasy Mini Plus Kit (Qiagen). RNA concentration and quality were assessed (2100 Bioanalyzer, Agilent Technologies). The RIN value was 7–9.5. Total RNA (1 µg) was used to generate DNA with RT High Capacity (ThermoFisher). cDNA (500 ng) was used for low-density-array (Applied Biosystem). 18 S gene was used for normalization. Quantitative real-time PCR was performed with SYBR Green PCR kits (Applied Biosystems) using Mx300p Stratagen system (Applied Biosystem). The cyclophilin gene was used for normalization. Relative quantification was determined using the  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  method.

### Immunohistochemistry for enteroendocrine cell density

Pieces of jejunum were fixed in formalin-acetic acid-alcohol before embedding in paraffin. For immunostaining (5 µm paraffin sections) primary antibodies were incubated for 1 h at room temperature (active GLP-1 7–36 amide (Peninsula), GIP (Abcam), CCK (Abcam), PYY (Peninsula)). Streptavidin Biotin Peroxidase kit (BioSpa) and DAB staining (DAKO) were used for revelation. Tissue sections were counterstained with hematoxylin. Images from all the slices ( $n = 187$ ) corresponding to overall 2073 mm<sup>2</sup> of jejunal mucosae, were acquired using a Leica DMRB microscope coupled to a Leica DFC295 camera (software Leica Qwin 500). The number of GLP-1-, GIP-, CCK- and PYY-positive cells was quantified (ImageJ 1.46) per mm<sup>2</sup> mucosae (cell densities).

### Statistical analysis

Data are expressed as mean ± standard error of the mean (SEM) unless otherwise indicated. We used R software for all statistical analysis. For all comparisons, we used a generalized linear model (GLM) with Gaussian family classification, adjusting for age, sex and BMI (age and sex only when comparing obese and non-obese individuals). The relevant *p* values were obtained using ANOVA on the full models. GLM were computed using *glmer* and ANOVA functions in *lme4* and *car* R package. To assess differential expression on semi-quantitative techniques such as RNAseq data, EdgeR (Bioconductor) package was used using negative binomial test. *P* values were adjusted using the false discovery rate (FDR) method with a threshold of

0.001. Only genes with count per million (cpm) over 100 for at least two individuals were considered.  $p < 0.05$  was considered as statistically significance.

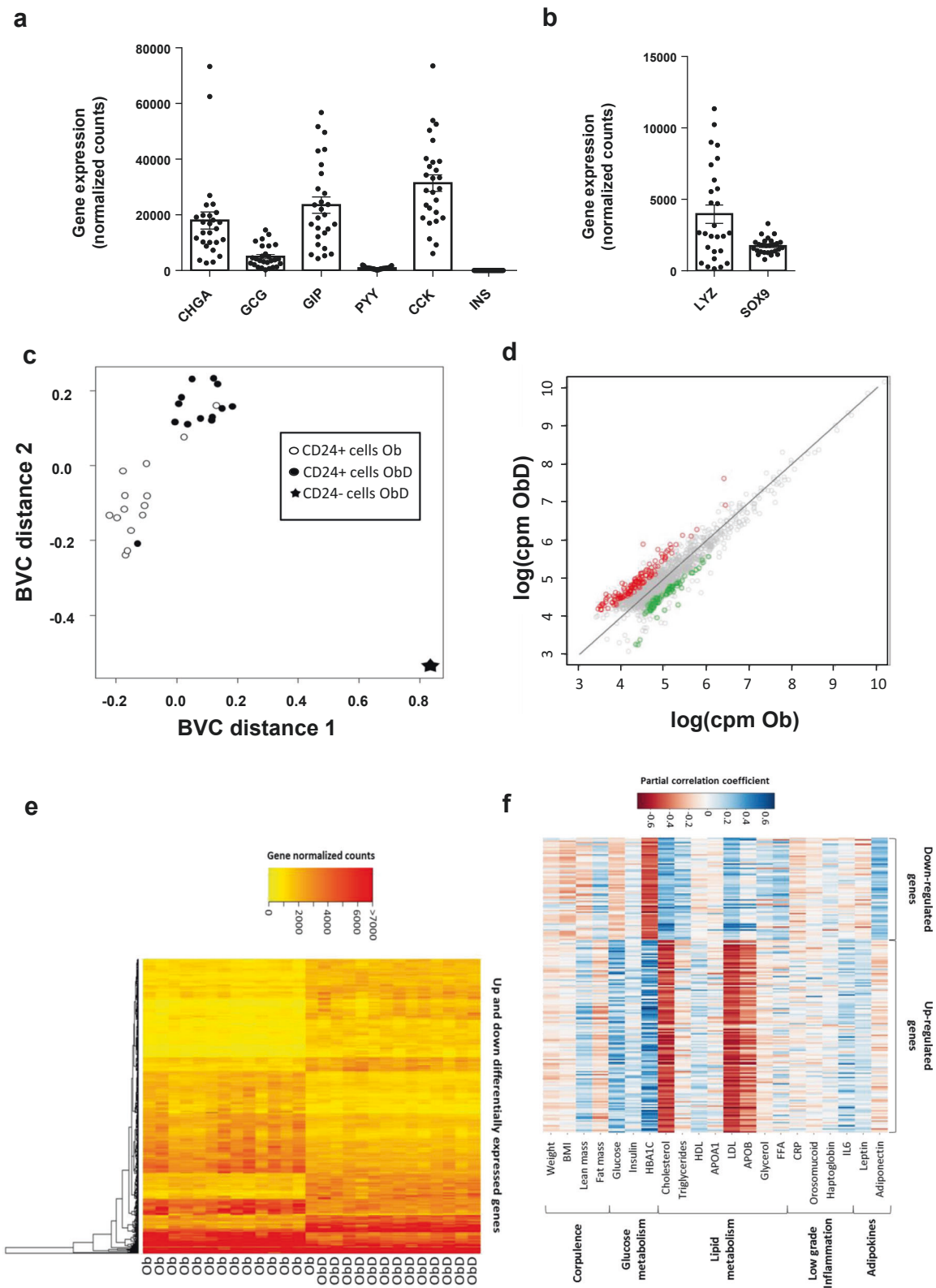
## Results

### Preparation of EEC populations from obese and obese-diabetic individuals

EEC being rare and scattered along the crypt-villus axis, we had to enrich the epithelial cell preparation in EEC using appropriate extracellular markers. Starting from total epithelial cells, CD45 marker was used to eliminate immune cells especially B cells which express CD24 marker. CD24 previously described in [32] was used to sort mostly EEC with also Paneth cells and stem cells (Supplementary Fig. 1a). This strategy of cell enrichment developed for human jejunum gives access to EEC with intact RNA (Supplementary Fig. 1b). To validate this new method of cell sorting, studies on CD45- CD24+ cells of seven independent subjects were carried out. A 50-fold EEC enrichment was obtained by measuring gene expression of specific markers of EEC, namely chromogranin A (CHGA) and proglucagon (GCG) in 3 Ob subjects (Supplementary Fig. 1c). By Simple Western assay, we confirmed the EEC enrichment showing the specific presence of CHGA in the CD24+ fraction, and its absence in the CD24- fraction in 4 subjects, 2 with T2D and 2 without (Supplementary Fig. 1d).

### Altered jejunal EEC transcriptomic profiles in obese individuals are associated with T2D

EEC enrichment from 14 severely obese individuals without T2D (Ob) and 13 with T2D (ObD) (Table 1) was performed as previously described. RNAseq profiles of enriched EEC were determined (accession number GSE132831). For a single subject, the expression of genes of non-enteroendocrine CD24- and enteroendocrine CD24+ cells was analyzed (Supplementary Fig. 2). We showed that in CD24+ cells, the expression of enteroendocrine markers, CHGA, GCG, GIP CCK and PYY are overexpressed by 24-, 37-, 17-, 262- and 89-fold change, respectively. As expected, EEC and Paneth cell markers were expressed (Fig. 1a, b). The multidimensional scaling analysis showed that CD24+ EEC transcriptomic profiles are fully separated from that of CD24- cells (Fig. 1c). Furthermore, CD24+ EEC transcriptomic profiles from Ob subjects are well separated from ObD subjects (Fig. 1c). Differentially expressed genes in EEC from ObD vs. Ob individuals were shown in Fig. 1d, in which 128 upregulated genes and 68 downregulated genes with a FDR < 0.001 were indicated. The hierarchical clustering of these 196 differentially



expressed genes further highlighted a clear distinction between ObD and Ob samples (Fig. 1e). Furthermore, partial correlation analyses showed that clinical parameters

discriminate the down- and up-regulated genes in EEC (Fig. 1f). Thus, up- and downregulated genes, which are positively correlated with the biological parameters of diabetes

◀ **Fig. 1 RNA sequencing analysis of human EEC from ObD and Ob individuals.** RNA-seq analysis of gene expression of (a) EEC markers and (b) Paneth cell markers is expressed in normalized counts. Note that *INS* gene expression is a negative control of non expressed gene in EEC. **c** Multi-Dimensional Scaling of all differentially expressed genes in enriched-EEC population of Ob ( $n = 14$ , open circle) and ObD ( $n = 13$ , black circle) individuals and in ObD CD24 negative epithelial sample ( $n = 1$ , black star). **d** Comparative expression (counts per million) of genes present in enriched-EEC population between Ob and ObD individuals. Up-regulated (red) and downregulated (green) genes ( $FDR < 0.001$ ,  $n = 196$ ) are above and below the diagonal, respectively. **e** Hierarchical clustering from all the over-expressed (128 genes) and under-expressed (68 genes) genes ( $FDR < 0.001$ ) in ObD compared to Ob individuals displayed as a heat map constructed on log (cpm). **f** Heat map of partial correlation (adjusted for age and sex) between clinical parameters and the differentially expressed genes ( $FDR < 0.001$ ,  $n = 196$ ).

(HbA1c, glycemia) are negatively correlated with the dyslipidemia parameters (cholesterol, LDL and apo B), and vice versa.

Altogether, the RNAseq analysis showed that transcriptomic signature of EEC discriminates obese subjects according to their diabetic status.

### Decreased EEC differentiation program in the jejunum of obese individuals is associated with T2D

Among early and common transcription factors, *RPS3*, *NEUROG3*, *SOX4*, *RUN1XT1*, *PAX4* and *HMGB3* were statistically decreased in ObD as compared to Ob individuals whereas *SMARCD2* and *CELF3* were increased (Fig. 2a). Regarding the 16 middle and late transcription factors, only *FOXA1* and *TRIM35* were increased in ObD as compared to Ob individuals (Fig. 2b). EEC markers were also analyzed in transcriptomic profiles. Gene expression of *CHGA*, *PYY*, *GCG* and tryptophan 5 hydroxylase 1 (*TPH1*), the serotonin production enzyme, were decreased in ObD compared to Ob (Fig. 2c). These highlighted the decreased EEC differentiation program associated with the diabetic status in human obesity.

### Type 2 diabetes is associated with a reduction of GLP-1 cell lineage in human obesity

We took advantage of a larger group of three groups of non obese (NOB,  $n = 22$ ), Ob ( $n = 37$ ), and ObD ( $n = 21$ ) individuals (Table 2) to focus on the epithelial gene expression of ten transcription factors critical for the differentiation of EEC (Fig. 3a, b) and 4 enterohormones (Fig. 3c). We showed a significant lower expression of *NKX2.2*, *PAX6*, *FOXA1* and *PDX1* in obese without or with T2D (Ob + ObD) vs. NOB individuals (Fig. 3a, b). *GIP* and *CCK* gene expression were also decreased in obese without or with T2D (Ob + ObD) as compared to NOB individuals (Fig. 3c). When comparing ObD to Ob individuals, we found a significant decreased

gene expression of *NEUROG3*, *PAX4*, *NEUROD1*, *NKX2.2*, *PAX6*, *ISL1* and *FOXA2* (Fig. 3a, b). *GCG* and *CCK* gene expression were also decreased in ObD compared to Ob (Fig. 3c). Altogether we showed in a second group, a specific reduction of *CCK* and *GLP-1* cell lineages in obesity and T2D. Interestingly, obesity with T2D decreased *GCG* expression and its transcriptional regulator *PAX6*.

### Reduced proglucagon processing and lipid sensors involved in GLP-1 secretion in the epithelial jejunum of individuals with obesity and diabetes

To go further into mechanisms, we then focused on a panel of genes regulated by *PAX6* and explored proglucagon maturation and sensors mediating lipid-induced *GLP-1* secretion (Fig. 3d).

We observed a significant reduction of *PCSK1*, *PCSKIN*, and *PCSK2* expression in obese individuals without or with T2D (Ob + ObD) as compared to NOB (Fig. 3d). *PCSK1* gene expression was also significantly reduced in ObD individuals compared to Ob, thus suggesting a role of the metabolic status in proglucagon maturation (Fig. 3d). Surprisingly, the expression of *PCSK2*, involved in proglucagon maturation into glucagon in pancreatic alpha cells was detected in the jejunum at a level comparable to *PCSK1* (Ct 29.95 and Ct 29.31 for *PCSK2* and *PCSK1*, respectively).

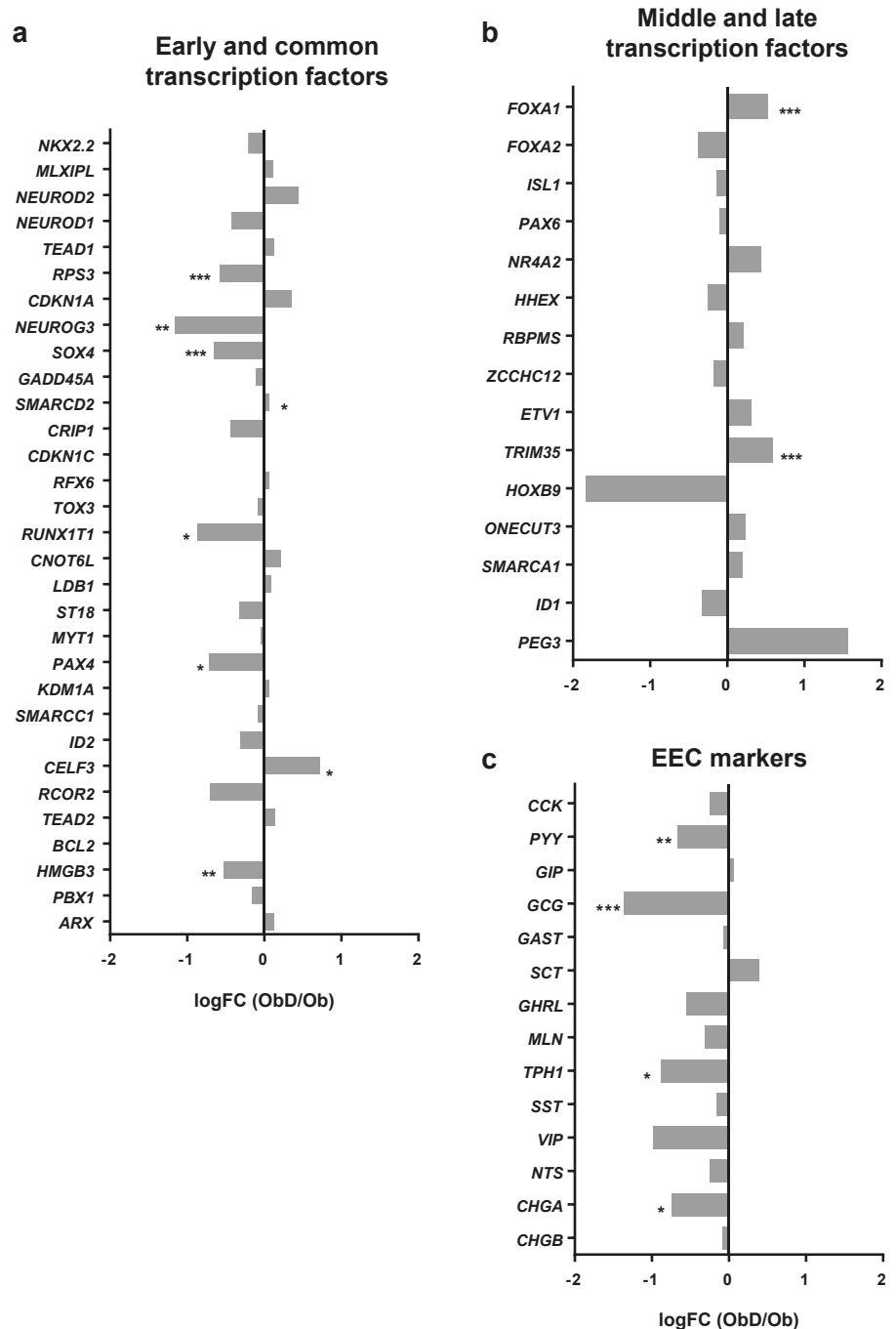
Interestingly we analyzed gene expression of lipid sensors that induce *GLP-1* secretion, namely *FFAR1* and *GPR119*. We observed a significant reduction of *FFAR1* gene expression in obese individuals without or with T2D (Ob + ObD) as compared to NOB. *FFAR1* and *GPR119* gene expression were both decreased in ObD as compared to Ob individuals (Fig. 3d).

Altogether, we showed that multiple aspects of *GLP-1* synthesis, maturation and lipid sensing are negatively impacted by T2D in individuals with severe obesity.

### Decreased GLP-1-cell density in individuals with obesity and diabetes

We thus investigated if the alteration of *GLP-1*-cell density could be associated with diminished cell differentiation. *GLP-1*-, *GIP*-, *CCK*-, *PYY*-cell densities, according to enterohormone protein expression, were determined in NOB ( $n = 12$ ), Ob ( $n = 23$ ) and ObD ( $n = 11$ ) individuals which came from the group of 58 individuals described in Table 2. *GLP-1*-, *CCK*-, *GIP*- and *PYY*-positive cells were identified by immunohistochemistry and their respective densities evaluated (Fig. 3e, Supplementary Fig. 3). Only the *GLP-1*-positive cell density was significantly decreased in ObD compared to Ob individuals (Fig. 3e). Thus, in the jejunum, diabetes specifically affects the density of *GLP-1*-positive EEC in individuals with severe obesity.

**Fig. 2 RNA-seq analysis of EEC lineage gene expression from ObD and Ob individuals.** Gene expression of (a) early and common transcription factors, (b) middle and late transcription factors and (c) enteroendocrine cell markers. The fold change is calculated as the ratio of normalized counts ObD/Ob means. The gene expression is calculated as  $\log(\text{FC})$  from ObD ( $n = 13$ ) and Ob ( $n = 14$ ) individuals.  $p$  values were calculated with one way Anova. \*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$ .



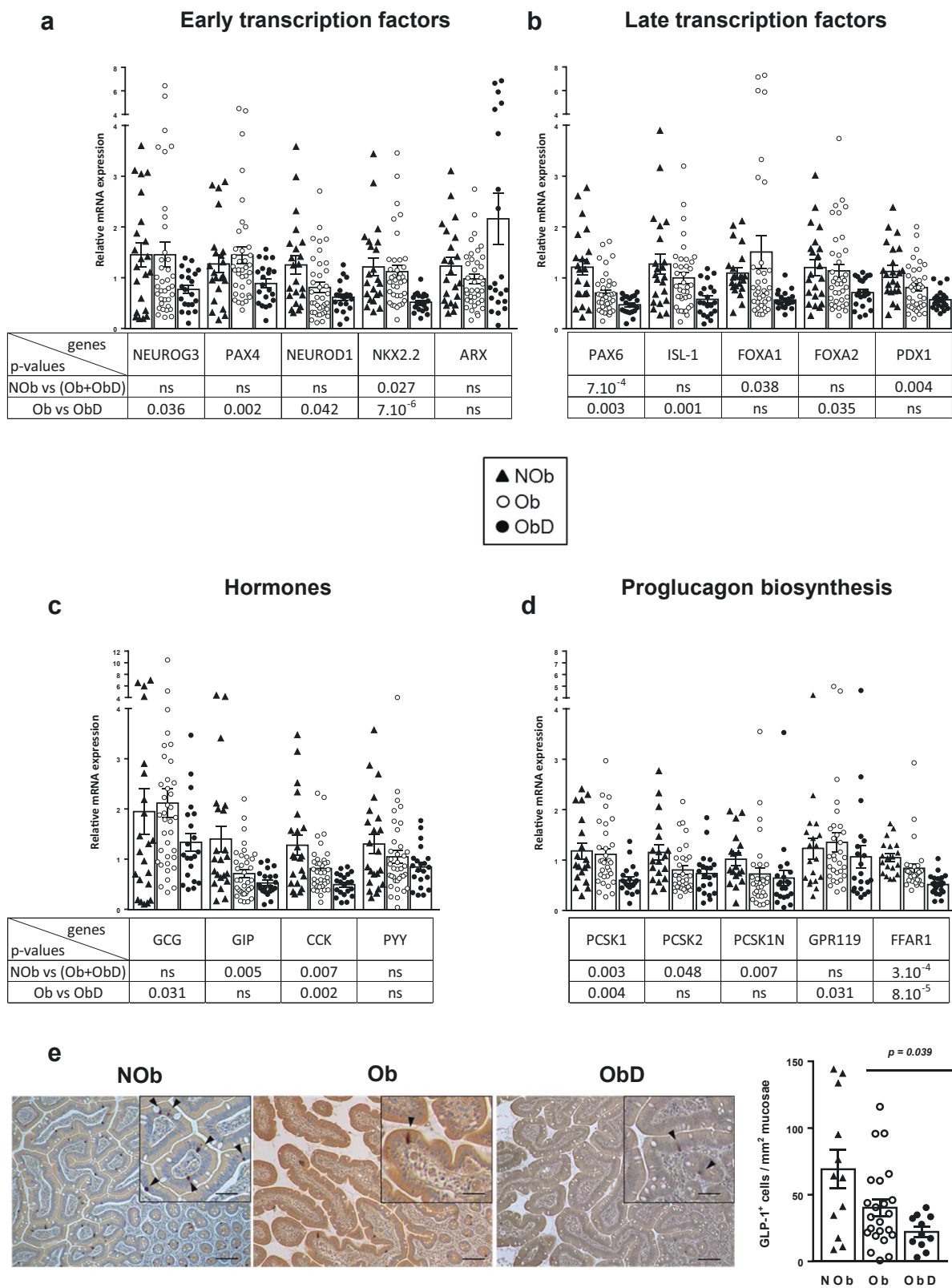
Altogether, we showed that obesity partly modifies the GLP-1 cell lineage in human jejunum whereas T2D deeply alters this lineage until the GLP-1 cell density is affected.

## Discussion

Using a new strategy of EEC sorting from human jejunum we provide for the first-time transcriptomic profiles of EEC in metabolic diseases. We showed that EEC transcriptomic

signature discriminates obese individuals according to their diabetic status. A focus on EEC lineage showed a decrease in differentiation program in obesity and T2D. Our finding was further confirmed in a second group by a specific reduction of GLP-1-cell lineage and hormone synthesis. Furthermore, T2D in human obesity is associated with lowered GLP-1-positive cell density. Our findings are summarized in Fig. 4.

EEC are rare, scattered in the intestinal epithelium and difficult to isolate. In mice, EEC sorting is performed using



enterohormone promoters driving a fluorescent tag. FACS has been used successfully for RNA sequencing experiments in transgenic mice [33, 34], but is not applicable in

humans. Another strategy to isolate EEC is the use of EEC markers. While the surface marker Claudin 4 has been used once in mice [35] an intracellular cell marker, such as GLP-1

◀ **Fig. 3 Impact of obesity and type 2 diabetes on GLP-1 cell lineage, GLP-1 biosynthesis and cell density.** Gene expression analysis with Low Density Arrays of (a) early transcription factors, (b) late transcription factors involved in EEC differentiation, (c) enterohormones in NOb ( $n = 22$ ), Ob ( $n = 37$ ) and ObD ( $n = 21$ ). d RT-qPCR analysis of gene expression involved in proglucagon maturation and lipid sensing triggering GLP-1 secretion in NOb ( $n = 19$ ), Ob ( $n = 31$ ) and ObD ( $n = 21$ ). e Representative images of GLP-1 immunostaining in jejunum sections in which positive cells are colored in brown (scale bar 150  $\mu\text{m}$ ). A magnification is shown in the box (scale bar 300  $\mu\text{m}$ ) in which positive cells are indicated with black arrowheads. Note that an antibody against active GLP-1 7-36 amide form was used for the GLP-1 immunostaining. GLP-1 cell density is expressed as number of positive cells per  $\text{mm}^2$  of the jejunum mucosae in NOb ( $n = 12$ , black triangle), Ob ( $n = 23$ , open circle) and ObD ( $n = 11$ , black circle) individuals. Data are expressed as mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM).

requires cell fixation and permeabilization prior sorting that might imply several drawbacks on cell viability and RNA integrity [22]. Here, in humans, CD24 was successfully used to enrich EEC. CD24 was previously used in mice to separate stem cells that weakly express CD24 from Paneth cells and EEC that strongly express CD24 [32]. Importantly, proteins and RNAs from human EEC-enriched fraction were of high quality allowing further exploration. Although we cannot exclude having selected a certain type of EEC, the RNA-seq analysis shows that no less than 12 enterohormones are present. Moreover, our technical strategy preserved EEC differences according to the metabolic status of the individuals as we could distinguish between Ob and ObD EEC profiles.

Here, the expression of several genes involved in the EEC differentiation program is impacted in individuals with T2D. The expression of early transcription factors (*NEUROG3*, *PAX4*, *SOX4*, *RUNX1T1*) are lowered whereas late transcription factors (*FOXA1* and *TRIM35*) are increased in T2D individuals. Genetically modified mice lacking transcription factor expression have provided considerable knowledge on EEC lineage. *NKX2.2* is a critical transcription factor involved in EEC lineage [36]. In addition, *ARX*, *FOXA1*, *FOXA2*, *ISL-1* and *PAX6* are important to promote GLP-1 lineage [13, 37–40]. High-fat diet (HFD)-induced obesity in mice reduces gene expression of *Etv1*, *Isl1*, *Mlxipl*, *Nkx2.2* and *Rfx6* whereas *Cck*, *Gip* and *Pyy*, *Gcg* gene expression is not impacted [41]. Wölnerhanssen et al. showed a deregulation of *HES1*, *ATO1*, *NEUROD1* and *NEUROG3* controlling intestinal epithelial cell lineages in duodenum of obese individuals [21]. Recently, six new regulator genes were identified for EEC lineage in mice: *Sox4*, *Rfx6*, *Tox3*, *Myt1*, *Runx1t1*, and *Zcchc12* [16]. In our RNA-seq analysis, we also show that these genes are expressed in the EEC fraction but only *SOX4* and *RUNX1T1* expression is decreased in T2D individuals. Gehart et al. further showed that *Etv1*, *Hoxb9*,

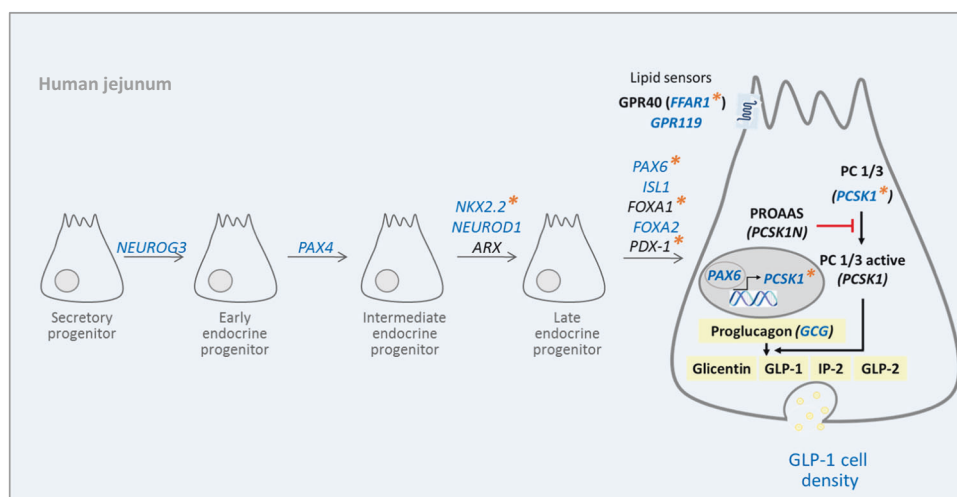
*Pax6* and *Trim35* genes are involved in GLP-1-cell lineage in mice [16]. Here, we show an increase of *TRIM35* in T2D individuals. In our study, we provide transcriptomic profiles of jejunal EEC in metabolic diseases, and we show that the EEC differentiation program is decreased.

Taken advantage of a second independent group of Ob and ObD individuals, including NOb individuals, we focused on the GLP-1 cell lineage. Obesity decreases the GLP-1 cell lineage as evidenced by lower *NKX2.2*, *PAX6*, *FOXA1*, and *PDX1* gene expression in (Ob + ObD) individuals compared to NOb individuals (Fig. 4). Moreover, GLP-1 cell lineage is altered by T2D status since *NEUROG3*, *PAX4*, *NEUROD1*, *ISL-1* and *FOXA2* gene expression is decreased in ObD individuals compared to ObD individuals (Fig. 4).

We showed a decrease in gene expression of *NEUROG3*, *PAX4* and *GCG* in the two independent groups of individuals. For *PAX6* and *PYY* gene expression, we did not observe the same variation between the two groups. This could be explained by the smaller group 1 than group 2. Moreover, gene expression was not analyzed with the same samples (isolated EECs vs. total epithelial cells) nor the same methods (RNA-Sequencing vs. RT-qPCR).

We also report here that jejunal *GCG* gene expression is altered in T2D individuals that could indicate that the GLP-1-positive cells displayed lower capacity of GLP-1 biosynthesis. Indeed, the expression of *Pcsk1*, its inhibitor *Pcsk1n* and *Pcsk2* are under the control of *PAX6* in pancreatic islets [42–44]. The *PCSK1* gene encodes prohormone convertase 1/3 (PC1/3), a protease involved in the post-translational processing of several prohormones in endocrine tissues. PC1/3 activity is essential for the activating cleavage of proglucagon, proopiomelanocortin, proinsulin, and proghrelin [45]. In our current study, *PCSK1* gene expression, which contributes to GLP-1 biosynthesis, is decreased in the jejunal epithelium of obese individuals with or without type2 diabetes, similar to as reported in L-cells of mice fed with HFD [41]. The expression of *PCSK2* was recently reported in the gut, where *PCSK1* and *PCSK2* gene expression was increased in each gut segments from obese-diabetic individuals compared to healthy individuals [46]. The expression of *PCSK2* in the human jejunum reported here is an argument in favor of the potential production, by the gut, of extrapancreatic glucagon reported in individuals with a total pancreatectomy [47]. GLP-1 secretion is triggered at the apical membrane by nutrients, such as lipids, via *GPR119* and *GPR40* [48]. *FFAR1* transcription is activated by *PAX6* [49]. Here, *GPR119* and *FFAR1*, in EEC was lower in ObD individuals suggesting a reduced capacity to secrete GLP-1 in response to lipids.

Among cohorts in the current study, 23–52% of individuals were taking DPP4-inhibitors or GLP-1 receptor



**Fig. 4 Diabetes in severe obese individuals specifically reduces the lineage and the density of jejunal GLP-1 producing cells.** T2D in human obesity reduces both proglucagon *GCG* gene expression and GLP-1 cell density that could be related to a decrease in GLP-1 cell lineage factors (*NEUROG3*, *PAX4*, *NKX2.2*, *NEUROD1*, *PAX6*, *ISL1*, and *FOXA2*). Furthermore, the expression of *PCSK1*, (encoding

enzyme cleaving proglucagon into GLP-1) and lipid sensors, *GPR119* and *FFAR1* (leading to GLP-1 secretion) was also lowered by T2D. Blue color indicates decreased gene expression and lower GLP-1 cell density in ObD compared to Ob individuals; orange asterisks indicate decreased gene expression in obese (Ob + ObD) compared to NOB individuals.

agonists. We cannot exclude that these antidiabetic therapies could influence EEC differentiation through intestinal hypertrophy as reviewed in [50]. However, here we observed an impaired EEC differentiation and GLP-1 cell density whose are in opposite with an intestinotrophic effect. Indeed, our study provides the novel finding that density of GLP-1-positive cells is reduced in jejunum in T2D individuals with severe obesity whereas CCK-, GIP- and PYY- producing cell densities remained unaffected. This could explain why after a challenge by meal tests, circulating GLP-1 concentration fails to increase appropriately in Ob and ObD individuals as previously reported [51, 52]. Although it has been shown a co-expression of GLP-1 and PYY in primary cultured human colon cells [53] and in human jejunum [54], the expression of a specific hormone in any particular EEC is dependent of its location along the cephalocaudal axis [22] and along the crypt-to-villus axis [55]. In our study, PYY cell density in the Ob group remained unchanged, in contrast to the density of GLP-1 cells suggesting that PYY and GLP-1 are not colocalized in the same EEC subtype in the jejunum. Thus, we cannot exclude that the absolute number of CCK-, PYY- and GIP-positive cells is enhanced in obesity.

Furthermore, it has been demonstrated that GLP-1 secretion rises instantaneously after surgery [56]. This is compatible with the decreased EEC differentiation in the current study if we hypothesize that the observed impairment of EEC lineage in diabetic individuals is only present in the jejunum and that after bariatric surgery foods arrive to more distal segments of the small intestine with intact or restored EEC differentiation.

Some limitations of our study should be noted. First, results are limited to jejunum and we cannot exclude an impact of T2D in other small intestine segments. Furthermore, antidiabetic treatments are given to ObD subjects without it being possible to determine their impact on gene expression. Second, we have to point on the sex unbalance of our two groups of Ob subjects. Individuals undergoing bariatric surgery have a gender difference (males 20% vs. females 80%) [57]. This disparity is lower in older obese individuals with more comorbidities [57]. Gender can influence the tissue expression of common genes [58, 59]. It has been shown that small intestine presents less differential gene expression due to gender than other tissues [58]. However, we cannot here exclude a sex-biased gene expression. Third, RNAseq analysis provides a transcriptomic signature of EEC in Ob according to their diabetic status but the diabetic status could in turn impairs transcriptomic profile of EEC. Thus we cannot conclude to a causal link between these two observations. Finally, our transcriptomic data were obtained with a novel cell sorting strategy to achieve EEC enrichment in humans that has not been described before.

In conclusion, our data reveal cell differentiation and transcriptional mechanisms by which individuals with obesity and T2D display reduced GLP-1 cell density and could have a reduced capacity to produce GLP-1 in response to a meal (Fig. 4). Therefore, it could be of interest to intervene on EEC lineage to circumvent the reduction of post-prandial GLP-1 production and improve diabetic outcomes.



**Acknowledgements** EEC sorting was performed at CytoICAN core facility (ICAN Institute). cDNA libraries, RNA sequencing library preparations and Illumina sequencing were performed at the Ecole normale supérieure genomic core facility (Paris, France). We thank the staff involved in human bariatric surgery program, V. Lemoine (clinical research assistant ICAN) for help in clinical investigation, Dr F. Marchelli (NutriOmic research unit and nutrition department) for data management, ICAN CRB members for their bio-banking contribution, Dr A. Torcivia for support in surgical jejunum samples collection and T. Swartz for English language editing.

**Funding** This work was supported by INSERM, Sorbonne University, the National Agency for Research “Investments for the Future”, reference ANR-10-IAHU (ICAN), MSDAvenir, Société Francophone pour l’étude du diabète (SFD). LLG received a doctoral fellowship from Sorbonne University. ELH and JTM were funded respectively by ICAN Institute and EFSO fellowships. The clinical study was promoted by the Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (APHP) and Direction of Clinical research, which promoted the clinical investigations (Microbaria and LEAKY GUT projects). This work has also benefited from a French government funding managed by the ICAN Institute as transversal leaky gut project, the National Agency for Research (program “Investments for the Future” reference ANR -10-IAHU, RHU Carmma), from funds linked to the FP7-investigation program (Metacardis) and obtained by Benjamin Delessert Institute, Groupe Lipides et Nutrition (GLN), Appert Institute (UPPIA), Fondation Obélisque, Fondation Nestlé, Société Française et Francophone de Chirurgie de l’Obésité et des Maladies Métaboliques (SOFFCO-MM), Société Française de Chirurgie Digestive (SFCO) (for Leaky Gut project). The École normale supérieure genomic core facility was supported by the France Génomique national infrastructure, funded as part of the “Investissements d’Avenir” program managed by the Agence Nationale de la Recherche (contract ANR-10-INBS-09).

**Author contributions** CO, PS and AR designed experiments, acquired, analyzed data, contributed to the discussion and wrote the paper. LLG and JTM acquired and analyzed data. ELH designed experiments, acquired and analyzed data. LJ, MF and CB acquired data. HAS analyzed data and performed statistical analyzes. LG participated to jejunal sampling, CP and KC realized the cohort recruitment and phenotyping, contributed to data interpretation and paper editing. AL contributed to the discussion and wrote the paper.

## Compliance with ethical standards

**Conflict of interest** The authors declare that they have no conflict of interest.

**Publisher’s note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

**Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article’s Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article’s Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

## References

- Holst JJ. Enteroendocrine secretion of gut hormones in diabetes, obesity and after bariatric surgery. *Curr Opin Pharmacol*. 2013;13:983–8.
- Borg CM, le Roux CW, Ghatti MA, Bloom SR, Patel AG, Aylwin SJ. Progressive rise in gut hormone levels after Roux-en-Y gastric bypass suggests gut adaptation and explains altered satiety. *Br J Surg*. 2006;93:210–5.
- Harvey EJ, Arroyo K, Korner J, Inabnet WB. Hormone changes affecting energy homeostasis after metabolic surgery. *Mt Sinai J Med*. 2010;77:446–65.
- Madsbad S, Holst JJ. GLP-1 as a mediator in the remission of type 2 diabetes after gastric bypass and sleeve gastrectomy surgery. *Diabetes*. 2014;63:3172–4.
- Peterli R, Steinert RE, Woelnerhanssen B, Peters T, Christoffel-Courtin C, Gass M, et al. Metabolic and hormonal changes after laparoscopic Roux-en-Y gastric bypass and sleeve gastrectomy: a randomized, prospective trial. *Obes Surg*. 2012;22:740–8.
- Young LA, Buse JB. GLP-1 receptor agonists and basal insulin in type 2 diabetes. *Lancet*. 2014;384:2180–1.
- Larrauffie P, Roberts GP, McGavigan AK, Kay RG, Li J, Leiter A, et al. Important Role of the GLP-1 Axis for Glucose Homeostasis after Bariatric Surgery. *Cell Rep*. 2019;26:1399–408. e1396
- Darwich AS, Aslam U, Ashcroft DM, Rostami-Hodjegan A. Meta-analysis of the turnover of intestinal epithelia in preclinical animal species and humans. *Drug Metab Dispos*. 2014;42:2016–22.
- van der Flier LG, Clevers H. Stem cells, self-renewal, and differentiation in the intestinal epithelium. *Annu Rev Physiol*. 2009;71:241–60.
- Schonhoff SE, Giel-Moloney M, Leiter AB. Minireview: development and differentiation of gut endocrine cells. *Endocrinology*. 2004;145:2639–44.
- Jenny M, Uhl C, Roche C, Duluc I, Guillemin V, Guillemot F, et al. Neurogenin3 is differentially required for endocrine cell fate specification in the intestinal and gastric epithelium. *EMBO J*. 2002;21:6338–47.
- Mellitzer G, Beucher A, Lobstein V, Michel P, Robine S, Keding M, et al. Loss of enteroendocrine cells in mice alters lipid absorption and glucose homeostasis and impairs postnatal survival. *J Clin Invest*. 2010;120:1708–21.
- Ye DZ, Kaestner KH. Foxa1 and Foxa2 control the differentiation of goblet and enteroendocrine L- and D-cells in mice. *Gastroenterology*. 2009;137:2052–62.
- Naya FJ, Huang HP, Qiu Y, Mutoh H, DeMayo FJ, Leiter AB, et al. Diabetes, defective pancreatic morphogenesis, and abnormal enteroendocrine differentiation in BETA2/neuroD-deficient mice. *Genes Dev*. 1997;11:2323–34.
- Beucher A, Gjernes E, Collin C, Courtney M, Meunier A, Colombat P, et al. The homeodomain-containing transcription factors Arx and Pax4 control enteroendocrine subtype specification in mice. *PLoS ONE*. 2012;7:e36449.
- Gehart H, van Es JH, Hamer K, Beumer J, Kretschmar K, Dekkers JF, et al. Identification of Enteroendocrine Regulators by Real-Time Single-Cell Differentiation Mapping. *Cell*. 2019;176:1158–73. e1116
- Egerod KL, Engelstoft MS, Grunddal KV, Nohr MK, Secher A, Sakata I, et al. A major lineage of enteroendocrine cells coexpress CCK, secretin, GIP, GLP-1, PYY, and neurotensin but not somatostatin. *Endocrinology*. 2012;153:5782–95.
- Haber AL, Biton M, Rogel N, Herbst RH, Shekhar K, Smillie C, et al. A single-cell survey of the small intestinal epithelium. *Nature*. 2017;551:333–9.

19. Habib AM, Richards P, Cairns LS, Rogers GJ, Bannon CA, Parker HE, et al. Overlap of endocrine hormone expression in the mouse intestine revealed by transcriptional profiling and flow cytometry. *Endocrinology*. 2012;153:3054–65.
20. Gribble FM, Reimann F. Function and mechanisms of enteroendocrine cells and gut hormones in metabolism. *Nat Rev Endocrinol*. 2019;15:226–37.
21. Wolnerhanssen BK, Moran AW, Burdyga G, Meyer-Gerspach AC, Peterli R, Manz M, et al. Deregulation of transcription factors controlling intestinal epithelial cell differentiation; a predisposing factor for reduced enteroendocrine cell number in morbidly obese individuals. *Sci Rep*. 2017;7:8174.
22. Roberts GP, Larraufie P, Richards P, Kay RG, Galvin SG, Miedzybrodzka EL, et al. Comparison of Human and Murine Enteroendocrine Cells by Transcriptomic and Peptidomic Profiling. *Diabetes*. 2019;68:1062–72.
23. Aranas T, Grosfeld A, Poitou C, Omar AA, Le Gall M, Miquel S, et al. Lipid-rich diet enhances L-cell density in obese subjects and in mice through improved L-cell differentiation. *J Nutr Sci*. 2015;4:e22.
24. Aron-Wisniewsky J, Prifti E, Belda E, Ichou F, Kayser BD, Dao MC, et al. Major microbiota dysbiosis in severe obesity: fate after bariatric surgery. *Gut*. 2019;68:70–82.
25. Genser L, Aguanno D, Soula HA, Dong L, Trystram L, Assmann K, et al. Increased jejunal permeability in human obesity is revealed by a lipid challenge and is linked to inflammation and type 2 diabetes. *J Pathol*. 2018;246:217–30.
26. Genser L, Torcivia A, Helmy N, Vaillant JC, Siksik JM. Laparoscopic Roux-en-Y gastric bypass with hand-sewn gastrojejunostomy. *J Visc Surg*. 2017;154:37–45.
27. Monteiro-Sepulveda M, Touch S, Mendes-Sa C, Andre S, Poitou C, Allatif O, et al. Jejunal T Cell Inflammation in Human Obesity Correlates with Decreased Enterocyte Insulin Signaling. *Cell Metab*. 2015;22:113–24.
28. Jourden L, Bernard M, Dillies MA, Le Crom S. Eoulsan: a cloud computing-based framework facilitating high throughput sequencing analyses. *Bioinformatics*. 2012;28:1542–3.
29. Dobin A, Davis CA, Schlesinger F, Drenkow J, Zaleski C, Jha S, et al. STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics*. 2013;29:15–21.
30. Li H, Handsaker B, Wysoker A, Fennell T, Ruan J, Homer N, et al. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics*. 2009;25:2078–9.
31. Anders S, Pyl PT, Huber W. HTSeq—a Python framework to work with high-throughput sequencing data. *Bioinformatics*. 2015;31:166–9.
32. Wong VW, Stange DE, Page ME, Buczacki S, Wabik A, Itami S, et al. Lrig1 controls intestinal stem-cell homeostasis by negative regulation of ErbB signalling. *Nat Cell Biol*. 2012;14:401–8.
33. Glass LL, Calero-Nieto FJ, Jawaid W, Larraufie P, Kay RG, Gottgens B, et al. Single-cell RNA-sequencing reveals a distinct population of proglucagon-expressing cells specific to the mouse upper small intestine. *Mol Metab*. 2017;6:1296–303.
34. Sommer CA, Mostoslavsky G. RNA-Seq analysis of enteroendocrine cells reveals a role for FABP5 in the control of GIP secretion. *Mol Endocrinol*. 2014;28:1855–65.
35. Nagatake T, Fujita H, Minato N, Hamazaki Y. Enteroendocrine cells are specifically marked by cell surface expression of claudin-4 in mouse small intestine. *PLoS ONE*. 2014;9:e90638.
36. Desai S, Loomis Z, Pugh-Bernard A, Schruck J, Doyle MJ, Mimic A, et al. Nkx2.2 regulates cell fate choice in the enteroendocrine cell lineages of the intestine. *Dev Biol*. 2008;313:58–66.
37. Ding J, Gao Y, Zhao Y, Yan H, Guo SY, Zhang QX, et al. Pax6 haploinsufficiency causes abnormal metabolic homeostasis by down-regulating glucagon-like peptide 1 in mice. *Endocrinology*. 2009;150:2136–44.
38. Du A, McCracken KW, Walp ER, Terry NA, Klein TJ, Han A, et al. Arx is required for normal enteroendocrine cell development in mice and humans. *Dev Biol*. 2012;365:175–88.
39. Terry NA, Walp ER, Lee RA, Kaestner KH, May CL. Impaired enteroendocrine development in intestinal-specific Islet1 mouse mutants causes impaired glucose homeostasis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2014;307:G979–91.
40. Trinh DK, Zhang K, Hossain M, Brubaker PL, Drucker DJ. Pax-6 activates endogenous proglucagon gene expression in the rodent gastrointestinal epithelium. *Diabetes*. 2003;52:425–33.
41. Richards P, Pais R, Habib AM, Brighton CA, Yeo GS, Reimann F, et al. High fat diet impairs the function of glucagon-like peptide-1 producing L-cells. *Peptides*. 2016;77:21–7.
42. Katz LS, Gosmain Y, Marthinet E, Philippe J. Pax6 regulates the proglucagon processing enzyme PC2 and its chaperone 7B2. *Mol Cell Biol*. 2009;29:2322–34.
43. Liu T, Zhao Y, Tang N, Feng R, Yang X, Lu N, et al. Pax6 directly down-regulates Pcsk1n expression thereby regulating PC1/3 dependent proinsulin processing. *PLoS ONE*. 2012;7:e46934.
44. Wen JH, Chen YY, Song SJ, Ding J, Gao Y, Hu QK, et al. Paired box 6 (PAX6) regulates glucose metabolism via proinsulin processing mediated by prohormone convertase 1/3 (PC1/3). *Diabetologia*. 2009;52:504–13.
45. Ramos-Molina B, Martin MG, Lindberg I. PCSK1 Variants and Human Obesity. *Prog Mol Biol Transl Sci*. 2016;140:47–74.
46. Jorsal T, Rhee NA, Pedersen J, Wahlgren CD, Mortensen B, Jepsen SL, et al. Enteroendocrine K and L cells in healthy and type 2 diabetic individuals. *Diabetologia*. 2018;61:284–94.
47. Lund A, Bagger JI, Wewer Albrechtsen NJ, Christensen M, Grondahl M, Hartmann B, et al. Evidence of Extraprostatic Glucagon Secretion in Man. *Diabetes*. 2016;65:585–97.
48. Moss CE, Glass LL, Diakogiannaki E, Pais R, Lenaghan C, Smith DM, et al. Lipid derivatives activate GPR119 and trigger GLP-1 secretion in primary murine L-cells. *Peptides*. 2016;77:16–20.
49. Gosmain Y, Cheyssac C, Masson MH, Guerardel A, Poisson C, Philippe J. Pax6 is a key component of regulated glucagon secretion. *Endocrinology*. 2012;153:4204–15.
50. Said H, Kaunitz JD. Gastrointestinal defense mechanisms. *Curr Opin Gastroenterol*. 2016;32:461–6.
51. Faerch K, Torekov SS, Vistisen D, Johansen NB, Witte DR, Jonsson A, et al. GLP-1 Response to Oral Glucose Is Reduced in Prediabetes, Screen-Detected Type 2 Diabetes, and Obesity and Influenced by Sex: the ADDITION-PRO Study. *Diabetes*. 2015;64:2513–25.
52. Vilsboll T, Krarup T, Deacon CF, Madsbad S, Holst JJ. Reduced postprandial concentrations of intact biologically active glucagon-like peptide 1 in type 2 diabetic patients. *Diabetes*. 2001;50:609–13.
53. Habib AM, Richards P, Rogers GJ, Reimann F, Gribble FM. Colocalisation and secretion of glucagon-like peptide 1 and peptide YY from primary cultured human L cells. *Diabetologia*. 2013;56:1413–6.
54. Cho HJ, Robinson ES, Rivera LR, McMillan PJ, Testro A, Nikfarjam M, et al. Glucagon-like peptide 1 and peptide YY are in separate storage organelles in enteroendocrine cells. *Cell Tissue Res*. 2014;357:63–9.
55. Beumer J, Artergiani B, Post Y, Reimann F, Gribble F, Nguyen TN, et al. Enteroendocrine cells switch hormone expression along the crypt-to-villus BMP signalling gradient. *Nat Cell Biol*. 2018;20:909–16.
56. Falken Y, Hellstrom PM, Holst JJ, Naslund E. Changes in glucose homeostasis after Roux-en-Y gastric bypass surgery for obesity at day three, two months, and one year after surgery: role of gut peptides. *J Clin Endocrinol Metab*. 2011;96:2227–35.
57. Fuchs HF, Broderick RC, Harnsberger CR, Chang DC, Sandler BJ, Jacobsen GR, et al. Benefits of bariatric surgery do not reach obese men. *J Laparoendosc Adv Surg Tech A*. 2015;25:196–201.

58. Gershoni M, Pietrokovski S. The landscape of sex-differential transcriptome and its consequent selection in human adults. *BMC Biol.* 2017;15:7.
59. Mele M, Ferreira PG, Reverter F, DeLuca DS, Monlong J, Sammeth M, et al. Human genomics. The human transcriptome across tissues and individuals. *Science.* 2015;348:660–5.

## Affiliations

Céline Osinski<sup>1</sup> · Léa Le Gléau<sup>1</sup> · Christine Poitou<sup>1,2</sup> · Juan de Toro-Martin<sup>3,7</sup> · Laurent Genser<sup>1,4</sup> · Magali Fradet<sup>5,8</sup> · Hédi Antoine Soula<sup>1</sup> · Armelle Leturque<sup>1</sup> · Corinne Blugeon<sup>6</sup> · Laurent Jourden<sup>6</sup> · Edwige Ludiwyne Hubert<sup>3,9</sup> · Karine Clément<sup>1,2</sup> · Patricia Serradas<sup>1</sup> · Agnès Ribeiro<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Sorbonne Université, INSERM, Nutrition and obesities: systemic approaches, F-75013 Paris, France

<sup>2</sup> Nutrition Department, Pitié-Salpêtrière hospital, Assistance Publique/Hôpitaux de Paris, F-75013, Paris, France

<sup>3</sup> Sorbonne Université, Université de Paris, INSERM, Cordeliers Research Center, F-75006 Paris, France

<sup>4</sup> Hepato-Biliary-Pancreatic Gastrointestinal Surgery and Liver Transplantation, Pitié-Salpêtrière Hospital, Assistance Publique/Hôpitaux de Paris, F-75013 Paris, France

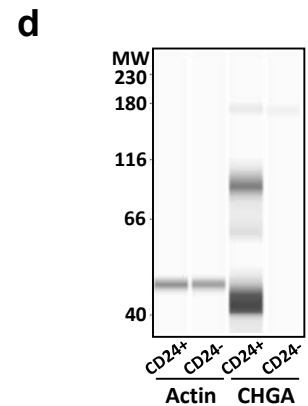
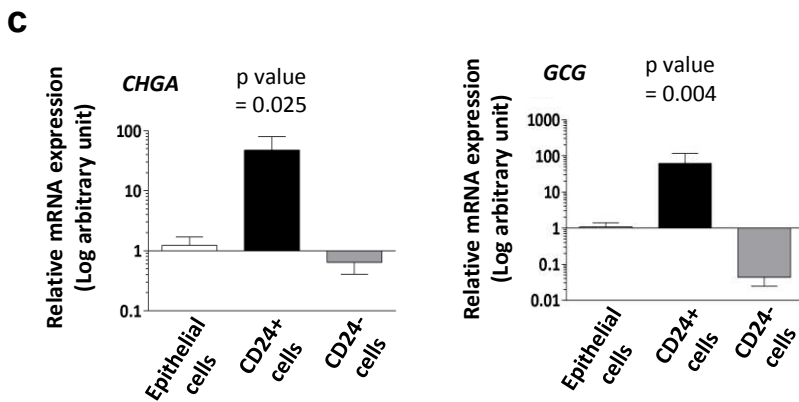
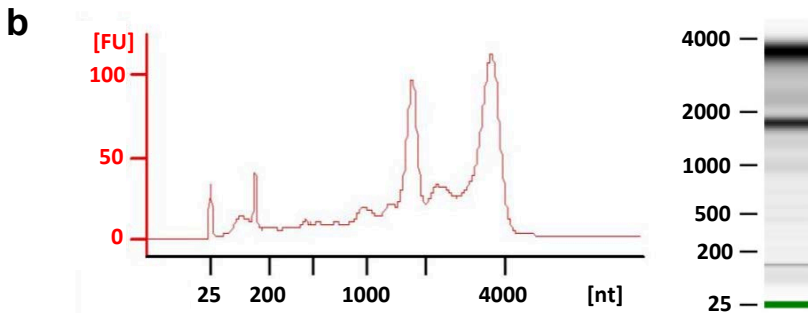
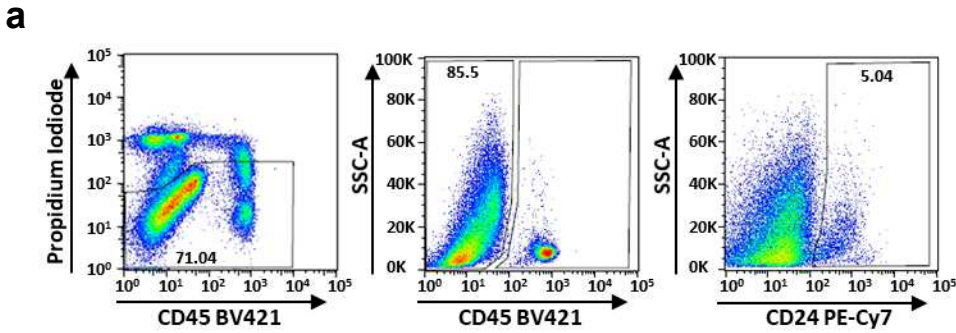
<sup>5</sup> Cytometry platform, Institut Cardiometabolism and Nutrition, F-75013 Paris, France

<sup>6</sup> Genomics core facility, Département de biologie, Institut de Biologie de l'ENS (IBENS), École normale supérieure, CNRS, INSERM, Université PSL, 75005 Paris, France

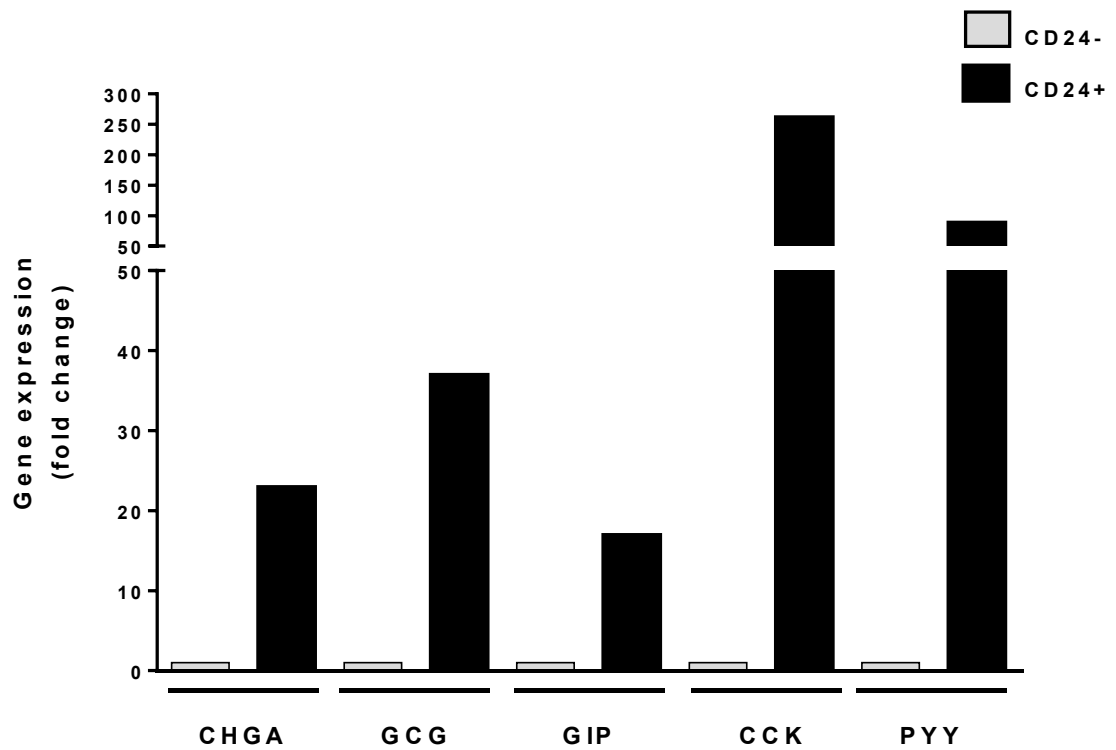
<sup>7</sup> Present address: Institute of Nutrition and Functional Foods (INAF), School of Nutrition, Université Laval, Quebec, QC, Canada

<sup>8</sup> Present address: Institut de Biologie, CIRB, Collège de France, F-75005 Paris, France

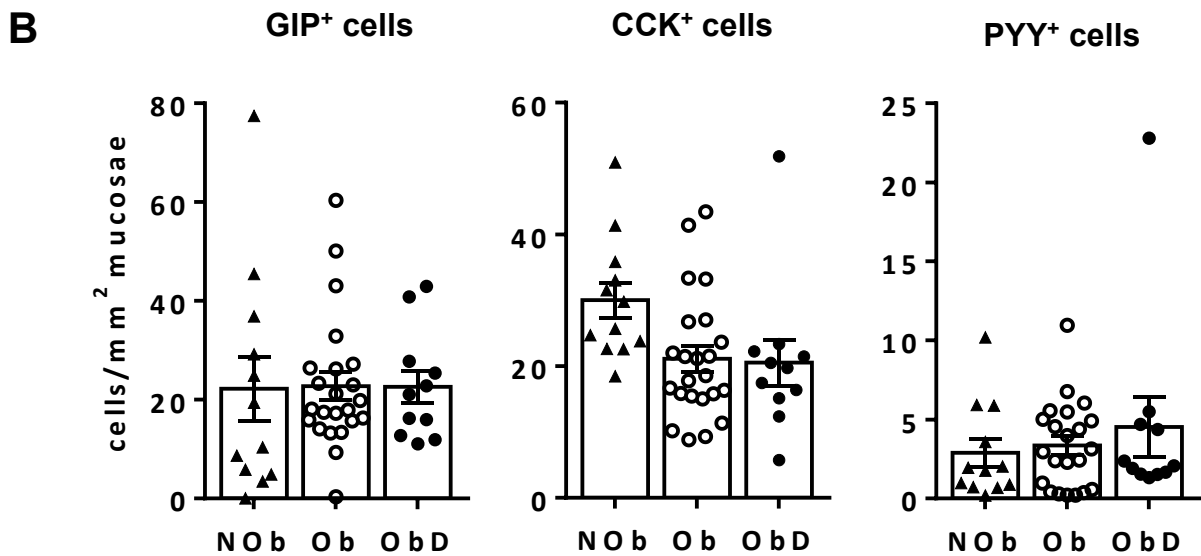
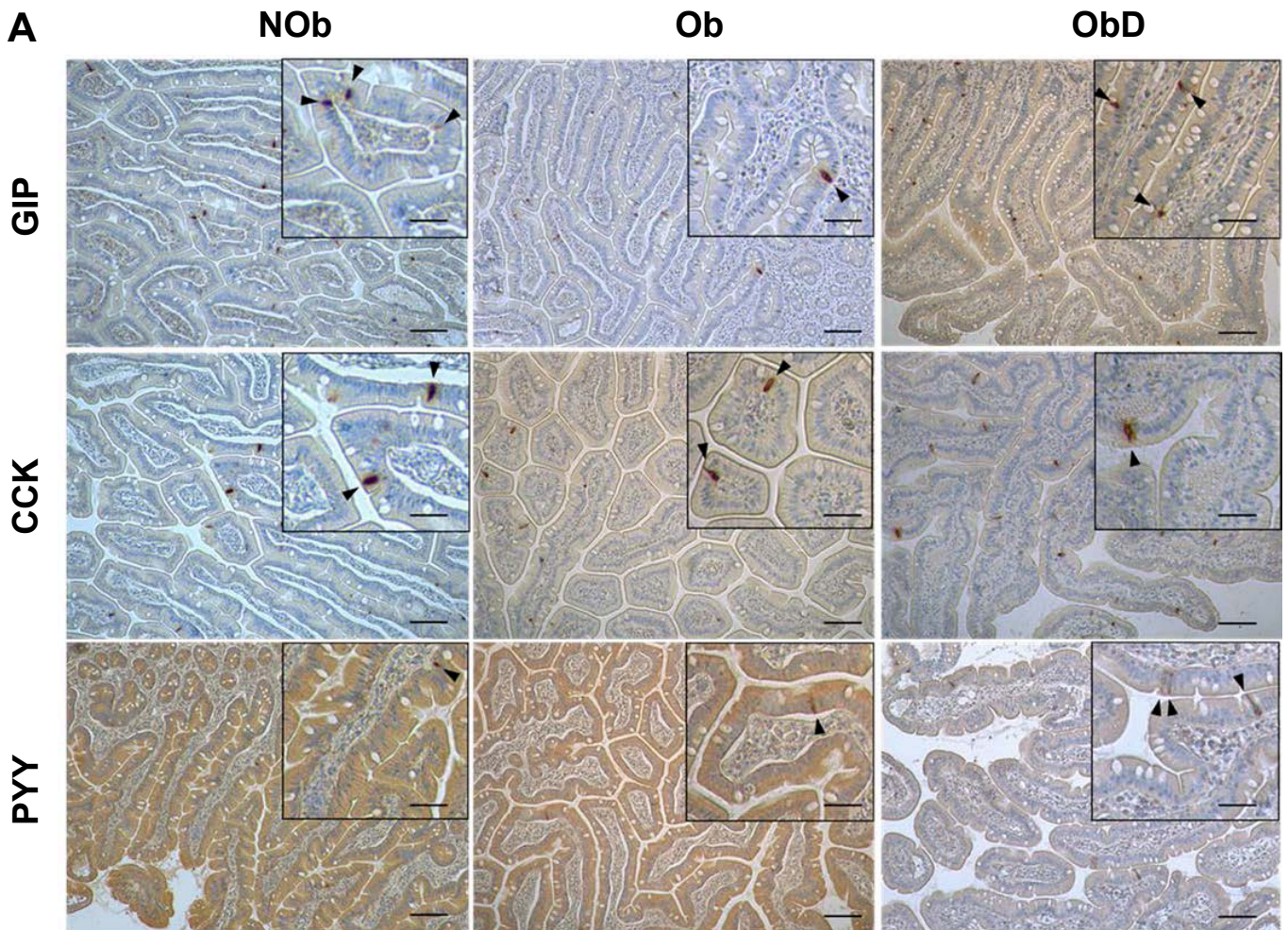
<sup>9</sup> Present address: SERVIER, ADIR, F-92284 Suresnes, cedex, France



**Supplementary Fig. 1 a)** Gating strategy for EEC fraction isolation by FACS with CD45 and CD24 markers. **b)** Agilent Bioanalyzer 2100 trace of RNA quality from human EEC enriched populations. A representative RNA quality analysis of 8.2 value is presented (left panel). A representative electropherogram (left panel) and the respective representation as migration profile (right panel). **c)** Relative mRNA expression of ECC markers Chromogranin A (CHGA, left) and Proglucagon (GCG, right) in total epithelial cells (open bar), CD24<sup>+</sup> sorted cells (black bar) and CD24<sup>-</sup> sorted cells (gray bar). The mRNA levels were normalized by 18S mRNA levels. Results are expressed as mean  $\pm$  SEM (n= 3 Ob individuals). **d)** Representative image by Simple Western assay of protein expression of CHGA (EEC marker) and Actin (control protein) in CD24<sup>+</sup> and CD24<sup>-</sup> sorted cells (n= 4: 2 Ob and 2 ObD individuals).



**Supplementary Fig. 2** RNA sequencing analysis of enterohormone gene expression in CD24- (gray bar) and CD24+ (black bar) cells from one ObD subject. Values of gene expression in pseudo-counts are expressed as fold change.



**Supplementary Fig 3:** EEC densities in non-obese (NOb), obese (Ob) and obese-diabetic (ObD) individuals. A) Representative images of GIP, CCK and PYY immunostaining in jejunum sections in which positive cells are colored in brown (scale bar 150  $\mu$ m). A magnification is shown in the box (scale bar 300  $\mu$ m) in which positive cells are indicated with black arrowheads. B) Cell densities are expressed as number of positive cells per mm<sup>2</sup> of the jejunum mucosae in NOb (n=12, black triangle), Ob (n=23, open circle) and ObD (n=11, black circle) individuals.

# Discussion générale, perspectives et conclusion

## Discussion générale, perspectives et conclusion

Je me suis intéressée à la voie de transduction du goût sucré dans l'intestin, en particulier dans les cellules entéroendocrines, pour son rôle dans la sécrétion de GLP-1. Dans les cellules entéroendocrines, la détection des glucides par le récepteur du goût sucré T1R2 et T1R3 et l'activation de l' $\alpha$ -gustducine, sous-unité de la protéine G gustducine, stimulent la phospholipase C $\beta$ 2 et augmentent la production de l'inositol-trisphosphate (IP3). La liaison de l'IP3 à son récepteur-canal dans le réticulum endoplasmique est à l'origine de l'élévation de la concentration cytosolique de calcium, signal qui déclenche la sécrétion de GLP-1. Les canaux sodiques TRPM5 et SCN2A et le canal calcique CACNA1A sont également impliqués dans la signalisation intracellulaire du goût sucré conduisant à la sécrétion de GLP-1.

Il est connu que dans les maladies métaboliques, telles que l'obésité et le diabète de type 2 (DT2), les concentrations plasmatiques en entérohormones et l'effet incrétine sont diminuées (Ranganath *et al.*, 1996; Muscelli *et al.*, 2008). Mon hypothèse était que l'altération de la sécrétion de GLP-1 dans les maladies métaboliques était causée par un défaut intestinal de la transduction du goût sucré.

Les résultats obtenus durant ma thèse, montrent que l'obésité induite expérimentalement chez la souris par des régimes alimentaires enrichis en lipides et en sucres conduit, dans l'intestin, à une altération de la voie de transduction du goût sucré et notamment à une sous-expression de *Gnat3*, codant pour l' $\alpha$ -gustducine. Dans un contexte d'amélioration métabolique après remodelage intestinal par entéro-gastro-anastomose (EGA) chez la souris, la restauration de la sécrétion de GLP-1 en réponse au glucose s'accompagne d'une sur-expression de *Gnat3* dans l'anse alimentaire. De plus, mes résultats montrent que cette voie de transduction du goût sucré est exprimée dans l'intestin spécifiquement dans les cellules entéroendocrines. Chez l'Homme présentant une obésité sévère depuis plusieurs années, une régulation négative de l'expression du gène *GNAT3* est associée au DT2. Le microbiote intestinal étant altéré par l'alimentation et dans l'obésité, nous avons évalué le rôle du microbiote intestinal sur l'expression de *Gnat3*. Nous montrons que le microbiote dysbiotique, induit par l'alimentation enrichie en lipides et en sucres chez la souris, n'a pas d'impact sur l'expression intestinale du gène de l' $\alpha$ -gustducine.



A la lumière de ces résultats et des données de la littérature, je discuterai tout d'abord de la voie de transduction du goût sucré dans les maladies métaboliques et leur rémission. Je m'intéressai ensuite plus précisément au rôle de la mise en place de ces pathologies sur l'altération de l'expression de l' $\alpha$ -gustducine et de la sécrétion de GLP-1. Je m'interrogerai aussi sur le rôle du microbiote intestinal dans l'altération de la transduction du goût sucré dans l'obésité. Je discuterai ensuite les résultats montrant la signature transcriptomique spécifiques des cellules entéroendocrines dans les maladies métaboliques et la présence de *Gnat3* spécifiquement dans les cellules entéroendocrines. Pour terminer, je discuterai des perspectives thérapeutiques que ces résultats ouvrent.

### **Voie de transduction intestinale du goût sucré dans les maladies métaboliques et leur rémission**

La voie de transduction du goût sucré a été initialement étudiée au niveau de papilles gustatives de la langue, démontrant son rôle dans la détection du goût sucré (Nelson *et al.*, 2001; Roper, 2013). Désormais, l'existence de cette voie de signalisation au niveau de l'intestin est admise et est de plus en plus étudiée (Margolskee *et al.*, 2007).

En 2007, Jang *et al.*, ont montré que l'inactivation de l' $\alpha$ -gustducine chez la souris inhibait la sécrétion de GLP-1 en réponse au glucose. Ces résultats ont été obtenus après gavage de 5g/kg de glucose ou infusion d'une solution de 10% de glucose dans le duodénum isolé des souris (Jang *et al.*, 2007). Dans les deux conditions, les souris présentaient, outre le défaut de sécrétion de GLP-1, un défaut de sécrétion d'insuline en réponse au glucose et étaient intolérantes au glucose. Chez des souris invalidées pour T1R3, l'infusion de la solution de 10% de glucose inhibait également la sécrétion de GLP-1 en réponse au glucose (Kokrashvili, Mosinger and Margolskee, 2009). Ces résultats soulignent les rôles clés de l' $\alpha$ -gustducine ou de T1R3 de la voie de transduction du goût sucré dans la sécrétion de GLP-1. Le rôle de la voie de transduction du goût sucré dans la sécrétion de GLP-1 reste cependant débattu. Des études chez l'Homme montrent en effet que l'ingestion de sucralose, édulcorant détecté par le récepteur T1R2/T1R3, ne stimule pas la sécrétion de GLP-1 (Ma *et al.*, 2009; Ford *et al.*, 2011; Robert E. Steinert *et al.*, 2011).

J'ai utilisé un modèle murin soumis à différents régimes alimentaires riches en lipides avec (HFD-HF) ou sans fructose (HFD) pendant 12 semaines afin d'obtenir des situations de

désordre métabolique de sévérité graduelle pour étudier la voie de transduction du goût sucré intestinale au cours du temps. J'ai ainsi montré que 3 semaines de régime hyperlipidique étaient suffisantes pour induire une obésité, une intolérance au glucose et une hyperglycémie basale alors que 12 semaines de régimes riche en lipides et en fructose étaient nécessaires pour aggraver le phénotype métabolique par une hyperinsulinémie basale et une insulino-résistance.

Dans ce modèle chez la souris, nous avons montré que les désordres métaboliques conduisaient à une altération de la transduction du goût sucré spécifiquement dans les cellules entéroendocrines et notamment à une diminution de l'expression de *Gnat3*, *Itpr3* et *Trpm5*. La sous-expression de *Gnat3* survient dès 3 semaines de régime hyperlipidique avec ou sans fructose, dans les étapes précoces de l'obésité alors que celle de *Trpm5* et *Itpr3* survient 9 semaines plus tard. Cependant, mes résultats ne me permettent pas de conclure sur l'impact du degré de sévérité des désordres métaboliques mais révèlent l'importance de la durée des régimes alimentaires. Ces résultats sont en accord avec ceux décrits dans la littérature. Une étude de Herrera Moro Chao et coll. a montré une diminution de l'expression des sous-unités T1R2 et T1R3 dans le duodénum de souris rendues obèses par 16 semaines de régime gras ou de souris génétiquement obèses, *Ob/Ob*. Cette étude a également montré une diminution de l'expression de T1R2 et de la gustducine dans la langue des souris obèses ainsi qu'une altération de l'expression des sous-unités T1R2 et T1R3 et de la gustducine au niveau de l'hypothalamus et du tronc cérébral de ces souris (Herrera Moro Chao *et al.*, 2016). L'ensemble des résultats montrent que l'obésité, qu'elle soit génétique ou induite par un régime alimentaire, altère la voie de transduction du goût sucré dans la langue et le cerveau, mais aussi dans l'intestin et particulièrement dans les cellules entéroendocrines chez la souris.

De plus, je me suis intéressée aux gènes de la voie de transduction du goût sucré chez des sujets obèses (Ob) et obèses diabétiques (ObD). Le RNA-sequençage des cellules entéroendocrines chez l'humain m'a permis de montrer que dans un contexte d'obésité, le DT2 conduisait à une sous-expression de *GNAT3* et une sur-expression d'*ITPR3*. Ces résultats ont mis en évidence l'altération de la voie de signalisation intestinale du goût sucré au niveau des cellules entéroendocrines dans les maladies métaboliques humaines. Ces résultats montrent qu'un phénotype métabolique d'obésité aggravé par le DT2 altérerait la voie de transduction du goût sucré dans les cellules entéroendocrines. Afin d'évaluer l'impact de

l'obésité sur cette voie de transduction, il serait intéressant d'analyser le profil transcriptomique des cellules entéroendocrines de sujets non obèses, à partir de biopsies de jéjunum.

En plus de son effet sur la sécrétion de GLP-1 en réponse aux sucres (Jang *et al.*, 2007), la voie de transduction du goût sucré au niveau intestinal est impliquée dans l'absorption des sucres par la stimulation de transporteurs du glucose tels que SGLT1 et la translocation de GLUT2 à la membrane apicale des entérocytes (Smith *et al.*, 2018). L'expression de SGLT1 est stimulée par la détection de glucides ou d'édulcorants dans l'intestin. Margolskee *et al.* ont montré que cette stimulation était altérée dans le cas d'une invalidation de T1R3 ou de l' $\alpha$ -gustducine (Margolskee *et al.*, 2007). Aussi, dans les cellules entéroendocrines, la sécrétion de GLP-1 en réponse aux sucres s'accompagne d'une sécrétion de GLP-2 qui permet la translocation de GLUT2 à la membrane apicale des entérocytes en cas de glycémie élevée. Smith *et al.* ont montré que l'invalidation du récepteur T1R2 chez la souris et l'inhibition du récepteur T1R2/T1R3 dans des fragments de jéjunum humains avec du lactisol inhibaient la translocation de GLUT2 à la membrane apicale (Smith *et al.*, 2018). Nous pouvons déduire que l'altération de la transduction intestinale du goût sucré perturbe l'absorption des glucides par les entérocytes.

La chirurgie bariatrique, et particulièrement le bypass gastrique, entraîne une amélioration métabolique et notamment, une rémission rapide du DT2 et une restauration de la sécrétion de GLP-1 (Jirapinyo *et al.*, 2018). Chez la souris, l'EGA entraîne une perte de poids, une amélioration de la tolérance au glucose et de la sécrétion de GLP-1 en réponse au glucose (Troy *et al.*, 2008).

Dans ce modèle d'EGA, nous avons montré une sur-expression de *Gnat3* dans les segments les plus proximaux de l'intestin après chirurgie. Dans ce contexte, nous avons choisi d'étudier l'expression de *Gnat3* dans le duodénum des souris contrôles (sham) comparé au jéjunum distal des souris EGA et le jéjunum proximal des souris sham comparé à l'iléon des souris EGA. En effet, après le remodelage, ces segments intestinaux (jéjunum distal et iléon) des souris EGA sont les premiers en contact avec le bol alimentaire avec la même cinétique que celle des souris sham. L'amélioration de l'expression du gène *Gnat3* de la voie de transduction du goût sucré pourrait expliquer en partie la restauration de sécrétion de GLP-1 en réponse au glucose.

## Rôle de la mise en place des maladies métaboliques sur l'altération de l'expression de l' $\alpha$ -gustducine et de la sécrétion de GLP-1 dans les cellules entéroendocrines

En 2015, Avau *et al.* ont montré que, sous régime alimentaire hyperlipidique, les souris  $\alpha$ -gust<sup>-/-</sup> semblaient protégées en partie contre l'obésité. En effet, leur prise de poids était moins élevée que celle de souris contrôle WT dès 4 semaines de régimes HFD, malgré une prise alimentaire supérieure (Avau *et al.*, 2015). Cependant, une autre étude menée sur des souris  $\alpha$ -gust<sup>-/-</sup> par Steensels *et al.*, contredit en partie les résultats précédents. Dans ce cas, les souris invalidées pour l' $\alpha$ -gustducine soumises à un régime HFD présentaient une prise de poids identique à celle de souris non invalidées (Steensels, Cools, *et al.*, 2017). La même équipe a montré qu'après une opération de type RYGB, les souris contrôles WT obèses perdaient du poids après la chirurgie mais finissaient par retrouver leur poids initial au bout de 7 semaines. Alors que la même opération RYGB chez des souris  $\alpha$ -gust<sup>-/-</sup> entraînait une perte de poids qui perdurait sur le long terme (Steensels, Lannoo, *et al.*, 2017). Ces résultats montrent que l'absence d' $\alpha$ -gustducine a peu ou pas d'effet sur la prise de poids corporel comparée aux souris WT sous régime hyperlipidique. A l'égard de ces résultats de la littérature et de nos propres résultats nous pouvons nous demander si la diminution de l'expression de *Gnat3* et l'altération de la voie de signalisation du goût sucré au niveau intestinal est déterminante pour l'obésité ou si à l'inverse, l'obésité est déterminante dans la sous-expression intestinale de *Gnat3*. Si la sous-expression de *Gnat3* en réponse au régime riche en gras était responsable de l'obésité, alors les souris  $\alpha$ -gust<sup>-/-</sup> seraient obèses sous régime riche en gras. Or ce n'est pas le cas. Nous en déduisons que l'obésité conduit à l'altération de l'expression de l' $\alpha$ -gustducine.

Nous avons montré une diminution de la densité des cellules GLP-1 entéroendocrines dans le jéjunum de sujets ObD comparés à des sujets Ob, ainsi qu'une altération de l'expression de facteurs de transcription impliqués dans le lignage entéroendocrine (Article n°2). Aussi, il a été montré chez le sujet obèse, qu'un régime riche en lipides augmentait la densité des cellules sécrétrices de GLP-1 comparé à un régime riche en sucres (Arantias *et al.*, 2015). Ces résultats montrent que les maladies métaboliques modulent la densité des cellules GLP-1 entéroendocrines. Il serait donc intéressant d'étudier les variations de densité de ces cellules dans les modèles murins de mise en place et de rémission des maladies métaboliques utilisés dans le cadre de ma thèse. Une diminution de la densité de cellules GLP-1 entéroendocrines

pourrait expliquer, en partie, la sous-expression de l' $\alpha$ -gustducine dans les maladies métaboliques.

Nos résultats n'ont pas montré de différence de l'expression de *Gnat3* chez les souris ayant reçu ou non un régime enrichi avec du fructose. Un régime riche en fructose ne serait donc pas un facteur aggravant de la sous-expression de *Gnat3* dans l'obésité. De plus, l'étude de Herrera Moro Chao *et al.* décrite précédemment a montré une altération de la voie de transduction du goût sucré chez des souris rendues obèses par un régime gras et chez des souris obèses génétiquement *Ob/Ob* soumises à un régime contrôle (Herrera Moro Chao *et al.*, 2016). L'obésité elle-même, mais pas la nature du régime obésogène, serait déterminante dans la diminution de l'expression des gènes de la voie de transduction du goût sucré au niveau intestinal. Cependant à ce stade nous ne pouvons pas écarter que d'autres facteurs tels que les nutriments ou le microbiote intestinal puissent participer également à l'altération de la voie de transduction du goût sucré.

La sur-expression de *Gnat3* dans l'intestin après chirurgie EGA peut s'expliquer, en partie, par le remodelage intestinal et la répartition des cellules entéroendocrines le long de l'intestin. En effet, les cellules GLP-1 entéroendocrines sont réparties selon un gradient croissant proximo-distal. En raccordant le jejunum distal à l'estomac, le bol alimentaire est rapidement en contact avec un nombre plus important de cellules entéroendocrines sécrétrices de GLP-1 via la voie de transduction du goût sucré (Larraufie *et al.*, 2019). De plus, dans notre modèle de souris EGA chez lesquelles nous observons une diminution de la masse corporelle, l'augmentation de l'expression de *Gnat3* s'accompagne d'une restauration de la sécrétion de GLP-1 à l'état basal et en réponse au glucose. Ce phénomène n'est pas observé chez les souris sham qui maintiennent de faibles concentrations plasmatiques en GLP-1 et une expression moins élevée de *Gnat3*. Ces résultats montrent que la sous-expression de *Gnat3* au niveau intestinal pourrait être impliquée dans l'altération de sécrétion de GLP-1 dans les maladies métaboliques.

### **Rôle du microbiote intestinal dans l'altération de la transduction du goût sucré**

Les maladies métaboliques conduisant à une dysbiose du microbiote intestinal (Pascale *et al.*, 2018), nous avons alors émis l'hypothèse que le microbiote, altéré par les maladies métaboliques pourraient contribuer aux modifications d'expression des gènes de la

transduction du goût sucré dans l'intestin et notamment de l' $\alpha$ -gustducine. Afin d'étudier les effets du microbiote, nous avons réalisé un transfert de microbiote fécal de souris contrôles ou obèses chez de jeunes souris au moment du sevrage. En effet, à ce stade de développement, le microbiote intestinal des souris n'est pas totalement développé, ce qui facilite l'implantation du microbiote transféré (Le Roy *et al.*, 2019). Aussi bien les souris receveuses du microbiote contrôle (MRCD) que les souris receveuses du microbiote HFD-HF (MRHFD-HF) étaient soumises à un régime HFD-HF pour évaluer si les désordres métaboliques et la voie de transduction du goût sucré étaient altérés de façon plus importante chez les souris MRHFD-HF que chez les souris MRCD. Dans notre modèle, le microbiote fécal des donneuses s'est bien implanté. En effet, l'analyse en composantes principales a montré que, 12 semaines après le transfert, le microbiote des souris MRCD était différent de celui des souris MRHFD-HF pourtant toutes soumises au même régime alimentaire.

La prise de poids et l'altération de la glycémie à jeun évoluaient de la même manière quel que soit le microbiote transféré. Cependant, nous avons observé une dégradation de la tolérance au glucose plus importante chez les souris MRHFD-HF que chez les souris MRCD.

De manière intéressante, les bactéries *Akkermansia*, bien que peu représentées dans le microbiote des souris donneuses sous régime contrôle, étaient présentes chez les souris MRCD et pas ou peu présentes chez les souris MRHFD-HF. Le genre *Akkermansia* est habituellement associé à un statut métabolique sain. L'abondance d'*Akkermansia muciniphila* est inversement corrélée à l'augmentation de la masse grasse et à l'intolérance au glucose chez la souris (Fujisaka *et al.*, 2020). De plus, chez l'Homme, la restriction calorique augmente l'abondance d'*Akkermansia muciniphila* et est associée à une meilleure amélioration de la glycémie à jeun et de la sensibilité à l'insuline (Dao *et al.*, 2016). La présence de bactéries *Akkermansia* dans le microbiote des souris MRCD pourrait ainsi expliquer la moindre dégradation de la tolérance au glucose de celles-ci.

Toutes les souris ayant subi un régime HFD-HF (donneuses HFD-HF et receveuses MRCD et HFD-HF) présentaient une augmentation de l'abondance de bactéries du genre *Lactococcus*. Cette observation est en accord avec les données de la littérature puisque le genre *Lactococcus* appartient au phylum des *Firmicutes* dont le développement est augmenté dans l'obésité (Ley *et al.*, 2005). De plus, il a été montré que les régimes expérimentaux tels que le

régime HFD utilisé dans mon étude présentaient une contamination par les bactéries *Lactococcus* et notamment *Lactococcus lactis* (Bisanz *et al.*, 2019).

Bien qu'une tendance à la sous-expression ait été observée, le transfert de microbiote fécal n'a pas eu d'impact significatif sur l'expression intestinale de *Gnat3* chez les souris MRHFD-HF. Ceci est en accord avec plusieurs études montrant que le microbiote intestinal n'aurait pas ou peu d'effet sur le métabolisme glucidique ou la sécrétion d'entérohormone (Vrieze *et al.*, 2014; Mikkelsen *et al.*, 2015).

D'après nos résultats, le microbiote intestinal dysbiotique ne semble pas constituer un facteur déterminant dans l'altération de la voie de transduction du goût sucré chez la souris.

### **Signature transcriptomique spécifique des cellules entéroendocrines dans les maladies métaboliques**

La signalisation du goût sucré et la sécrétion de GLP-1 sont réalisées dans l'intestin par les cellules entéroendocrines. Je me suis donc ensuite intéressée à la signature transcriptomique spécifiques de ces cellules dans les maladies métaboliques.

L'étude des cellules entéroendocrines est difficile car ces cellules ne représentent que 1% des cellules épithéliales intestinales et sont dispersées dans l'épithélium. Avant mon arrivée, Céline Osinski avait développé, dans l'équipe, une technique afin de trier les cellules entéroendocrines humaines à l'aide des marqueurs CD45 et CD24 à partir de fragment de jéjunum humain collectés lors de bypass gastriques. L'ARN de ces cellules a été séquencé et j'ai pu, dès le commencement de ma thèse, analyser les résultats du RNA-sequençage. J'ai ainsi mis en évidence une signature transcriptomique spécifique des cellules entéroendocrines comparées aux entérocytes. J'ai également montré que la signature transcriptomique des cellules entéroendocrines était dépendante du statut métabolique des patients, atteints d'obésité avec ou sans DT2. Le DT2, dans un contexte d'obésité, a donc un impact sur la signature transcriptomique des cellules entéroendocrines. Cette étude a été réalisée chez des sujets atteints de maladies métaboliques depuis plusieurs années et dont certains étaient traités pour le DT2. Cependant, nous n'avons pas pu analyser l'effet des

traitements ni de leur durée sur le profil transcriptomique des cellules entéroendocrines humaines car le nombre d'individus étudiés était trop faible.

J'ai adapté la méthode de tri de cellules entéroendocrines humaines au modèle murin. La muqueuse étant plus difficile à séparer de la musculature chez la souris, j'ai ajouté un marqueur, le CD326, afin de sélectionner les cellules épithéliales (Kawasaki *et al.*, 2013). Ceci m'a permis de montrer que *Gnat3* était exprimé spécifiquement dans la population de cellules entéroendocrines murines et non dans les cellules immunitaires ou les entérocytes. Ces résultats sont en accord avec les données de Jang *et al.*, qui montrent par immunohistochimie que l' $\alpha$ -gustducine, ainsi que les sous-unités  $\beta$  et  $\gamma$  de la protéine G, le récepteur T1R2/T1R3, ainsi que PLCB2 et TRPM5 sont exprimés dans les cellules entéroendocrines (Jang *et al.*, 2007). De plus, Dyer *et al.* ont montré la présence des sous-unités T1R2, T1R3 et de l' $\alpha$ -gustducine dans la lignée de cellules entéroendocrines murines STC-1 mais pas dans les lignées de cellules absorbatives entérocytaires CaCo2-TC7, IEC-6 ou FHs74Int (Dyer *et al.*, 2005). L'expression de gènes de la transduction du goût sucré dans l'épithélium intestinal correspond donc à leur expression spécifiquement dans les cellules entéroendocrines.

### **La voie intestinale de transduction du goût sucré : vers une piste thérapeutique ?**

Les traitements utilisés contre le DT2, au-delà de la metformine, consistent en des analogues stables du GLP-1 ou des inhibiteurs de la DPP-IV, l'enzyme responsable de la dégradation rapide du GLP-1. Les agonistes du récepteur au GLP-1 ont également un effet sur le poids des patients outre la diminution de la glycémie et de la pression sanguine et la protection cardiaque et rénale (Landgraf *et al.*, 2019). Le traitement principal de l'obésité consiste en une modification du mode de vie du patient afin d'induire une perte de poids. Toutefois, la chirurgie bariatrique demeure très utilisée pour réduire le poids des sujets massivement obèses et induire la rémission du DT2 (Pucci and Batterham, 2019).

Nos résultats ont montré que la voie de transduction du goût sucré était altérée dans les maladies métaboliques. Ceci participe à la diminution de la sécrétion de GLP-1 et de son effet incrétine. La littérature ne fait pas état de traitement basé sur les effets de la voie de transduction du goût sucré mais nos connaissances sur la voie de transduction du goût sucré dans les maladies métaboliques et leur rémission en fait une nouvelle cible pour des traitements des désordres métaboliques. Un tel traitement ciblant la voie de transduction du goût sucré au niveau intestinal pourrait stimuler la sécrétion endogène de GLP-1 et l'effet



incrétine et contribuer à une meilleure régulation de la glycémie des patients atteints de diabète de type 2.

Le rôle de la voie de la transduction du goût sucré dans l'absorption des glucides, via la stimulation de SGLT1 et de la translocation de GLUT2 à la membrane apicale des entérocytes, a été démontré (Smith *et al.*, 2018). Actuellement, les pistes thérapeutiques en développement visent à inhiber le récepteur T1R2/T1R3 afin de réduire l'absorption du glucose par les entérocytes et par conséquent l'apport calorique et traiter l'obésité sans considérer le diabète des patients. Par exemple, l'acide gymnémique et la ziziphine, inhibiteurs naturels d'origine végétale des récepteur T1R2-T1R3 ont été proposés à visée thérapeutique pour contrôler la glycémie (Sigoillot *et al.*, 2015). La ziziphine est extraite des feuilles du jujubier *Ziziphus jujube* (Meiselman, Halpern and Dateo, 1976) et l'acide gymnémique est le principal phytoconstituant de la plante *Gymnema sylvestre*. Ces composés entraînent une altération de la perception du goût sucré ainsi qu'une inhibition de l'absorption du glucose dans l'intestin et une réduction de la glycémie (Patel, Gadewar and Tripathi, 2012). De plus, la plante *Gymnema sylvestre* est utilisée depuis des siècles en Asie pour soigner le diabète (Sigoillot *et al.*, 2015).

**Les résultats obtenus dans le cadre de ma thèse confirment le rôle central de la voie de transduction du goût sucré dans les cellules endocrines de l'intestin dans l'homéostasie glucidique. Les maladies métaboliques entraînent une altération de cette voie de signalisation du goût sucré, ce qui contribue à la diminution de sécrétion de GLP-1 dans ces pathologies. Après remodelage intestinal, la sur-expression de l' $\alpha$ -gustducine participe à l'amélioration métabolique. La voie de transduction du goût sucré constitue donc une cible intéressante pour le développement de traitement contre les maladies métaboliques. L'utilisation de molécules permettant de stimuler la voie intestinale de transduction du goût sucré pourrait être envisagée afin de stimuler la sécrétion endogène de GLP-1 et développer un traitement pour les sujets atteints de DT2.**

# Références bibliographiques

## Références bibliographiques

- Aagaard, K. *et al.* (2014) 'The placenta harbors a unique microbiome', *Science Translational Medicine*, 6(237), p. 237ra65. doi: 10.1126/scitranslmed.3008599.
- Ahrén, B. and Schmitz, O. (2004) 'GLP-1 Receptor Agonists and DPP-4 Inhibitors in the Treatment of Type 2 Diabetes', *Hormone and Metabolic Research*, 36(11/12), pp. 867–876. doi: 10.1055/s-2004-826178.
- Alasbahi, R. H. and Melzig, M. F. (2012) 'Forskolin and derivatives as tools for studying the role of cAMP', *Die Pharmazie - An International Journal of Pharmaceutical Sciences*, 67(1), pp. 5–13. doi: 10.1691/ph.2012.1642.
- Alkafafy, M. E.-S. *et al.* (2015) 'Impact of aspartame and saccharin on the rat liver: Biochemical, molecular, and histological approach', *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*, 28(2), pp. 247–255. doi: 10.1177/0394632015586134.
- Amerongen, H. M. (2018) 'Anatomy and Histology of the Digestive Tract', in *Comprehensive Toxicology*. Elsevier, pp. 3–15. doi: 10.1016/B978-0-12-801238-3.02118-8.
- Amouyal, C. *et al.* (2020) 'A surrogate of Roux-en-Y gastric bypass (the enterogastro anastomosis surgery) regulates multiple beta-cell pathways during resolution of diabetes in ob/ob mice', *EBioMedicine*, 58. doi: 10.1016/j.ebiom.2020.102895.
- Amouyal, C. and Andreelli, F. (2012) 'Effets métaboliques des édulcorants', *réalités en nutrition et en diabétologie*, (41).
- Angrisani, L. *et al.* (2017) 'Roux-en-Y Gastric Bypass Versus Sleeve Gastrectomy as Revisional Procedures after Adjustable Gastric Band: 5-Year Outcomes', *Obesity Surgery*, 27(6), pp. 1430–1437. doi: 10.1007/s11695-016-2502-8.
- Aranias, T. *et al.* (2015) 'Lipid-rich diet enhances L-cell density in obese subjects and in mice through improved L-cell differentiation', *Journal of Nutritional Science*, 4, p. e22. doi: 10.1017/jns.2015.11.
- Aroda, V. R. (2018) 'A review of GLP-1 receptor agonists: Evolution and advancement, through the lens of randomised controlled trials', *Diabetes, Obesity and Metabolism*, 20(S1), pp. 22–33. doi: <https://doi.org/10.1111/dom.13162>.
- Arumugam, M. *et al.* (2011) 'Enterotypes of the human gut microbiome', *Nature*, 473(7346), pp. 174–180. doi: 10.1038/nature09944.
- Asfaha, S. (2015) 'Intestinal stem cells and inflammation', *Current Opinion in Pharmacology*, 25, pp. 62–66. doi: 10.1016/j.coph.2015.11.008.
- Aulinger, B. A. *et al.* (2015) 'β-Cell Sensitivity to GLP-1 in Healthy Humans Is Variable and Proportional to Insulin Sensitivity', *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 100(6), pp. 2489–2496. doi: 10.1210/jc.2014-4009.

- Aung, K. *et al.* (2014) 'Risk of Developing Diabetes and Cardiovascular Disease in Metabolically Unhealthy Normal-Weight and Metabolically Healthy Obese Individuals', *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 99(2), pp. 462–468. doi: 10.1210/jc.2013-2832.
- Avau, B. *et al.* (2015) 'The Gustatory Signaling Pathway and Bitter Taste Receptors Affect the Development of Obesity and Adipocyte Metabolism in Mice', *PLOS ONE*, 10(12), p. e0145538. doi: 10.1371/journal.pone.0145538.
- Bäckhed, F. *et al.* (2004) 'The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(44), pp. 15718–15723. doi: 10.1073/pnas.0407076101.
- Badole, S. L. *et al.* (2013) 'Oral L-glutamine increases active GLP-1 (7-36) amide secretion and improves glycemic control in streptozotocin–nicotinamide induced diabetic rats', *Chemico-Biological Interactions*, 203(2), pp. 530–541. doi: 10.1016/j.cbi.2013.02.006.
- Baggio, L. L. and Drucker, D. J. (2007) 'Biology of Incretins: GLP-1 and GIP', *Gastroenterology*, 132(6), pp. 2131–2157. doi: 10.1053/j.gastro.2007.03.054.
- Bailey, C. J. (2020) 'GIP analogues and the treatment of obesity-diabetes', *Peptides*, 125, p. 170202. doi: 10.1016/j.peptides.2019.170202.
- Bankaitis, E. D. *et al.* (2018) 'Reserve Stem Cells in Intestinal Homeostasis and Injury', *Gastroenterology*, 155(5), pp. 1348–1361. doi: 10.1053/j.gastro.2018.08.016.
- Banskota, S., Ghia, J.-E. and Khan, W. I. (2019) 'Serotonin in the gut: Blessing or a curse', *Biochimie*, 161, pp. 56–64. doi: 10.1016/j.biochi.2018.06.008.
- Barker, N. (2014) 'Adult intestinal stem cells: critical drivers of epithelial homeostasis and regeneration', *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 15(1), pp. 19–33. doi: 10.1038/nrm3721.
- Batsis, J. A. and Villareal, D. T. (2018) 'Sarcopenic obesity in older adults: aetiology, epidemiology and treatment strategies', *Nature Reviews Endocrinology*, 14(9), pp. 513–537. doi: 10.1038/s41574-018-0062-9.
- Batterham, R. L. *et al.* (2006) 'Critical role for peptide YY in protein-mediated satiation and body-weight regulation', *Cell Metabolism*, 4(3), pp. 223–233. doi: 10.1016/j.cmet.2006.08.001.
- Belloir, C., Neiers, F. and Briand, L. (2017) 'Sweeteners and sweetness enhancers', *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, 20(4), pp. 279–285. doi: 10.1097/MCO.0000000000000377.
- Beucher, A. *et al.* (2012) 'The Homeodomain-Containing Transcription Factors Arx and Pax4 Control Enteroendocrine Subtype Specification in Mice', *PLoS ONE*, 7(5). doi: 10.1371/journal.pone.0036449.

- Beumer, J. *et al.* (2018) 'Enteroendocrine cells switch hormone expression along the crypt-to-villus BMP signalling gradient', *Nature Cell Biology*, 20(8), pp. 909–916. doi: 10.1038/s41556-018-0143-y.
- Bevins, C. L. and Salzman, N. H. (2011) 'Paneth cells, antimicrobial peptides and maintenance of intestinal homeostasis', *Nature Reviews Microbiology*, 9(5), pp. 356–368. doi: 10.1038/nrmicro2546.
- Bhavsar, S., Mudaliar, S. and Cherrington, A. (2013) 'Evolution of exenatide as a diabetes therapeutic', *Current Diabetes Reviews*, 9(2), pp. 161–193. doi: 10.2174/1573399811309020007.
- Bisanz, J. E. *et al.* (2019) 'Meta-Analysis Reveals Reproducible Gut Microbiome Alterations in Response to a High-Fat Diet', *Cell Host & Microbe*, 26(2), pp. 265-272.e4. doi: 10.1016/j.chom.2019.06.013.
- Blanpain, C. (2007) 'Importance de la voie de signalisation Wnt/ $\beta$ -caténine dans l'identité, l'activation et la différenciation des cellules souches épidermiques', *médecine/sciences*, 23(1), pp. 34–36. doi: 10.1051/medsci/200723134.
- Blottière, H. M. and Doré, J. (2016) 'Impact des nouveaux outils de métagénomique sur notre connaissance du microbiote intestinal et de son rôle en santé humaine - Enjeux diagnostiques et thérapeutiques', *médecine/sciences*, 32(11), pp. 944–951. doi: 10.1051/medsci/20163211009.
- Boey, D. *et al.* (2008) 'PYY transgenic mice are protected against diet-induced and genetic obesity', *Neuropeptides*, 42(1), pp. 19–30. doi: 10.1016/j.npep.2007.11.003.
- Borody, T. J. and Khoruts, A. (2012) 'Fecal microbiota transplantation and emerging applications', *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 9(2), pp. 88–96. doi: 10.1038/nrgastro.2011.244.
- Brami, J. *et al.* (2009) 'Chirurgie de l'obésité chez l'adulte', *Haute autorité de Santé*.
- Brandt, Sara J. *et al.* (2018) 'Gut hormone polyagonists for the treatment of type 2 diabetes', *Peptides*, 100, pp. 190–201. doi: 10.1016/j.peptides.2017.12.021.
- Brandt, S. J. *et al.* (2018) 'Peptide-based multi-agonists: a new paradigm in metabolic pharmacology', *Journal of Internal Medicine*, 284(6), pp. 581–602. doi: <https://doi.org/10.1111/joim.12837>.
- Bröer, S. and Fairweather, S. J. (2018) 'Amino Acid Transport Across the Mammalian Intestine', in *Comprehensive Physiology*. American Cancer Society, pp. 343–373. doi: 10.1002/cphy.c170041.
- Brunton, S. (2016) 'Pathophysiology of Type 2 Diabetes: The Evolution of Our Understanding', *The Journal of Family Practice*, 65(4 Suppl).
- Buczacki, S. J. A. *et al.* (2013) 'Intestinal label-retaining cells are secretory precursors expressing Lgr5', *Nature*, 495(7439), pp. 65–69. doi: 10.1038/nature11965.

- Bülbring, E. and Lin, R. C. Y. (1958) 'The effect of intraluminal application of 5-hydroxytryptamine and 5-hydroxytryptophan on peristalsis; the local production of 5-HT and its release in relation to intraluminal pressure and propulsive activity', *The Journal of Physiology*, 140(3), pp. 381–407.
- Campbell, J. E. and Drucker, D. J. (2013) 'Pharmacology, Physiology, and Mechanisms of Incretin Hormone Action', *Cell Metabolism*, 17(6), pp. 819–837. doi: 10.1016/j.cmet.2013.04.008.
- Cani, P. D. and de Vos, W. M. (2017) 'Next-Generation Beneficial Microbes: The Case of Akkermansia muciniphila', *Frontiers in Microbiology*, 8, p. 1765. doi: 10.3389/fmicb.2017.01765.
- Carlson, B. M. (2019) 'The Digestive System', in *The Human Body*. Elsevier, pp. 321–355. doi: 10.1016/B978-0-12-804254-0.00012-0.
- Castillo-Azofeifa, D. et al. (2019) 'Atoh1+ secretory progenitors possess renewal capacity independent of Lgr5+ cells during colonic regeneration', *The EMBO Journal*, 38(4). doi: 10.15252/embj.201899984.
- Chabowski, A. et al. (2007) 'Evidence for concerted action of FAT/CD36 and FABPpm to increase fatty acid transport across the plasma membrane', *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 77(5), pp. 345–353. doi: 10.1016/j.plefa.2007.10.017.
- Chakraborty, R. and Das, A. (2018) 'Artificial Sweeteners', in. doi: 10.1016/B978-0-08-100596-5.21619-3.
- Chakraborty, R. and Das, A. (2019) 'Artificial Sweeteners', in Melton, L., Shahidi, F., and Varelis, P. (eds) *Encyclopedia of Food Chemistry*. Oxford: Academic Press, pp. 30–34. doi: 10.1016/B978-0-08-100596-5.21619-3.
- Chandra, R. and Liddle, R. A. (2007) 'Cholecystokinin', *Current Opinion in Endocrinology, Diabetes and Obesity*, 14(1), pp. 63–67. doi: 10.1097/MED.0b013e3280122850.
- Charles, M.-A. (2011) 'Obésité : que nous dit l'épidémiologie ?', *Cahiers de Nutrition et de Diététique*, 46(4), pp. 167–172. doi: 10.1016/j.cnd.2011.04.001.
- Chattopadhyay, S., Raychaudhuri, U. and Chakraborty, R. (2014) 'Artificial sweeteners – a review', *Journal of Food Science and Technology*, 51(4), pp. 611–621. doi: 10.1007/s13197-011-0571-1.
- Chen, C. et al. (2009) 'Pdx1 inactivation restricted to the intestinal epithelium in mice alters duodenal gene expression in enterocytes and enteroendocrine cells', *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 297(6), pp. G1126–G1137. doi: 10.1152/ajpgi.90586.2008.
- Chen, C. et al. (2018) 'Glucose and amino acid in enterocyte: absorption, metabolism and maturation', *Frontiers in Bioscience (Landmark Edition)*, 23, pp. 1721–1739. doi: 10.2741/4669.

- Cheng, C. Y. Y., Chu, J. Y. S. and Chow, B. K. C. (2011) 'Central and Peripheral Administration of Secretin Inhibits Food Intake in Mice through the Activation of the Melanocortin System', *Neuropsychopharmacology*, 36(2), pp. 459–471. doi: 10.1038/npp.2010.178.
- Choudhary, A. K. and Pretorius, E. (2017) 'Revisiting the safety of aspartame', *Nutrition Reviews*, 75(9), pp. 718–730. doi: 10.1093/nutrit/nux035.
- Christensen, H. N. (1990) 'Role of amino acid transport and countertransport in nutrition and metabolism.', *Physiological Reviews*, 70(1), pp. 43–77. doi: 10.1152/physrev.1990.70.1.43.
- Cifarelli, V. and Abumrad, N. A. (2018) 'Chapter 48 - Enterocyte Fatty Acid Handling Proteins and Chylomicron Formation', in Said, H. M. (ed.) *Physiology of the Gastrointestinal Tract (Sixth Edition)*. Academic Press, pp. 1087–1107. doi: 10.1016/B978-0-12-809954-4.00048-7.
- Clément, K. and Vignes, S. (2009) 'Inflammation, adipokines et obésité', *La Revue de Médecine Interne*, 30(9), pp. 824–832. doi: 10.1016/j.revmed.2009.03.363.
- Clevers, H. C. and Bevins, C. L. (2013) 'Paneth Cells: Maestros of the Small Intestinal Crypts', *Annual Review of Physiology*, 75(1), pp. 289–311. doi: 10.1146/annurev-physiol-030212-183744.
- Corleto, V. D. (2010) 'Somatostatin and the gastrointestinal tract', *Current Opinion in Endocrinology, Diabetes, and Obesity*, 17(1), pp. 63–68. doi: 10.1097/MED.0b013e32833463ed.
- Cui, M. *et al.* (2006) 'The Heterodimeric Sweet Taste Receptor has Multiple Potential Ligand Binding Sites', *Current Pharmaceutical Design*, 12(35), pp. 4591–4600. doi: 10.2174/138161206779010350.
- Cummings, D. E. *et al.* (2001) 'A Preprandial Rise in Plasma Ghrelin Levels Suggests a Role in Meal Initiation in Humans', *Diabetes*, 50(8), pp. 1714–1719. doi: 10.2337/diabetes.50.8.1714.
- Dal Gobbo, H. and Bétry, C. (2018) 'L'actualité de l'indice glycémique', *Médecine des Maladies Métaboliques*, 12(5), pp. 418–422. doi: 10.1016/S1957-2557(18)30116-0.
- Dao, M. C. *et al.* (2016) 'Akkermansia muciniphila and improved metabolic health during a dietary intervention in obesity: relationship with gut microbiome richness and ecology', *Gut*, 65(3), pp. 426–436. doi: 10.1136/gutjnl-2014-308778.
- Daoudi, M. *et al.* (2011) 'PPAR $\beta/\delta$  Activation Induces Enteroendocrine L Cell GLP-1 Production', *Gastroenterology*, 140(5), pp. 1564–1574. doi: 10.1053/j.gastro.2011.01.045.
- Darwich, A. S. *et al.* (2014) 'Meta-Analysis of the Turnover of Intestinal Epithelia in Preclinical Animal Species and Humans', *Drug Metabolism and Disposition*, 42(12), pp. 2016–2022. doi: 10.1124/dmd.114.058404.
- Dave, M. *et al.* (2012) 'The human gut microbiome: current knowledge, challenges, and future directions', *Translational Research: The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 160(4), pp. 246–257. doi: 10.1016/j.trsl.2012.05.003.

- David, C. and Boinet, T. (2018) 'Diabète de type 2 non équilibré et haut risque cardiovasculaire', *Actualités Pharmaceutiques*, 57(573), pp. 14–17. doi: 10.1016/j.actpha.2017.11.022.
- Day, J. W. *et al.* (2009) 'A new glucagon and GLP-1 co-agonist eliminates obesity in rodents', *Nature Chemical Biology*, 5(10), pp. 749–757. doi: 10.1038/nchembio.209.
- De Lorenzo, A. *et al.* (2007) 'Normal-weight obese syndrome: early inflammation?', *The American Journal of Clinical Nutrition*, 85(1), pp. 40–45. doi: 10.1093/ajcn/85.1.40.
- Deacon, C. F. (2011) 'Dipeptidyl peptidase-4 inhibitors in the treatment of type 2 diabetes: a comparative review', *Diabetes, Obesity and Metabolism*, 13(1), pp. 7–18. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1463-1326.2010.01306.x>.
- Deacon, C. F., Johnsen, A. H. and Holst, J. J. (1995) 'Degradation of glucagon-like peptide-1 by human plasma in vitro yields an N-terminally truncated peptide that is a major endogenous metabolite in vivo', *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 80(3), pp. 952–957. doi: 10.1210/jcem.80.3.7883856.
- Debédât, J. *et al.* (2018) 'Long-term Relapse of Type 2 Diabetes After Roux-en-Y Gastric Bypass: Prediction and Clinical Relevance', *Diabetes Care*, 41(10), pp. 2086–2095. doi: 10.2337/dc18-0567.
- Debédât, J., Clément, K. and Aron-Wisnewsky, J. (2019) 'Gut Microbiota Dysbiosis in Human Obesity: Impact of Bariatric Surgery', *Current Obesity Reports*, 8(3), pp. 229–242. doi: 10.1007/s13679-019-00351-3.
- Deckmann, K. *et al.* (2014) 'Bitter triggers acetylcholine release from polymodal urethral chemosensory cells and bladder reflexes', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(22), pp. 8287–8292. doi: 10.1073/pnas.1402436111.
- Depoortere, I. (2014) 'Taste receptors of the gut: emerging roles in health and disease', *Gut*, 63(1), pp. 179–190. doi: 10.1136/gutjnl-2013-305112.
- Desai, S. *et al.* (2008) 'Nkx2.2 regulates cell fate choice in the enteroendocrine cell lineages of the intestine', *Developmental biology*, 313(1), pp. 58–66. doi: 10.1016/j.ydbio.2007.09.047.
- Dhurandhar, D., Bharihoke, V. and Kalra, S. (2018) 'A histological assessment of effects of sucralose on liver of albino rats', *Morphologie*, 102(338), pp. 197–204. doi: 10.1016/j.morpho.2018.07.003.
- DiMeglio, L. A., Evans-Molina, C. and Oram, R. A. (2018) 'Type 1 diabetes', *The Lancet*, 391(10138), pp. 2449–2462. doi: 10.1016/S0140-6736(18)31320-5.
- Dimitriadis, G. K., Randeve, M. S. and Miras, A. D. (2017) 'Potential Hormone Mechanisms of Bariatric Surgery', *Current Obesity Reports*, 6(3), pp. 253–265. doi: 10.1007/s13679-017-0276-5.



- Ding, C., Chan, Z. and Magkos, F. (2016) 'Lean, but not healthy: the "metabolically obese, normal-weight" phenotype', *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, 19(6), pp. 408–417. doi: 10.1097/MCO.0000000000000317.
- Ding, K.-H. *et al.* (2018) 'Amino acids as signaling molecules modulating bone turnover', *Bone*, 115, pp. 15–24. doi: 10.1016/j.bone.2018.02.028.
- Drover, V. A. *et al.* (2005) 'CD36 deficiency impairs intestinal lipid secretion and clearance of chylomicrons from the blood', *Journal of Clinical Investigation*, 115(5), pp. 1290–1297. doi: 10.1172/JCI200521514.
- Dyer, J. *et al.* (2005) 'Expression of sweet taste receptors of the T1R family in the intestinal tract and enteroendocrine cells', *Biochemical Society Transactions*, 33(1), pp. 302–305. doi: 10.1042/BST0330302.
- Færch, K. *et al.* (2015) 'GLP-1 Response to Oral Glucose Is Reduced in Prediabetes, Screen-Detected Type 2 Diabetes, and Obesity and Influenced by Sex: The ADDITION-PRO Study', *Diabetes*, 64(7), pp. 2513–2525. doi: 10.2337/db14-1751.
- Fakhry, J. *et al.* (2017) 'Distribution and characterisation of CCK containing enteroendocrine cells of the mouse small and large intestine', *Cell and Tissue Research*, 369(2), pp. 245–253. doi: 10.1007/s00441-017-2612-1.
- Faucher, P. and Poitou, C. (2016) 'Physiopathologie de l'obésité', *Revue du Rhumatisme Monographies*, 83(1), pp. 6–12. doi: 10.1016/j.monrhu.2015.08.002.
- Feng, P. *et al.* (2018) 'Aggravated gut inflammation in mice lacking the taste signaling protein  $\alpha$ -gustducin', *Brain, Behavior, and Immunity*, 71, pp. 23–27. doi: 10.1016/j.bbi.2018.04.010.
- Finger, T. E. *et al.* (2005) 'ATP Signaling Is Crucial for Communication from Taste Buds to Gustatory Nerves', *Science*, 310(5753), pp. 1495–1499. doi: 10.1126/science.1118435.
- Flock, G., Cao, X. and Drucker, D. J. (2005) 'Pdx-1 is not sufficient for repression of proglucagon gene transcription in islet or enteroendocrine cells', *Endocrinology*, 146(1), pp. 441–449. doi: 10.1210/en.2004-0495.
- Ford, H. E. *et al.* (2011) 'Effects of oral ingestion of sucralose on gut hormone response and appetite in healthy normal-weight subjects', *European Journal of Clinical Nutrition*, 65(4), pp. 508–513. doi: 10.1038/ejcn.2010.291.
- Fre, S. *et al.* (2005) 'Notch signals control the fate of immature progenitor cells in the intestine', *Nature*, 435(7044), pp. 964–968. doi: 10.1038/nature03589.
- Fre, S. *et al.* (2011) 'Notch signaling in intestinal homeostasis across species: the cases of *Drosophila*, Zebrafish and the mouse', *Experimental Cell Research*, 317(19), pp. 2740–2747. doi: 10.1016/j.yexcr.2011.06.012.
- Fujisaka, S. *et al.* (2020) 'Bofutsushosan improves gut barrier function with a bloom of *Akkermansia muciniphila* and improves glucose metabolism in mice with diet-induced obesity', *Scientific Reports*, 10(1), p. 5544. doi: 10.1038/s41598-020-62506-w.

- Gagnon, J. *et al.* (2015) 'Ghrelin Is a Novel Regulator of GLP-1 Secretion', *Diabetes*, 64(5), pp. 1513–1521. doi: 10.2337/db14-1176.
- Gautier, J.-F., Choukem, S.-P. and Girard, J. (2008) 'Physiology of incretins (GIP and GLP-1) and abnormalities in type 2 diabetes', *Diabetes & Metabolism*, 34, pp. S65–S72. doi: 10.1016/S1262-3636(08)73397-4.
- Gehart, H. *et al.* (2019) 'Identification of Enteroendocrine Regulators by Real-Time Single-Cell Differentiation Mapping', *Cell*, 176(5), pp. 1158–1173.e16. doi: 10.1016/j.cell.2018.12.029.
- Gehart, H. and Clevers, H. (2019) 'Tales from the crypt: new insights into intestinal stem cells', *Nature Reviews. Gastroenterology & Hepatology*, 16(1), pp. 19–34. doi: 10.1038/s41575-018-0081-y.
- Geraedts, M. C. P. *et al.* (2012) 'Transformation of postingestive glucose responses after deletion of sweet taste receptor subunits or gastric bypass surgery', *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 303(4), pp. E464–E474. doi: 10.1152/ajpendo.00163.2012.
- Geraedts, M. C. P., Troost, F. J. and Saris, W. H. M. (2011) 'Different tastants and low-caloric sweeteners induce differential effects on the release of satiety hormones', *Food Chemistry*, 129(3), pp. 731–738. doi: 10.1016/j.foodchem.2011.05.013.
- Gerbe, F. *et al.* (2016) 'Intestinal epithelial tuft cells initiate type 2 mucosal immunity to helminth parasites', *Nature*, 529(7585), pp. 226–230. doi: 10.1038/nature16527.
- Gerspach, A. C. *et al.* (2011) 'The role of the gut sweet taste receptor in regulating GLP-1, PYY, and CCK release in humans', *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 301(2), pp. E317–E325. doi: 10.1152/ajpendo.00077.2011.
- Gerwig, G. J. *et al.* (2016) 'Chapter One - Stevia Glycosides: Chemical and Enzymatic Modifications of Their Carbohydrate Moieties to Improve the Sweet-Tasting Quality', in Baker, D. C. (ed.) *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*. Academic Press, pp. 1–72. doi: 10.1016/bs.accb.2016.05.001.
- Glatz, J. F. C. and Luiken, J. J. F. P. (2018) 'Dynamic role of the transmembrane glycoprotein CD36 (SR-B2) in cellular fatty acid uptake and utilization', *Journal of Lipid Research*, 59(7), pp. 1084–1093. doi: 10.1194/jlr.R082933.
- Goldenberg, R. M. and Steen, O. (2019) 'Semaglutide: Review and Place in Therapy for Adults With Type 2 Diabetes', *Canadian Journal of Diabetes*, 43(2), pp. 136–145. doi: 10.1016/j.jcjd.2018.05.008.
- Gonkowski, S. and Rytel, L. (2019) 'Somatostatin as an Active Substance in the Mammalian Enteric Nervous System', *International Journal of Molecular Sciences*, 20(18). doi: 10.3390/ijms20184461.

- Gorboulev, V. *et al.* (2012) 'Na<sup>+</sup>-d-glucose Cotransporter SGLT1 is Pivotal for Intestinal Glucose Absorption and Glucose-Dependent Incretin Secretion', *Diabetes*, 61(1), pp. 187–196. doi: 10.2337/db11-1029.
- Gradwohl, G. *et al.* (2000) 'neurogenin3 is required for the development of the four endocrine cell lineages of the pancreas', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(4), pp. 1607–1611.
- Greenwood-Van Meerveld, B., Johnson, A. C. and Grundy, D. (2017) 'Gastrointestinal Physiology and Function', in Greenwood-Van Meerveld, B. (ed.) *Gastrointestinal Pharmacology*. Cham: Springer International Publishing (Handbook of Experimental Pharmacology), pp. 1–16. doi: 10.1007/164\_2016\_118.
- Gribble, F. M. and Reimann, F. (2019) 'Function and mechanisms of enteroendocrine cells and gut hormones in metabolism', *Nature Reviews Endocrinology*, 15(4), pp. 226–237. doi: 10.1038/s41574-019-0168-8.
- Groop, L. *et al.* (1993) 'Insulin resistance, hypertension and microalbuminuria in patients with Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus', *Diabetologia*, 36(7), pp. 642–647. doi: 10.1007/BF00404074.
- Groschwitz, K. R. and Hogan, S. P. (2009) 'Intestinal barrier function: Molecular regulation and disease pathogenesis', *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 124(1), pp. 3–20. doi: 10.1016/j.jaci.2009.05.038.
- Guedes, E. P. *et al.* (2013) 'Linagliptin: pharmacology, efficacy and safety in type 2 diabetes treatment', *Diabetology & Metabolic Syndrome*, 5, p. 25. doi: 10.1186/1758-5996-5-25.
- Gui, X. *et al.* (2017) 'Differing expression profiles of *Notch* /enterocyte and *Wnt* /secretory lineage signalling are associated with morphological diversity of appendiceal tumours', *Journal of Clinical Pathology*, 70(1), pp. 40–50. doi: 10.1136/jclinpath-2016-203645.
- Guida, C. and Ramracheya, R. (2020) 'PYY, a Therapeutic Option for Type 2 Diabetes?', *Clinical Medicine Insights. Endocrinology and Diabetes*, 13, p. 1179551419892985. doi: 10.1177/1179551419892985.
- Gupta, K. and Raja, A. (2020) 'Physiology, Gastric Inhibitory Peptide', in *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK546653/> (Accessed: 7 May 2020).
- Guy-Grand, B. (2008) 'Les sucres dans l'alimentation: de quoi parle-t-on?', *Cahiers de Nutrition et de Diététique*, 43, pp. 2S7-2S11. doi: 10.1016/S0007-9960(08)71549-9.
- Haber, A. L. *et al.* (2017) 'A single-cell survey of the small intestinal epithelium', *Nature*, 551(7680), pp. 333–339. doi: 10.1038/nature24489.
- Habib, A. M. *et al.* (2012) 'Overlap of Endocrine Hormone Expression in the Mouse Intestine Revealed by Transcriptional Profiling and Flow Cytometry', *Endocrinology*, 153(7), pp. 3054–3065. doi: 10.1210/en.2011-2170.

- Habib, A. M. *et al.* (2013) 'Co-localisation and secretion of glucagon-like peptide 1 and peptide YY from primary cultured human L cells', *Diabetologia*, 56(6), pp. 1413–1416. doi: 10.1007/s00125-013-2887-z.
- Harada, N. *et al.* (2011) 'Plasma gastric inhibitory polypeptide and glucagon-like peptide-1 levels after glucose loading are associated with different factors in Japanese subjects', *Journal of Diabetes Investigation*, 2(3), pp. 193–199. doi: 10.1111/j.2040-1124.2010.00078.x.
- Hayakawa, Y. *et al.* (2016) 'Gastrin and upper GI cancers', *Current Opinion in Pharmacology*, 31, pp. 31–37. doi: 10.1016/j.coph.2016.08.013.
- Heianza, Y. *et al.* (2014) 'Metabolically Healthy Obesity, Presence or Absence of Fatty Liver, and Risk of Type 2 Diabetes in Japanese Individuals: Toranomon Hospital Health Management Center Study 20 (TOPICS 20)', *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 99(8), pp. 2952–2960. doi: 10.1210/jc.2013-4427.
- Henning, R. J. (2018) 'Type-2 diabetes mellitus and cardiovascular disease', *Future Cardiology*, 14(6), pp. 491–509. doi: 10.2217/fca-2018-0045.
- Herman, G. A. *et al.* (2006) 'Pharmacokinetics and Pharmacodynamic Effects of the Oral DPP-4 Inhibitor Sitagliptin in Middle-Aged Obese Subjects', *The Journal of Clinical Pharmacology*, 46(8), pp. 876–886. doi: <https://doi.org/10.1177/0091270006289850>.
- Hernandez, A. F. *et al.* (2018) 'Albiglutide and cardiovascular outcomes in patients with type 2 diabetes and cardiovascular disease (Harmony Outcomes): a double-blind, randomised placebo-controlled trial', *The Lancet*, 392(10157), pp. 1519–1529. doi: 10.1016/S0140-6736(18)32261-X.
- Herrera Moro Chao, D. *et al.* (2016) 'Impact of obesity on taste receptor expression in extra-oral tissues: emphasis on hypothalamus and brainstem', *Scientific Reports*, 6. doi: 10.1038/srep29094.
- Hildebrandt, M. A. *et al.* (2009) 'High-Fat Diet Determines the Composition of the Murine Gut Microbiome Independently of Obesity', *Gastroenterology*, 137(5), pp. 1716-1724.e2. doi: 10.1053/j.gastro.2009.08.042.
- Hill, M. E., Asa, S. L. and Drucker, D. J. (1999) 'Essential Requirement for Pax 6 in Control of Enteroendocrine Proglucagon Gene Transcription', *Molecular Endocrinology*, 13(9), pp. 1474–1486. doi: 10.1210/mend.13.9.0340.
- Hira, T., Pinyo, J. and Hara, H. (2020) 'What Is GLP-1 Really Doing in Obesity?', *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 31(2), pp. 71–80. doi: 10.1016/j.tem.2019.09.003.
- Hisatsune, C. *et al.* (2007) 'Abnormal Taste Perception in Mice Lacking the Type 3 Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptor\*', *Journal of Biological Chemistry*, 282(51), pp. 37225–37231. doi: 10.1074/jbc.M705641200.

- Holst, J. J. and Deacon, C. F. (2013) 'Is there a place for incretin therapies in obesity and prediabetes?', *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 24(3), pp. 145–152. doi: 10.1016/j.tem.2013.01.004.
- Holst, J. J. and Rosenkilde, M. M. (2020) 'GIP as a Therapeutic Target in Diabetes and Obesity: Insight From Incretin Co-agonists', *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 105(8), pp. e2710–e2716. doi: 10.1210/clinem/dgaa327.
- Holstein, A. F. *et al.* (1996) 'Myofibroblasts in the lamina propria of human semi-niferous tubules are dynamic structures of heterogeneous phenotype', *Archives of Histology and Cytology*, 59(2), pp. 109–125. doi: 10.1679/aohc.59.109.
- Hopkins, M. J., Sharp, R. and Macfarlane, G. T. (2002) 'Variation in human intestinal microbiota with age', *Digestive and Liver Disease: Official Journal of the Italian Society of Gastroenterology and the Italian Association for the Study of the Liver*, 34 Suppl 2, pp. S12-18. doi: 10.1016/s1590-8658(02)80157-8.
- Huque, T., Brand, J. G. and Rabinowitz, J. L. (1992) 'Metabolism of inositol-1,4,5-trisphosphate in the taste organ of the channel catfish, *Ictalurus punctatus*', *Comparative Biochemistry and Physiology. B, Comparative Biochemistry*, 102(4), pp. 833–839. doi: 10.1016/0305-0491(92)90088-9.
- Hyun, Y. J. *et al.* (2008) 'Atherogenicity of LDL and Unfavorable Adipokine Profile in Metabolically Obese, Normal-weight Woman', *Obesity*, 16(4), pp. 784–789. doi: <https://doi.org/10.1038/oby.2007.127>.
- Iqbal, J. and Hussain, M. M. (2009) 'Intestinal lipid absorption', *Endocrinol Metab*, 296, p. 12.
- Jackson, R. S. *et al.* (1997) 'Obesity and impaired prohormone processing associated with mutations in the human prohormone convertase 1 gene', *Nature Genetics*, 16(3), pp. 303–306. doi: 10.1038/ng0797-303.
- Jang, H.-J. *et al.* (2007) 'Gut-expressed gustducin and taste receptors regulate secretion of glucagon-like peptide-1', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(38), pp. 15069–15074. doi: 10.1073/pnas.0706890104.
- Jarriault, S. *et al.* (1995) 'Signalling downstream of activated mammalian Notch', *Nature*, 377(6547), pp. 355–358. doi: 10.1038/377355a0.
- Jenny, M. *et al.* (2002) 'Neurogenin3 is differentially required for endocrine cell fate specification in the intestinal and gastric epithelium', *The EMBO journal*, 21(23), pp. 6338–6347. doi: 10.1093/emboj/cdf649.
- Jensen, J. *et al.* (2000) 'Control of endodermal endocrine development by Hes-1', *Nature Genetics*, 24(1), pp. 36–44. doi: 10.1038/71657.
- Jepeal, L. I. *et al.* (2005) 'Cell-Specific Expression of Glucose-Dependent-Insulinotropic Polypeptide Is Regulated by the Transcription Factor PDX-1', *Endocrinology*, 146(1), pp. 383–391. doi: 10.1210/en.2004-0223.

- Jirapinyo, P. *et al.* (2018) 'A Meta-Analysis of GLP-1 After Roux-En-Y Gastric Bypass: Impact of Surgical Technique and Measurement Strategy', *Obesity Surgery*, 28(3), pp. 615–626. doi: 10.1007/s11695-017-2913-1.
- Jones, M. B., Siderovski, D. P. and Hooks, S. B. (2004) 'The gβγ Dimer as a Novel Source of Selectivity in G-Protein Signaling: GGL-ing AT CONVENTION', *Molecular Interventions*, 4(4), p. 200. doi: 10.1124/mi.4.4.4.
- Julia, C. and Hercberg, S. (2016) 'Épidémiologie de l'obésité en France', *Revue du Rhumatisme Monographies*, 83(1), pp. 2–5. doi: 10.1016/j.monrhu.2015.12.001.
- Julio-Pieper, M. and Bravo, J. A. (2016) 'Chapter Six - Intestinal Barrier and Behavior', in Cryan, J. F. and Clarke, G. (eds) *International Review of Neurobiology*. Academic Press (Gut Microbiome and Behavior), pp. 127–141. doi: 10.1016/bs.irn.2016.08.006.
- Kahn, S. E., Cooper, M. E. and Del Prato, S. (2014) 'Pathophysiology and treatment of type 2 diabetes: perspectives on the past, present, and future', *The Lancet*, 383(9922), pp. 1068–1083. doi: 10.1016/S0140-6736(13)62154-6.
- Kandasamy, P. *et al.* (2018) 'Amino acid transporters revisited: New views in health and disease', *Trends in Biochemical Sciences*, 43(10), pp. 752–789. doi: 10.1016/j.tibs.2018.05.003.
- KANETO, A. *et al.* (1969) 'Stimulation of Insulin Secretion by the C-Terminal Tetrapeptide Amide of Gastrin', *Endocrinology*, 84(5), pp. 1098–1106. doi: 10.1210/endo-84-5-1098.
- Kararli, T. T. (1995) 'Comparison of the gastrointestinal anatomy, physiology, and biochemistry of humans and commonly used laboratory animals', *Biopharmaceutics & Drug Disposition*, 16(5), pp. 351–380. doi: 10.1002/bdd.2510160502.
- Kawasaki, H. *et al.* (2013) 'Characterization of anoikis-resistant cells in mouse colonic epithelium', *The Journal of Veterinary Medical Science*, 75(9), pp. 1173–1180. doi: 10.1292/jvms.13-0005.
- Kellett, G. L. *et al.* (2008) 'Sugar absorption in the intestine: the role of GLUT2', *Annual Review of Nutrition*, 28, pp. 35–54. doi: 10.1146/annurev.nutr.28.061807.155518.
- Kellett, G. L. and Brot-Laroche, E. (2005) 'Apical GLUT2: A Major Pathway of Intestinal Sugar Absorption', *Diabetes*, 54(10), pp. 3056–3062. doi: 10.2337/diabetes.54.10.3056.
- Kiela, P. R. and Ghishan, F. K. (2016) 'Physiology of Intestinal Absorption and Secretion', *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, 30(2), pp. 145–159. doi: 10.1016/j.bpg.2016.02.007.
- Kim, H. Y. *et al.* (2014) 'Interleukin-17-producing innate lymphoid cells and the NLRP3 inflammasome facilitate obesity-associated airway hyperreactivity', *Nature Medicine*, 20(1), pp. 54–61. doi: 10.1038/nm.3423.
- Knop, F. K. *et al.* (2007) 'The insulinotropic effect of GIP is impaired in patients with chronic pancreatitis and secondary diabetes mellitus as compared to patients with chronic

pancreatitis and normal glucose tolerance', *Regulatory Peptides*, 144(1), pp. 123–130. doi: 10.1016/j.regpep.2007.07.002.

Knop, F. K. *et al.* (2012) 'Impaired incretin effect and fasting hyperglucagonaemia characterizing type 2 diabetic subjects are early signs of dysmetabolism in obesity', *Diabetes, Obesity and Metabolism*, 14(6), pp. 500–510. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1463-1326.2011.01549.x>.

Kojima, M. *et al.* (1999) 'Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach', *Nature*, 402(6762), pp. 656–660. doi: 10.1038/45230.

Kokrashvili, Z., Mosinger, B. and Margolskee, R. F. (2009) 'Taste signaling elements expressed in gut enteroendocrine cells regulate nutrient-responsive secretion of gut hormones', *The American Journal of Clinical Nutrition*, 90(3), pp. 822S–825S. doi: 10.3945/ajcn.2009.27462T.

Krakauer, N. Y. and Krakauer, J. C. (2012) 'A New Body Shape Index Predicts Mortality Hazard Independently of Body Mass Index', *PLOS ONE*, 7(7), p. e39504. doi: 10.1371/journal.pone.0039504.

Kramer, Ij. M. (2016) 'Chapter 12 - WNT Signaling and the Regulation of Cell Adhesion and Differentiation', in Kramer, Ij. M. (ed.) *Signal Transduction (Third Edition)*. Boston: Academic Press, pp. 703–740. doi: 10.1016/B978-0-12-394803-8.00012-7.

Kuhn, C. *et al.* (2004) 'Bitter Taste Receptors for Saccharin and Acesulfame K', *Journal of Neuroscience*, 24(45), pp. 10260–10265. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1225-04.2004.

Kuhre, R. E. *et al.* (2015) 'Molecular Mechanisms of Glucose-Stimulated GLP-1 Secretion From Perfused Rat Small Intestine', *Diabetes*, 64(2), pp. 370–382. doi: 10.2337/db14-0807.

Kundu, P. *et al.* (2017) 'Our Gut Microbiome: The Evolving Inner Self', *Cell*, 171(7), pp. 1481–1493. doi: 10.1016/j.cell.2017.11.024.

Laffitte, A., Neiers, F. and Briand, L. (2014) 'Functional roles of the sweet taste receptor in oral and extraoral tissues', *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care*, 17(4), pp. 379–385. doi: 10.1097/MCO.000000000000058.

Landgraf, R. *et al.* (2019) 'Therapy of Type 2 Diabetes', *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes*, 127, pp. S73–S92. doi: 10.1055/a-1018-9106.

Larder, R., Lim, C. T. and Coll, A. P. (2014) 'Chapter 6 - Genetic aspects of human obesity', in Fliers, E., Korbonits, M., and Romijn, J. A. (eds) *Handbook of Clinical Neurology*. Elsevier (Clinical Neuroendocrinology), pp. 93–106. doi: 10.1016/B978-0-444-59602-4.00006-X.

Larraufie, P. *et al.* (2019) 'Important Role of the GLP-1 Axis for Glucose Homeostasis after Bariatric Surgery', *Cell Reports*, 26(6), pp. 1399–1408.e6. doi: 10.1016/j.celrep.2019.01.047.

Larsson, L.-I. *et al.* (1998) 'Pax 4 and 6 regulate gastrointestinal endocrine cell development', *Mechanisms of Development*, 79(1–2), pp. 153–159. doi: 10.1016/S0925-4773(98)00182-8.

- Le Roy, T. *et al.* (2019) 'Comparative Evaluation of Microbiota Engraftment Following Fecal Microbiota Transfer in Mice Models: Age, Kinetic and Microbial Status Matter', *Frontiers in Microbiology*, 9. doi: 10.3389/fmicb.2018.03289.
- Lecerf, J.-M. (2007) 'La signification et l'intérêt de l'index glycémique', *SCIENCES DES ALIMENTS*, 27.
- Lecleire, S. (2008) 'Digestion et absorption des nutriments', *Cahiers de Nutrition et de Diététique*, 43(1), pp. 45–50. doi: 10.1016/S0007-9960(08)70279-7.
- Leturque, A., Brot-Laroche, E. and Le Gall, M. (2012) 'Carbohydrate intake', *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, 108, pp. 113–127. doi: 10.1016/B978-0-12-398397-8.00005-8.
- Lewis, A. J. and Southern, L. L. (2000) *Swine Nutrition*. CRC Press.
- Ley, R. E. *et al.* (2005) 'Obesity alters gut microbial ecology', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(31), pp. 11070–11075. doi: 10.1073/pnas.0504978102.
- Ley, R. E. *et al.* (2006) 'Human gut microbes associated with obesity', *Nature*, 444(7122), pp. 1022–1023. doi: 10.1038/4441022a.
- Li, H. J. *et al.* (2019) 'Intestinal Neurod1 expression impairs paneth cell differentiation and promotes enteroendocrine lineage specification', *Scientific Reports*, 9. doi: 10.1038/s41598-019-55292-7.
- Li, J. *et al.* (2016) 'An obligatory role for neurotensin in high-fat-diet-induced obesity', *Nature*, 533(7603), pp. 411–415. doi: 10.1038/nature17662.
- Li, J. *et al.* (2020) 'Absence of neurotensin attenuates intestinal dysbiosis and inflammation by maintaining Mmp7/ $\alpha$ -defensin axis in diet-induced obese mice', *The FASEB Journal*, 34(6), pp. 8596–8610. doi: <https://doi.org/10.1096/fj.201902374RR>.
- Lim, S. *et al.* (2010) 'Sarcopenic Obesity: Prevalence and Association With Metabolic Syndrome in the Korean Longitudinal Study on Health and Aging (KLoSHA)', *Diabetes Care*, 33(7), pp. 1652–1654. doi: 10.2337/dc10-0107.
- Liu, T. *et al.* (2012) 'Pax6 Directly Down-Regulates Pcsk1n Expression Thereby Regulating PC1/3 Dependent Proinsulin Processing', *PLOS ONE*, 7(10), p. e46934. doi: 10.1371/journal.pone.0046934.
- Liu, X. *et al.* (2015) 'Expression of bitter taste receptor Tas2r105 in mouse kidney', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 458(4), pp. 733–738. doi: 10.1016/j.bbrc.2015.01.089.
- Ma, J. *et al.* (2009) 'Effect of the artificial sweetener, sucralose, on gastric emptying and incretin hormone release in healthy subjects', *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 296(4), pp. G735–G739. doi: 10.1152/ajpgi.90708.2008.



- Magnuson, B. A., Roberts, A. and Nestmann, E. R. (2017) 'Critical review of the current literature on the safety of sucralose', *Food and Chemical Toxicology*, 106, pp. 324–355. doi: 10.1016/j.fct.2017.05.047.
- Mak, D.-O. D. and Foskett, J. K. (2015) 'Inositol 1,4,5-trisphosphate Receptors in the Endoplasmic Reticulum: a Single-channel Point of View', *Cell calcium*, 58(1), pp. 67–78. doi: 10.1016/j.ceca.2014.12.008.
- Margolskee, R. F. (2002) 'Molecular Mechanisms of Bitter and Sweet Taste Transduction \*', *Journal of Biological Chemistry*, 277(1), pp. 1–4. doi: 10.1074/jbc.R100054200.
- Margolskee, R. F. *et al.* (2007) 'T1R3 and gustducin in gut sense sugars to regulate expression of Na<sup>+</sup>-glucose cotransporter 1', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(38), pp. 15075–15080. doi: 10.1073/pnas.0706678104.
- Martin, B. *et al.* (2009) 'Modulation of taste sensitivity by GLP-1 signaling in taste buds', *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1170, pp. 98–101. doi: 10.1111/j.1749-6632.2009.03920.x.
- Masson, C. J. *et al.* (2010) 'Fatty Acid- and Cholesterol Transporter Protein Expression along the Human Intestinal Tract', *PLOS ONE*, 5(4), p. e10380. doi: 10.1371/journal.pone.0010380.
- Mcintyre, N., Holdsworth, C. D. and Turner, D. S. (1964) 'NEW INTERPRETATION OF ORAL GLUCOSE TOLERANCE', *Lancet (London, England)*, 2(7349), pp. 20–21. doi: 10.1016/s0140-6736(64)90011-x.
- McLaughlin, S. K., McKinnon, P. J. and Margolskee, R. F. (1992) 'Gustducin is a taste-cell-specific G protein closely related to the transducins', *Nature*, 357(6379), pp. 563–569. doi: 10.1038/357563a0.
- Meiselman, H. L., Halpern, B. P. and Dateo, G. P. (1976) 'Reduction of sweetness judgements by extracts from the leaves of *Ziziphus jujuba*', *Physiology & Behavior*, 17(2), pp. 313–317. doi: 10.1016/0031-9384(76)90081-0.
- Melander, O. *et al.* (2012) 'Plasma proneurotensin and incidence of diabetes, cardiovascular disease, breast cancer, and mortality', *JAMA*, 308(14), pp. 1469–1475. doi: 10.1001/jama.2012.12998.
- Mentlein, R., Gallwitz, B. and Schmidt, W. E. (1993) 'Dipeptidyl-peptidase IV hydrolyses gastric inhibitory polypeptide, glucagon-like peptide-1(7–36)amide, peptide histidine methionine and is responsible for their degradation in human serum', *European Journal of Biochemistry*, 214(3), pp. 829–835. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1993.tb17986.x>.
- Meyer, G. W. *et al.* (1986) 'Muscle Anatomy of the Human Esophagus', *Journal of Clinical Gastroenterology*, 8(2), pp. 131–134. doi: 10.1097/00004836-198604000-00005.
- Mikkelsen, K. H. *et al.* (2015) 'Effect of Antibiotics on Gut Microbiota, Gut Hormones and Glucose Metabolism', *PLOS ONE*, 10(11), p. e0142352. doi: 10.1371/journal.pone.0142352.

- Miller, K. W. and Small, D. M. (1983) *Triolein-cholesteryl oleate-cholesterol-lecithin emulsions: structural models of triglyceride-rich lipoproteins*. American Chemical Society. doi: 10.1021/bi00271a030.
- Miyawaki, K. *et al.* (2002) 'Inhibition of gastric inhibitory polypeptide signaling prevents obesity', *Nature Medicine*, 8(7), pp. 738–742. doi: 10.1038/nm727.
- Mohammad, S. (2016) 'GPR40 Agonists for the Treatment of Type 2 Diabetes Mellitus: Benefits and Challenges', *Current Drug Targets*, 17(11), pp. 1292–1300.
- Mokadem, M. *et al.* (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), pp. 191–201. doi: 10.1016/j.molmet.2013.11.010.
- Monnier, L. and Colette, C. (2010) 'Les édulcorants : effets métaboliques et sur la santé: Sweeteners: Metabolic effects and health considerations', *Médecine des Maladies Métaboliques*, 4(5), pp. 537–542. doi: 10.1016/S1957-2557(10)70119-X.
- Monteiro-Sepulveda, M. *et al.* (2015) 'Jejunal T Cell Inflammation in Human Obesity Correlates with Decreased Enterocyte Insulin Signaling', *Cell Metabolism*, 22(1), pp. 113–124. doi: 10.1016/j.cmet.2015.05.020.
- Mori–Akiyama, Y. *et al.* (2007) 'SOX9 Is Required for the Differentiation of Paneth Cells in the Intestinal Epithelium', *Gastroenterology*, 133(2), pp. 539–546. doi: 10.1053/j.gastro.2007.05.020.
- Moss, C. E. *et al.* (2016) 'Lipid derivatives activate GPR119 and trigger GLP-1 secretion in primary murine L-cells', *Peptides*, 77, pp. 16–20. doi: 10.1016/j.peptides.2015.06.012.
- Mowat, A. M. and Agace, W. W. (2014) 'Regional specialization within the intestinal immune system', *Nature Reviews Immunology*, 14(10), pp. 667–685. doi: 10.1038/nri3738.
- Mu, H. and Høy, C.-E. (2004) 'The digestion of dietary triacylglycerols', *Progress in Lipid Research*, 43(2), pp. 105–133. doi: 10.1016/s0163-7827(03)00050-x.
- Mueckler, M. and Thorens, B. (2013) 'The SLC2 (GLUT) family of membrane transporters', *Molecular Aspects of Medicine*, 34(2), pp. 121–138. doi: 10.1016/j.mam.2012.07.001.
- Müller, T. D. *et al.* (2017) 'The New Biology and Pharmacology of Glucagon', *Physiological Reviews*, 97(2), pp. 721–766. doi: 10.1152/physrev.00025.2016.
- Murata, Y. *et al.* (2010) 'Action potential-enhanced ATP release from taste cells through hemichannels', *Journal of Neurophysiology*, 104(2), pp. 896–901. doi: 10.1152/jn.00414.2010.
- Muscelli, E. *et al.* (2008) 'Separate Impact of Obesity and Glucose Tolerance on the Incretin Effect in Normal Subjects and Type 2 Diabetic Patients', *Diabetes*, 57(5), pp. 1340–1348. doi: 10.2337/db07-1315.
- Nauck, M. *et al.* (1986) 'Reduced incretin effect in Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes', *Diabetologia*, 29(1), pp. 46–52. doi: 10.1007/BF02427280.

- Nauck, M. (2016) 'Incretin therapies: highlighting common features and differences in the modes of action of glucagon-like peptide-1 receptor agonists and dipeptidyl peptidase-4 inhibitors', *Diabetes, Obesity & Metabolism*, 18(3), pp. 203–216. doi: 10.1111/dom.12591.
- Naya, F. J. *et al.* (1997) 'Diabetes, defective pancreatic morphogenesis, and abnormal enteroendocrine differentiation in BETA2/neuroD-deficient mice', *Genes & Development*, 11(18), pp. 2323–2334. doi: 10.1101/gad.11.18.2323.
- Nelson, G. *et al.* (2001) 'Mammalian Sweet Taste Receptors', *Cell*, 106(3), pp. 381–390. doi: 10.1016/S0092-8674(01)00451-2.
- Nigro, G. *et al.* (2018) 'Microbiote et régénération de l'épithélium intestinal : des signaux cryptiques décryptés dans la crypte', *Bulletin de l'Académie Nationale de Médecine*, 202(7), pp. 1393–1400. doi: 10.1016/S0001-4079(19)30205-5.
- Nitin, S. (2010) 'HbA1c and factors other than diabetes mellitus affecting it', *Singapore Medical Journal*, 51(8), pp. 616–622.
- Nofre, C. and Tinti, J.-M. (2000) 'Neotame: discovery, properties, utility', *Food Chemistry*, 69(3), pp. 245–257. doi: 10.1016/S0308-8146(99)00254-X.
- Okonkwo, O., Zezoff, D. and Adeyinka, A. (2020) 'Biochemistry, Cholecystokinin (CCK)', in *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK534204/> (Accessed: 5 May 2020).
- Osinski, C. *et al.* (2021) 'Type 2 diabetes is associated with impaired jejunal enteroendocrine GLP-1 cell lineage in human obesity', *International Journal of Obesity (2005)*, 45(1), pp. 170–183. doi: 10.1038/s41366-020-00694-1.
- Pais, R., Gribble, F. M. and Reimann, F. (2016) 'Stimulation of incretin secreting cells', *Therapeutic Advances in Endocrinology and Metabolism*, 7(1), pp. 24–42. doi: 10.1177/2042018815618177.
- Palmer, C. *et al.* (2007) 'Development of the Human Infant Intestinal Microbiota', *PLOS Biology*, 5(7), p. e177. doi: 10.1371/journal.pbio.0050177.
- Panthier, J.-J., Aubin Houzelstein, G. and Bellier, S. (2006) 'Régulation de la taille des organes : génétique et physiopathologie d'un allongement du tube digestif chez la souris', *Bulletin de l'Académie Vétérinaire de France (156)*, 255-259. (2006). Available at: <https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=LV2016020120> (Accessed: 4 May 2020).
- Pascale, A. *et al.* (2018) 'Microbiota and metabolic diseases', *Endocrine*, 61(3), pp. 357–371. doi: 10.1007/s12020-018-1605-5.
- Patel, K., Gadewar, M. and Tripathi, R. (2012) 'Pharmacological and analytical aspects of gymnemic acid: a concise report', *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 2(5), pp. 414–416. doi: 10.1016/S2222-1808(12)60090-5.

- Paternoster, S. and Falasca, M. (2018) 'Dissecting the Physiology and Pathophysiology of Glucagon-Like Peptide-1', *Frontiers in Endocrinology*, 9. doi: 10.3389/fendo.2018.00584.
- Poirier, H. *et al.* (1996) 'Localization and Regulation of the Putative Membrane Fatty-Acid Transporter (FAT) in the Small Intestine', *European Journal of Biochemistry*, 238(2), pp. 368–373. doi: 10.1111/j.1432-1033.1996.0368z.x.
- Poulsen, S. B., Fenton, R. A. and Rieg, T. (2015) 'Sodium-glucose cotransport', *Current opinion in nephrology and hypertension*, 24(5), pp. 463–469. doi: 10.1097/MNH.0000000000000152.
- Pucci, A. and Batterham, R. L. (2019) 'Mechanisms underlying the weight loss effects of RYGB and SG: similar, yet different', *Journal of Endocrinological Investigation*, 42(2), pp. 117–128. doi: 10.1007/s40618-018-0892-2.
- van Raalte, D. H. *et al.* (2016) 'Exenatide improves  $\beta$ -cell function up to 3 years of treatment in patients with type 2 diabetes: a randomised controlled trial', *European Journal of Endocrinology*, 175(4), pp. 345–352. doi: 10.1530/EJE-16-0286.
- Ramkumar, D. and Schulze, K. S. (2005) 'The pylorus', *Neurogastroenterology & Motility*, 17(s1), pp. 22–30. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2982.2005.00664.x>.
- Ramos-Molina, B., Martin, M. G. and Lindberg, I. (2016) 'Chapter Two - PCSK1 Variants and Human Obesity', in Tao, Y.-X. (ed.) *Progress in Molecular Biology and Translational Science*. Academic Press (Genetics of Monogenic and Syndromic Obesity), pp. 47–74. doi: 10.1016/bs.pmbts.2015.12.001.
- Ranganath, L. R. *et al.* (1996) 'Attenuated GLP-1 secretion in obesity: cause or consequence?', *Gut*, 38(6), pp. 916–919. doi: 10.1136/gut.38.6.916.
- Raynal-Ljutovac, K. *et al.* (2011) 'Organisation structurale et moléculaire des lipides dans les aliments : impacts possibles sur leur digestion et leur assimilation par l'Homme', *Oléagineux, Corps gras, Lipides*, 18(6), pp. 324–351. doi: 10.1051/ocl.2011.0415.
- Rehfeld, J. F. (2019) 'Premises for Cholecystokinin and Gastrin Peptides in Diabetes Therapy', *Clinical Medicine Insights. Endocrinology and Diabetes*, 12, p. 1179551419883608. doi: 10.1177/1179551419883608.
- Rehfeld, J. F. (2020) 'Measurement of cholecystokinin in plasma with reference to nutrition related obesity studies', *Nutrition Research*, 76, pp. 1–8. doi: 10.1016/j.nutres.2020.01.003.
- Rehfeld, J. F. and Stadil, F. (1973) 'The Effect of Gastrin on Basal- and Glucose-Stimulated Insulin Secretion in Man', *The Journal of Clinical Investigation*, 52(6), pp. 1415–1426. doi: 10.1172/JCI107315.
- Reimann, F. *et al.* (2008) 'Glucose Sensing in L Cells: A Primary Cell Study', *Cell Metabolism*, 8(6), pp. 532–539. doi: 10.1016/j.cmet.2008.11.002.
- Reimann, F. and Gribble, F. M. (2002) 'Glucose-Sensing in Glucagon-Like Peptide-1-Secreting Cells', *Diabetes*, 51(9), pp. 2757–2763. doi: 10.2337/diabetes.51.9.2757.

- Ren, X. *et al.* (2009) 'Sweet taste signaling functions as a hypothalamic glucose sensor', *Frontiers in Integrative Neuroscience*, 3. doi: 10.3389/neuro.07.012.2009.
- Rigaud, D. (2014) 'Rôle des hormones digestives et adipocytaires dans les troubles du comportement alimentaire', *Correspondances en Métabolismes Hormones Diabète et Nutrition*, XVIII(1–2).
- Roberts, G. P. *et al.* (2019) 'Comparison of Human and Murine Enteroendocrine Cells by Transcriptomic and Peptidomic Profiling', *Diabetes*, 68(5), pp. 1062–1072. doi: 10.2337/db18-0883.
- Robine, S. *et al.* (2005) 'Notch, un gène clé de l'équilibre entre prolifération et différenciation des cellules épithéliales de l'intestin', *M/S : médecine sciences*, 21(8–9), pp. 780–781.
- Roper, S. D. (2013) 'Taste buds as peripheral chemosensory processors', *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 24(1), pp. 71–79. doi: 10.1016/j.semcd.2012.12.002.
- Rozengurt, E. (2006) 'Taste Receptors in the Gastrointestinal Tract. I. Bitter taste receptors and  $\alpha$ -gustducin in the mammalian gut', *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 291(2), pp. G171–G177. doi: 10.1152/ajpgi.00073.2006.
- Saltiel, M. Y. *et al.* (2017) 'Sweet Taste Receptor Activation in the Gut Is of Limited Importance for Glucose-Stimulated GLP-1 and GIP Secretion', *Nutrients*, 9(4), p. 418. doi: 10.3390/nu9040418.
- Sander, L. E. *et al.* (2006) 'Selective expression of histamine receptors H1R, H2R, and H4R, but not H3R, in the human intestinal tract', *Gut*, 55(4), pp. 498–504. doi: 10.1136/gut.2004.061762.
- Sandoval, D. A. and D'Alessio, D. A. (2015) 'Physiology of Proglucagon Peptides: Role of Glucagon and GLP-1 in Health and Disease', *Physiological Reviews*, 95(2), pp. 513–548. doi: 10.1152/physrev.00013.2014.
- Sato, T. *et al.* (2011) 'Paneth cells constitute the niche for Lgr5 stem cells in intestinal crypts', *Nature*, 469(7330), pp. 415–418. doi: 10.1038/nature09637.
- Scheen, A. J. (2021) 'Existe-t-il encore une place pour les sulfamides hypoglycémiantes dans le traitement du diabète de type 2 en 2021 ?', *Médecine des Maladies Métaboliques*, 15(1), pp. 45–52. doi: 10.1016/j.mmm.2020.11.001.
- Schlienger, J.-L. (2010) 'Conséquences pathologiques de l'obésité', *La Presse Médicale*, 39(9), pp. 913–920. doi: 10.1016/j.lpm.2010.04.018.
- Schlienger, J.-L. (2017) 'Turbulences autour des édulcorants intenses', *Médecine des Maladies Métaboliques*, 11(4), pp. 353–358. doi: 10.1016/S1957-2557(17)30080-9.
- Schonhoff, S. E., Giel-Moloney, M. and Leiter, A. B. (2004) 'Minireview: Development and differentiation of gut endocrine cells', *Endocrinology*, 145(6), pp. 2639–2644. doi: 10.1210/en.2004-0051.

- Schröder, H. *et al.* (2014) 'Determinants of the transition from a cardiometabolic normal to abnormal overweight/obese phenotype in a Spanish population', *European Journal of Nutrition*, 53(6), pp. 1345–1353. doi: 10.1007/s00394-013-0635-2.
- Scoville, D. H. *et al.* (2008) 'Current View: Intestinal Stem Cells and Signaling', *Gastroenterology*, 134(3), pp. 849–864. doi: 10.1053/j.gastro.2008.01.079.
- Sekar, R. and Chow, B. K. C. (2013) 'Metabolic effects of secretin', *General and Comparative Endocrinology*, 181, pp. 18–24. doi: 10.1016/j.ygcen.2012.11.017.
- Serio, L. (2010) 'La Stevia rebaudiana, une alternative au sucre', *Phytothérapie*, 8(1), pp. 26–32. doi: 10.1007/s10298-010-0526-4.
- Shankar, P., Ah, S. and Sriram, K. (2013) 'Non-nutritive sweeteners: Review and update', *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)*, 29. doi: 10.1016/j.nut.2013.03.024.
- Sigoillot, M. *et al.* (2015) 'Les inhibiteurs du goût sucré : perspectives thérapeutiques', *Cahiers de Nutrition et de Diététique*, 50, pp. 252–261.
- Sinagoga, K. L. *et al.* (2018) 'Deriving functional human enteroendocrine cells from pluripotent stem cells', *Development (Cambridge, England)*, 145(19). doi: 10.1242/dev.165795.
- Siu, F. K. Y. *et al.* (2006) 'Signaling mechanisms of secretin receptor', *Regulatory Peptides*, 137(1), pp. 95–104. doi: 10.1016/j.regpep.2006.02.011.
- Sjöström, L. *et al.* (2004) 'Lifestyle, Diabetes, and Cardiovascular Risk Factors 10 Years after Bariatric Surgery', *New England Journal of Medicine*, 351(26), pp. 2683–2693. doi: 10.1056/NEJMoa035622.
- Smith, K. *et al.* (2018) 'T1R2 receptor-mediated glucose sensing in the upper intestine potentiates glucose absorption through activation of local regulatory pathways', *Molecular Metabolism*, 17, pp. 98–111. doi: 10.1016/j.molmet.2018.08.009.
- Sommer, F. and Bäckhed, F. (2013) 'The gut microbiota — masters of host development and physiology', *Nature Reviews Microbiology*, 11(4), pp. 227–238. doi: 10.1038/nrmicro2974.
- Sommer, M. O. (2015) 'Advancing gut microbiome research using cultivation', *Current Opinion in Microbiology*, 27, pp. 127–132. doi: 10.1016/j.mib.2015.08.004.
- Spencer, N. J. and Hu, H. (2020) 'Enteric nervous system: sensory transduction, neural circuits and gastrointestinal motility', *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 17(6), pp. 338–351. doi: 10.1038/s41575-020-0271-2.
- Steensels, S., Cools, L., *et al.* (2017) 'Supplementation of oligofructose, but not sucralose, decreases high-fat diet induced body weight gain in mice independent of gustducin-mediated gut hormone release', *Molecular Nutrition & Food Research*, 61(3), p. 1600716. doi: <https://doi.org/10.1002/mnfr.201600716>.

- Steensels, S., Lannoo, M., *et al.* (2017) 'The role of nutrient sensing in the metabolic changes after gastric bypass surgery', *Journal of Endocrinology*, 232(3), pp. 363–376. doi: 10.1530/JOE-16-0541.
- Stefan, N. *et al.* (2008) 'Identification and characterization of metabolically benign obesity in humans', *Archives of Internal Medicine*, 168(15), pp. 1609–1616. doi: 10.1001/archinte.168.15.1609.
- Steinert, Robert E. *et al.* (2011) 'Effects of carbohydrate sugars and artificial sweeteners on appetite and the secretion of gastrointestinal satiety peptides', *British Journal of Nutrition*, 105(9), pp. 1320–1328. doi: 10.1017/S000711451000512X.
- Steinert, R. E. *et al.* (2011) 'The functional involvement of gut-expressed sweet taste receptors in glucose-stimulated secretion of glucagon-like peptide-1 (GLP-1) and peptide YY (PYY)', *Clinical Nutrition*, 30(4), pp. 524–532. doi: 10.1016/j.clnu.2011.01.007.
- Steinert, R. E. *et al.* (2017) 'Ghrelin, CCK, GLP-1, and PYY(3–36): Secretory Controls and Physiological Roles in Eating and Glycemia in Health, Obesity, and After RYGB', *Physiological Reviews*, 97(1), pp. 411–463. doi: 10.1152/physrev.00031.2014.
- Takahashi, T. (2020) 'Roles of nAChR and Wnt signaling in intestinal stem cell function and inflammation', *International Immunopharmacology*, 81, p. 106260. doi: 10.1016/j.intimp.2020.106260.
- Takai, S. *et al.* (2015) 'Glucagon-like peptide-1 is specifically involved in sweet taste transmission', *The FASEB Journal*, 29(6), pp. 2268–2280. doi: <https://doi.org/10.1096/fj.14-265355>.
- Tang-Christensen, M. *et al.* (1996) 'Central administration of GLP-1-(7-36) amide inhibits food and water intake in rats', *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 271(4), pp. R848–R856. doi: 10.1152/ajpregu.1996.271.4.R848.
- Taylor, R. (2013) 'Type 2 Diabetes', *Diabetes Care*, 36(4), pp. 1047–1055. doi: 10.2337/dc12-1805.
- Tenenbaum, M. *et al.* (2018) 'Physiopathologie du diabète', *Revue Francophone des Laboratoires*, 2018(502), pp. 26–32. doi: 10.1016/S1773-035X(18)30145-X.
- Terry, N. A. *et al.* (2014) 'Impaired enteroendocrine development in intestinal-specific Islet1 mouse mutants causes impaired glucose homeostasis', *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*, 307(10), pp. G979-991. doi: 10.1152/ajpgi.00390.2013.
- Tian, H. *et al.* (2011) 'A reserve stem cell population in small intestine renders Lgr5-positive cells dispensable', *Nature*, 478(7368), pp. 255–259. doi: 10.1038/nature10408.
- Troy, S. *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), pp. 201–211. doi: 10.1016/j.cmet.2008.08.008.

- Turnbaugh, P. J. *et al.* (2006) 'An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest', *Nature*, 444(7122), pp. 1027–1031. doi: 10.1038/nature05414.
- Turton, M. D. *et al.* (1996) 'A role for glucagon-like peptide-1 in the central regulation of feeding', *Nature*, 379(6560), pp. 69–72. doi: 10.1038/379069a0.
- Vecchié, A. *et al.* (2018) 'Obesity phenotypes and their paradoxical association with cardiovascular diseases', *European Journal of Internal Medicine*, 48, pp. 6–17. doi: 10.1016/j.ejim.2017.10.020.
- Verdich, C. *et al.* (2001) 'The role of postprandial releases of insulin and incretin hormones in meal-induced satiety—effect of obesity and weight reduction', *International Journal of Obesity*, 25(8), pp. 1206–1214. doi: 10.1038/sj.ijo.0801655.
- Vergès, B. (2017) 'Effects of anti-somatostatin agents on glucose metabolism', *Diabetes & Metabolism*, 43(5), pp. 411–415. doi: 10.1016/j.diabet.2017.05.003.
- Vijan, S. (2015) 'Type 2 Diabetes', *Annals of Internal Medicine*, 162(5), pp. ITC1–ITC16. doi: 10.7326/AITC201503030.
- Vilsbøll, T. *et al.* (2001) 'Reduced Postprandial Concentrations of Intact Biologically Active Glucagon-Like Peptide 1 in Type 2 Diabetic Patients', *Diabetes*, 50(3), pp. 609–613. doi: 10.2337/diabetes.50.3.609.
- Vogel, C. I. *et al.* (2009) 'Gastric inhibitory polypeptide receptor: association analyses for obesity of several polymorphisms in large study groups', *BMC Medical Genetics*, 10(1), p. 19. doi: 10.1186/1471-2350-10-19.
- Vrieze, A. *et al.* (2014) 'Impact of oral vancomycin on gut microbiota, bile acid metabolism, and insulin sensitivity', *Journal of Hepatology*, 60(4), pp. 824–831. doi: 10.1016/j.jhep.2013.11.034.
- Wheeler, S. E. *et al.* (2017) 'The SNARE Protein Syntaxin-1a Plays an Essential Role in Biphasic Exocytosis of the Incretin Hormone Glucagon-Like Peptide 1', *Diabetes*, 66(9), pp. 2327–2338. doi: 10.2337/db16-1403.
- Wildman, R. P. *et al.* (2008) 'The Obese Without Cardiometabolic Risk Factor Clustering and the Normal Weight With Cardiometabolic Risk Factor Clustering: Prevalence and Correlates of 2 Phenotypes Among the US Population (NHANES 1999-2004)', *Archives of Internal Medicine*, 168(15), pp. 1617–1624. doi: 10.1001/archinte.168.15.1617.
- Williams, J. A. (2019) 'Cholecystokinin (CCK) Regulation of Pancreatic Acinar Cells: Physiological Actions and Signal Transduction Mechanisms', in *Comprehensive Physiology*. American Cancer Society, pp. 535–564. doi: 10.1002/cphy.c180014.
- Willms, B. *et al.* (1996) 'Gastric emptying, glucose responses, and insulin secretion after a liquid test meal: effects of exogenous glucagon-like peptide-1 (GLP-1)-(7-36) amide in type 2 (noninsulin-dependent) diabetic patients', *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 81(1), pp. 327–332. doi: 10.1210/jcem.81.1.8550773.



- Wren, A. M. *et al.* (2001) 'Ghrelin enhances appetite and increases food intake in humans', *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 86(12), p. 5992. doi: 10.1210/jcem.86.12.8111.
- Xiao, C., Stahel, P. and Lewis, G. F. (2019) 'Regulation of Chylomicron Secretion: Focus on Post-Assembly Mechanisms', *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology*, 7(3), pp. 487–501. doi: 10.1016/j.jcmgh.2018.10.015.
- Xu, G. *et al.* (2007) 'Downregulation of GLP-1 and GIP Receptor Expression by Hyperglycemia: Possible Contribution to Impaired Incretin Effects in Diabetes', *Diabetes*, 56(6), pp. 1551–1558. doi: 10.2337/db06-1033.
- Xu, Y. *et al.* (2020) 'Overcoming the intestinal barrier: A look into targeting approaches for improved oral drug delivery systems', *Journal of Controlled Release*, 322, pp. 486–508. doi: 10.1016/j.jconrel.2020.04.006.
- Yadav, V. K. *et al.* (2010) 'Pharmacological inhibition of gut-derived serotonin synthesis is a potential bone anabolic treatment for osteoporosis', *Nature Medicine*, 16(3), pp. 308–312. doi: 10.1038/nm.2098.
- Ye, D. Z. and Kaestner, K. H. (2009) 'Foxa1 and Foxa2 Control the Differentiation of Goblet and Enteroendocrine L- and D-Cells in Mice', *Gastroenterology*, 137(6), pp. 2052–2062. doi: 10.1053/j.gastro.2009.08.059.
- Yilmaz, S. and Uçar, A. (2015) 'Saccharin genotoxicity and carcinogenicity: a review', *Advances in Food Sciences*, 37.
- Zeng, Q. *et al.* (2020) 'Gastrin, Cholecystokinin, Signaling, and Biological Activities in Cellular Processes', *Frontiers in Endocrinology*, 11, p. 112. doi: 10.3389/fendo.2020.00112.

# Annexes

## Annexe 1 : Communications orales et affichées, et formations

### Communications orales :

- **Léa Le Gléau**, Céline Osinski, Hédi Soula, Magalie Fradet, Sébastien André, Sandrine Blugeon, Laurent Joudren, Christine Poitou, Laurent Genser, Karine Clement, Armelle Leturque, Patricia Serradas et Agnès Ribeiro. « **Remodelage des cellules entéroendocrines dans les maladies métaboliques - une approche par RNAseq.** ». Club d'Etudes des Cellules Epitheliales Digestives (CECED), Marseille, 2018.
- **Léa Le Gléau**, Céline Osinski, Hédi Soula, Magali Fradet, Sébastien André, Sandrine Blugeon, Laurent Joudren, Christine Poitou, Laurent Genser, Karine Clement, Armelle Leturque, Patricia Serradas et Agnès Ribeiro. « **Remodelage des cellules entéroendocrines dans les maladies métaboliques - une approche par RNAseq.** ». Journées de l'Institut de Cardiométabolisme et Nutrition (Ican) « Metabolic & cardiovascular crosstalk : from pathways to biomarkers », Paris, 2018.
- **Léa Le Gléau**, Céline Osinski, Hédi Soula, Magali Fradet, Sébastien André, Sandrine Blugeon, Laurent Joudren, Christine Poitou, Laurent Genser, Karine Clement, Armelle Leturque, Patricia Serradas et Agnès Ribeiro. « **Profil génique des cellules entéroendocrines dans l'obésité et le diabète de type 2 – une étude chez l'Homme et la souris** ». réunion scientifique annuelle de la Société Québécoise de Lipidologie, de Nutrition et de Métabolisme (SQLNM), du réseau de recherche en santé CardioMétabolique, Diabète et Obésité (CMDO) et du congrès Colossus, Canada, 2019
- **Léa Le Gléau**, Céline Osinski, Hédi Soula, Magali Fradet, Sébastien André, Sandrine Blugeon, Laurent Joudren, Christine Poitou, Laurent Genser, Karine Clement, Armelle Leturque, Patricia Serradas et Agnès Ribeiro. « **Enteroendocrine cell gene profiling in obesity and type 2 diabetes – a study in Human and mice.** ». 20<sup>èmes</sup> journées de l'Ecole doctorale Physiologie, Physiopathologies et Thérapeutiques, Paris, 2019.
- **Léa Le Gléau**, Christine Rouault, Céline Osinski, Laurent Genser, Hédi Soula, Jean Debédat, Pauline Busieau, Chloé Amouyal, Karine Clément, Fabrizio Andreelli, Patricia Serradas et Agnès Ribeiro. « **Implication de Gnat3, un gène de la transduction du goût sucré, dans la mise en place de l'obésité et du diabète de type 2 et l'amélioration métabolique après remodelage intestinal.** ». 37<sup>èmes</sup> journées de l'Association Française d'Etude et de Recherche sur l'Obésité (AFERO), Nice, 2021

### Communications affichées :

- **Léa Le Gléau**, Céline Osinski, Hédi Soula, Magali Fradet, Sébastien André, Sandrine Blugeon, Laurent Joudren, Christine Poitou, Laurent Genser, Karine Clément, Armelle Leturque, Patricia Serradas et Agnès Ribeiro. « Gene profiling of enteroendocrine cells in metabolic diseases. ». Poster affiché aux 19<sup>èmes</sup> journées de l'École doctorale, à Paris, 2018.
- Léa Le Gléau, Céline Osinski, Hédi Soula, Magalie Fradet, Sébastien André, Florence Deknuydt, Corinne Blugeon, Laurent Joudren, Christine Poitou, Laurent Genser, Armelle Leturque, Karine Clément, Patricia Serradas et Agnès Ribeiro. « **Profil génique des cellules entéroendocrines dans l'obésité et le diabète de type 2** ». 36<sup>èmes</sup> journées de l'Association Française d'Etude et de Recherche sur l'Obésité (AFERO), Paris, 2020
- Léa Le Gléau, Christine Rouault, Céline Osinski, Laurent Genser, Hédi Soula, Jean Debédat, Lise Volland, Pauline Busieau, Chloé Amouyal, Karine Clément, Fabrizio Andreelli, Patricia Serradas et Agnès Ribeiro. « **Implication de Gnat3, un gène de la transduction du goût sucré, dans la mise en place des maladies métaboliques et la rémission du diabète après remodelage intestinal.** ». réunion scientifique annuelle de la Société Québécoise de Lipidologie, de Nutrition et de Métabolisme (SQLNM), du réseau de recherche en santé CardioMétabolique, Diabète et Obésité (CMDO) et du congrès Colossus, Canada, 2021

### Formations suivies durant ma thèse :

- Certificat d'habilitation à manipuler les animaux de laboratoire, 2018
- Poser les bases d'un projet professionnel personnalisé, 2018
- Camps d'hiver du réseau de recherche en santé CardioMétabolique Diabète et Obésité (CMDO), 2019


## « COVID-19 and its severity in bariatric surgery operated patients »

P. Bel Lassen, C. Poitou, L.Genser, F.Marchelli, J. Aron-Wisnewsky, C. Ciangura, F. Jacques, P. Moreau, **NutriOmics investigators**, J-M. Oppert et K. Clément

NutriOmics investigators : Sébastien André, Rohia Alili, Jean Debédât, Isabelle Dugail, Camille Gamblin, **Léa Le Gléau**, Nathalie Gourmelon, Leslie Malespine, Andrea Marques, Florian Marquet, Céline Osinski, Véronique Pelloux, Ghislain Petit, Patricia Serradas, Emilie Steinbach, Agnes Ribeiro, Lise Volland, and Elon Zerah.

Publié dans Obesity, 2020

# COVID-19 and its Severity in Bariatric Surgery-Operated Patients

Pierre Bel Lassen<sup>1,2</sup>, Christine Poitou<sup>1,2</sup>, Laurent Genser<sup>2,3</sup>, Florence Marchelli<sup>1,2</sup>, Judith Aron-Wisniewsky<sup>1,2</sup>, Cécile Ciangura<sup>1</sup>, Flavien Jacques<sup>2</sup>, Pauline Moreau<sup>1</sup>, NutriOmics investigators\*, Jean-Michel Oppert<sup>1</sup>, and Karine Clément<sup>1,2</sup> 

**Objective:** Obesity is a major risk factor for severe forms of coronavirus disease (COVID-19), but little is known about the post-bariatric surgery (BS) setting. The prevalence of likely COVID-19 and its risk factors in patients followed up after BS was assessed.

**Methods:** A total of 738 patients who underwent BS and were followed up at a university medical center were surveyed. A retrospective comparison of characteristics at baseline, 1 year after BS, and at the time of lockdown was performed between patients with COVID-19-likely events (CL) based on a combination of reported symptoms and those for whom COVID-19 was unlikely.

**Results:** CL occurred in 62 (8.4%) patients, among whom 4 (6.4%) had a severe form requiring hospitalization and 1 (1.6%) died. The CL group had a higher proportion of persistent type 2 diabetes (T2D) at last follow-up (36.2% vs. 20.3%,  $P=0.01$ ). BMI at the time of lockdown was lower in the CL group ( $30.2 \pm 5.1$  vs.  $32.8 \pm 6.5$  kg/m<sup>2</sup>;  $P<0.01$ ) with higher percent weight loss since BS in the CL group. Severe forms of COVID-19 requiring hospitalization were associated with persistent T2D at the last follow-up visit.

**Conclusions:** In BS patients, CL were associated with persistent T2D and lower BMI.

*Obesity* (2021) **29**, 24–28.

## Introduction

Obesity is a recognized major risk factor for severe forms of coronavirus disease (COVID-19) and related mortality, independently of obesity-associated comorbidities (1–4). Although several hypotheses have been suggested to explain why, much remains to be understood. Beyond the increased prevalence of type 2 diabetes (T2D), cardiovascular disease, alterations in respiratory function, and increased risk of pulmonary embolism, the obesity-related low-grade inflammation could be an additional mechanism (5).

Bariatric surgery (BS) is increasingly performed in persons with severe obesity, especially in France, which ranks third worldwide regarding the number of patients operated on (6). However, very little is known on COVID-19 in post-BS patients. On the one hand, beneficial effects induced by BS could decrease patient's risk for severe COVID-19. Indeed, BS leads to successful long-term weight loss, metabolic improvement

## Study importance

### What is already known?

- ▶ Obesity is a major risk factor for severe forms of coronavirus disease (COVID-19) and related mortality.
- ▶ Bariatric surgery leads to successful long-term weight loss and improvement of comorbidities that may decrease the negative outcomes of COVID-19.

### What does this study add?

- ▶ The prevalence of COVID-19-likely events in bariatric surgery-operated patients is similar to what is observed in the general population.
- ▶ Remission of type 2 diabetes after bariatric surgery is associated with a lower risk for COVID-19.
- ▶ A higher surgery-induced weight loss and lower weight and BMI post surgery are associated with COVID-19-likely events.

### How might these results change the direction of research or the focus of clinical practice?

- ▶ Patients after bariatric surgery, in the case of nonremission of type 2 diabetes, should be considered at higher risk for COVID-19.
- ▶ Further research is needed to clarify the links between weight loss, malnutrition, and COVID-19.

<sup>1</sup> Nutrition Department, Assistance Publique Hôpitaux de Paris, Pitié-Salpêtrière Hospital, CRNH-Ile de France Paris, Sorbonne Université, Paris, France. Correspondence: Karine Clément (karine.clement@inserm.fr) <sup>2</sup> INSERM, Nutrition and Obesity: Systemic Approach (NutriOmics) Research Unit, Sorbonne Université, Paris, France <sup>3</sup> Digestive Surgery Department, Assistance Publique Hôpitaux de Paris, Pitié-Salpêtrière Hospital, Sorbonne Université, Paris, France.

See Commentary, pg. 19.

\*NutriOmics investigators: Sébastien André, Rohia Allili, Jean Debédât, Isabelle Dugail, Camille Gamblin, Léa Le Gléau, Nathalie Gourmelon, Leslie Malespine, Andrea Marques, Florian Marquet, Céline Osinski, Véronique Pelloux, Ghislain Petit, Patricia Serradas, Emilie Steinbach, Agnes Ribeiro, Lise Volland, and Elon Zerah.

© 2020 The Obesity Society. Received: 14 July 2020; Accepted: 27 August 2020; Published online 3 December 2020. doi:10.1002/oby.23026

(including T2D remission) (7), improvement in sleep apnea syndrome (8), and decreased low-grade systemic inflammation (9). On the other hand, BS can lead to malnutrition and to vitamin deficiencies such as vitamin D, of which a deficit was suggested to enhance the severity of COVID-19 (10). Though recent guidelines were proposed to help prioritizing which patients could undergo bariatric and metabolic surgery during the COVID-19 pandemic (11), whether patients who already had BS display a particular susceptibility to COVID-19 risk and severity needs urgent evaluation.

We conducted a retrospective observational study in a cohort of patients who had BS to estimate the prevalence of COVID-19 and evaluate factors associated with COVID-19 incidence and severity in this setting.

## Methods

### Study population

The study is based on our ongoing BS cohort, “BARICAN,” of 937 patients followed up at the Nutrition Department of Pitié-Salpêtrière University Hospital (Paris, France). Patients were operated on in the Surgery Departments of Hôtel-Dieu, Ambroise Paré, and Pitié-Salpêtrière hospitals in Paris between 2004 and 2020. Ethical approval was obtained from the French Research Ethics Committee of CPP Ile de France-1 N°13533 and by the “Commission nationale de l’informatique et des libertés” No. 1222666. Informed written consent was obtained from all participants.

### BS, baseline and follow-up, and clinical and biological data collection

Detailed patients’ clinical, biological, and anthropometric characteristics were obtained before surgery (baseline) and 12 months after BS. T2D status was defined as proposed by the American Diabetes Association (12) at baseline, at 12 months, and at the last follow-up before the survey (i.e., last known T2D status). Body composition was assessed by whole-body fan-beam dual-energy x-ray absorptiometry scan (Hologic Inc., Waltham, MA, USA) (13). Blood samples were collected after a 12-hour overnight fast. Insulin resistance was assessed by the homeostatic model assessment of insulin resistance (14).

### Data collection during lockdown

Lockdown in France extended from March 10 to May 11, 2020. All patients received a phone call between April 27, 2020, and May 27, 2020, and were asked to contribute to a survey by answering a set of standardized questions about COVID-19, medical events, and changes in lifestyle during lockdown. If the patient was unable to answer to the survey (e.g., hospitalization, death), information was gathered from relatives. A patient was considered lost to follow-up if no answer was obtained after three calls. COVID-19 events were considered likely (CL) in patients who had experienced an episode of anosmia/dysgeusia or the association of fever (self-measured temperature  $\geq 37.8^\circ\text{C}$ ) and one symptom among cough, dyspnea, nose discharge/swelling, or odynophagia since February 2020. The combination of such symptoms has been considered as most relevant for the CL status in recent reports (15,16). Patients hospitalized for COVID-19 or with a positive polymerase chain reaction test for severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) were also considered as CL. Self-measured

weight before the lockdown period was recorded. Patients’ smoking and vitamin supplementation status were reported. Recent exposure defined by a close contact with a person with confirmed Sars-CoV-2 infection was noted.

### Statistical analysis

Continuous variables were expressed as mean (SD). Categorical variables were expressed as absolute values and percentages. Continuous variables with a nonparametric distribution were log-transformed before analysis. Student’s *t* tests for continuous variables and Pearson’s  $\chi^2$  test or Fisher’s exact test for categorical variables were used to compare characteristics of patients according to their COVID-19-likely status (likely [CL] or unlikely infection [CU]). For significant results, a multivariate logistic regression was performed, adjusted on the time elapsed since surgery and last known T2D status. Significance was set at  $P < 0.05$ . Analyses were conducted using R studio software version 1.2.1335 (The R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria).

## Results

### Baseline and 12-month characteristics

From the 937 operated patients followed up, we could collect recent information for 738 (78.8%) of them. Patients were middle-aged and mostly female, and 44.0% had T2D before surgery (Table 1). The main procedures performed were Roux-en-Y gastric bypass (54.4%) and sleeve gastrectomy (45.0%). Only four (0.4%) had gastric banding. The mean time elapsed between surgery and the time of the call was 3.7 (2.7) years, and the proportion of patients within their first year of follow-up (i.e., weight-loss phase) did not differ between CL and CU groups (Table 2). Mean weight loss 1 year after surgery was close to 30% of preoperative weight, and the proportion of T2D was halved 1 year after surgery (Table 1).

### Prevalence and factors associated with CL

After BS, 62 (8.4%) patients were categorized as CL. There was no difference regarding the type of surgery or baseline characteristics between CL and CU groups. However, time elapsed since surgery was significantly higher in CL ( $P = 0.01$ ). One year after BS, the CL group had a higher proportion of patients with persistent T2D and higher HbA<sub>1c</sub> level (Table 1). Persistent T2D at the last follow-up visit before survey was also positively associated with CL (Table 2). BMI at the time of lockdown was lower in the CL versus CU group, with a higher percent weight loss and a lower prevalence of obesity (BMI  $> 30$ ). Importantly, a multivariate analysis showed these differences were independent of the last known T2D status and the time since surgery (Table 2). CL patients reported more often a recent COVID-19 exposure ( $P < 0.01$ ). There was no significant difference in the vitamin supplementation status between the two groups.

### Characteristics of the patients with severe forms of COVID-19

Among the 62 CL cases, 4 (6.4%) required hospitalization and 1 (1.6%) death was reported. Mean age was 61.8 years. Importantly, the proportion of patients with persistent T2D was higher in patients requiring hospitalization than in those who did not (respectively,  $n = 4$  [100%] vs.  $n = 17$  [31.4%];  $P = 0.014$ ) (Table 3).

**TABLE 1** Characteristics of the cohort before and 12 months after bariatric surgery according to COVID-19-likely status

	Baseline (before surgery)				12 months after surgery			
	All, N=738	COVID-19 unlikely, n=676	COVID-19 likely, n=62	P value	All, N=553	COVID-19 unlikely, n=501	COVID-19 likely, n=52	P value
Age (y)	50.0 (12.3)	50.1 (12.3)	49.6 (12.9)	0.77	51.0 (12.3)	51.0 (12.2)	50.7 (12.5)	0.86
Sex (male), n (%)	160 (21.7)	148 (21.9)	12 (19.4)	0.76	114 (20.6)	105 (21.0)	9 (17.3)	0.66
Caucasian, n (%)	611 (82.8)	560 (82.8)	51 (82.3)	1.00	443 (80.1)	401 (80.0)	42 (80.8)	1.00
Weight (kg)	123.6 (21.4)	123.8 (21.5)	121.7 (20.6)	0.47	88.8 (19.6)	89.1 (19.7)	85.8 (17.5)	0.21
Height (cm)	166.7 (8.6)	166.6 (8.6)	167.4 (9.3)	0.51	166.5 (8.6)	166.5 (8.6)	167.0 (9.3)	0.72
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	44.7 (6.6)	44.8 (6.5)	44.2 (7.2)	0.57	32.2 (6.3)	32.2 (6.2)	31.4 (7.4)	0.44
Body fat (%)	48.1 (5.1)	48.0 (5.0)	48.5 (6.1)	0.57	38.7 (6.7)	38.7 (6.6)	38.3 (7.5)	0.73
Type of surgery, n (%)				1.00				1.00
Gastric banding	4 (0.5)	4 (0.6)	0 (0.0)		3 (0.5)	3 (0.6)	0 (0.0)	
RYGB	399 (54.4)	365 (54.4)	34 (54.8)		317 (57.4)	287 (57.4)	30 (57.7)	
Sleeve gastrectomy	330 (45.0)	302 (45.0)	28 (45.2)		232 (42.0)	210 (42.0)	22 (42.3)	
Weight loss (%)	-	-	-		28.4 (8.4)	28.3 (8.3)	29.0 (9.8)	0.64
Excess body weight loss (%)					68.6 (23.8)	68.1 (23.4)	72.6 (26.7)	0.25
Obstructive sleep apnea syndrome, n (%)	512 (73.2)	472 (73.8)	40 (67.8)	0.40	201 (40.0)	184 (40.5)	17 (34.7)	0.52
Hypertension, n (%)	367 (53.0)	338 (53.1)	29 (50.9)	0.85	220 (39.9)	198 (39.6)	22 (43.1)	0.73
Type 2 diabetes, n (%)	308 (44.0)	279 (43.6)	29 (48.3)	0.57	116 (21.0)	97 (19.4)	19 (36.5)	0.01
Glycemia (mmol/L)	6.2 (2.1)	6.2 (2.1)	6.7 (2.6)	0.14	5.1 (1.2)	5.0 (1.2)	5.2 (1.2)	0.58
HbA <sub>1c</sub> (%)	5.7 (0.8)	5.7 (0.7)	6.0 (1.1)	0.10	5.7 (0.8)	5.7 (0.7)	6.0 (1.1)	0.04
HOMA-IR	5.3 (3.7)	5.3 (3.7)	5.7 (4.0)	0.43	1.9 (1.2)	1.9 (1.2)	2.0 (1.3)	0.57
IL6 (pg/mL)	6.2 (20.7)	6.2 (21.5)	6.1 (7.3)	0.22	5.0 (18.3)	4.8 (18.1)	7.9 (19.9)	0.09
Vitamin D (ng/mL)	22.0 (10.0)	22.0 (10.2)	22.6 (8.3)	0.65	31.1 (9.3)	31.0 (9.2)	32.0 (10.1)	0.49
Vitamin B12 (pmol/L)	321 (143)	322 (137)	306 (197)	0.17	283 (149)	284 (141)	273 (212)	0.23

Results expressed as mean (SD) for continuous data and n (%) for categorical data. P values result from Student *t* test for continuous data and  $\chi^2$  or Fisher exact test for categorical data between the two groups.

HbA<sub>1c</sub>, glycated hemoglobin A<sub>1c</sub>; HOMA-IR, homeostatic model assessment of insulin resistance; IL6, interleukin 6; RYGB, Roux-en-Y gastric bypass.

## Discussion

We surveyed a cohort of over 700 patients with a history of obesity followed up after BS to assess the prevalence of CL in this population and describe associated characteristics. The prevalence of CL was 8.4%, among which 6.4% were severe forms requiring hospitalization. The main difference between CL and CU patients was a higher BS-induced weight loss as well as lower weight and BMI at the time of lockdown for CL. Patients likely to have had COVID-19 also had a more often persistent T2D after surgery.

This is the first study to report and describe COVID-19 cases after BS, limiting the possibility to compare with results from other countries. However, at the time of our survey, a global estimation was performed in the greater Paris region (Ile de France), the area of residence of the majority of our patients, and reported an estimated prevalence of COVID-19 cases of 9.9% (17). This appears in the same magnitude as what we describe herein, with a similar proportion of patients requiring hospitalization.

T2D is recognized as a major risk factor for severe forms of COVID-19 (18,19), and our study suggests that this remains true after BS. Patients

with persistent T2D after BS were at higher risk for CL. Importantly, persistent T2D was associated with severe outcome of COVID-19.

One of the main differences observed in our likely infected patients was a lower BMI at the time of the survey, which is consistent with a more important post-BS percent weight loss, and this was independent of the duration of follow-up after BS. Malnutrition is known to be associated with the risk for viral pneumonia since the 1918 influenza pandemic (20), and it is possible that BS-induced malnutrition may contribute to a higher risk for infection with Sars-CoV-2. Here, we did not observe a difference in vitamin supplementation status between the two groups who also had similar vitamin levels in their 1-year follow-up. However, we cannot rule out differences in vitamin levels at the time of the infection.

Some limitations need to be mentioned. The definition of CL used here derives from a combination of self-reported symptoms with a good diagnostic performance but lacks specificity (15). Another limitation is that the time elapsed between surgery and our survey was heterogeneous and significantly different between the two groups, but importantly, adjustment for time since surgery did not alter our findings. Finally, potential confounders such as socioeconomic status, size of family, and working conditions could not be considered in this study.



**TABLE 2** Characteristics of the cohort at the time of lockdown according to COVID-19-likely status

	All, N=738	COVID-19 unlikely, n=676	COVID-19 likely, n=62	P <sup>a</sup>	Adjusted odds ratio (95% CI) <sup>b</sup>	Adjusted P <sup>b</sup>
Time since surgery (y)	3.7 (2.7)	3.7 (2.7)	4.2 (2.3)	0.01	1.02 (0.92-1.12)	0.68
Surgery < 1 year ago, n (%)	81 (11.0)	78 (11.5)	3 (4.8)	0.16	0.70 (0.11-2.68)	0.65
Last known T2D status	141 (21.8)	120 (20.3)	21 (36.2)	0.01	2.17 (1.20-3.86)	<0.01
Weight (kg)	90.7 (20.4)	91.2 (20.8)	85.0 (14.6)	<0.01	0.98 (0.97-0.99)	0.05
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	32.6 (6.5)	32.8 (6.5)	30.2 (5.1)	<0.01	0.92 (0.87-0.97)	<0.01
Obesity (BMI > 30), n (%)	424 (61.7)	396 (63.1)	28 (47.5)	0.03	0.52 (0.30-0.92)	0.02
Weight loss (%)	26.3 (10.9)	26.0 (10.9)	29.3 (10.7)	0.03	1.03 (1.00-1.06)	0.04
Excess body weight loss (%)	63.2 (27.5)	62.4 (27.7)	71.6 (24.9)	0.01	1.01 (1.00-1.03)	0.02
Vitamin supplements, n (%)	581 (81.0)	535 (81.4)	46 (76.7)	0.47	0.70 (0.36-1.44)	0.30
Corticosteroid treatment at last visit, n (%)	16 (2.5)	15 (2.6)	1 (1.8)	1.00	0.66 (0.04-3.43)	0.70
Confirmed Sars-CoV-2 exposure, n (%)	135 (18.9)	108 (16.5)	27 (45.8)	<0.01	5.59 (3.04-10.3)	<0.01
Smoker, n (%)	74 (10.5)	66 (10.2)	8 (13.6)	0.55	1.64 (0.68-3.54)	0.23

Results expressed as mean (SD) for continuous data and n (%) for categorical data.

<sup>a</sup>P values result from Student t test for continuous data and  $\chi^2$  or Fisher exact test for categorical data between the two groups.

<sup>b</sup>Logistic regression adjusted for time since surgery and last known T2D status.

**TABLE 3** Characteristics of COVID-19 hospitalized patients

	COVID-19 patients requiring hospitalization, n=4
Age (y)	61.8 (4.08)
Sex (male), n (%)	1 (25.0)
Type of surgery, n (%)	
RYGB	2 (50.0)
Sleeve	2 (50.0)
<i>Characteristics at 12 months after surgery</i>	
Obstructive sleep apnea syndrome, n (%)	2 (50.0)
Hypertension, n (%)	4 (100)
Type 2 diabetes, n (%)	4 (100)
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	32.7 (4.60)
Body fat (%)	36.4 (12.3)
<i>Characteristics at the time of lockdown</i>	
Time since surgery (y)	5.05 (1.96)
Type 2 diabetes at last follow-up, n (%)	4 (100)
Weight (kg)	90.5 (7.78)
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	30.5 (2.63)
Weight loss (%)	23.2 (0.27)
Excess body weight loss (%)	63.6 (9.73)
Death, n (%)	1 (25.0)

Results expressed as mean (SD) for continuous data and n (%) for categorical data.

## Conclusion

Patients followed up after BS displayed rates of CL that appear in line with those of the general population. Persistent T2D and lower BMI after BS are associated with the risk and the severity of COVID-19. Further work is needed to assess in more detail lifestyle changes of

patients after BS in the times of COVID-19 and the potential links between malnutrition and the risk for COVID-19. **O**

## Acknowledgments

We thank Valentine Lemoine for patient recruitment and inclusion. Data described in the manuscript and analytic code book will be made available upon request.

**Funding agencies:** Grant support in the field of bariatric surgery was obtained by Ministry of Health and Solidarity (Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, to KC/PHRC Microbaria, to JAW/CRC Fibrota) and by the European Union (Metacardis to KC HEALTH-F4-2012-305312 to KC). The authors also thank the FORCE network for supporting obesity clinical research.

**Disclosure:** The authors declared no conflict of interest.

## References

- Busetto L, Bettini S, Fabris R, et al. Obesity and COVID-19: an Italian snapshot. *Obesity (Silver Spring)* 2020;28:1600-1605.
- Caussy C, Pattou F, Wallet F, et al. Prevalence of obesity among adult inpatients with COVID-19 in France. *Lancet Diabetes Endocrinol* 2020;8:562-564.
- Simonet A, Chetboun M, Poissy J, et al. High prevalence of obesity in severe acute respiratory syndrome coronavirus-2 (SARS-CoV-2) requiring invasive mechanical ventilation. *Obesity (Silver Spring)* 2020;28:1195-1199.
- Clément K, Coupaye M, Laville M, Oppert J-M, Ziegler O. COVID-19: a lever for the recognition of obesity as a disease? The French experience. *Obesity (Silver Spring)* 2020;28:1584-1585. doi:10.1002/oby.22924
- Sattar N, McInnes IB, McMurray JJV. Obesity a risk factor for severe COVID-19 infection: multiple potential mechanisms. *Circulation* 2020;142:4-6.
- Angrisani L, Santonicola A, Iovino P, Formisano G, Buchwald H, Scopinaro N. Bariatric surgery worldwide 2013. *Obes Surg* 2015;25:1822-1832.
- Sjöström L. Review of the key results from the Swedish Obese Subjects (SOS) trial - a prospective controlled intervention study of bariatric surgery. *J Intern Med* 2013;273:219-234.
- Sarkhosh K, Switzer NJ, El-Hadi M, Birch DW, Shi X, Karmali S. The impact of bariatric surgery on obstructive sleep apnea: a systematic review. *Obes Surg* 2013;23:414-423.
- Rao SR. Inflammatory markers and bariatric surgery: a meta-analysis. *Inflamm Res* 2012;61:789-807.
- Grant WB, Lahore H, McDonnell SL, et al. Evidence that vitamin D supplementation could reduce risk of influenza and COVID-19 infections and deaths. *Nutrients* 2020;12:988. doi:10.3390/nu12040988
- Rubino F, Cohen RV, Mingrone G, et al. Bariatric and metabolic surgery during and after the COVID-19 pandemic: DSS recommendations for management of surgical candidates and postoperative patients and prioritisation of access to surgery. *Lancet Diabetes Endocrinol* 2020;8:640-648.

12. Classification and Diagnosis of Diabetes, American Diabetes Association. *Diabetes Care* 2015;38(suppl 1): S8–S16. <https://doi.org/10.2337/dc15-S005>
13. Abdennour M, Reggio S, Le Naour G, et al. Association of adipose tissue and liver fibrosis with tissue stiffness in morbid obesity: links with diabetes and BMI loss after gastric bypass. *J Clin Endocrinol Metab* 2014;99:898–907.
14. Levy JC, Matthews DR, Hermans MP. Correct homeostasis model assessment (HOMA) evaluation uses the computer program. *Diabetes Care* 1998;21:2191–2192.
15. Clemency BM, Varughese R, Scheafer DK, et al. Symptom criteria for COVID-19 testing of health care workers. *Acad Emerg Med* 2020;27:469–474.
16. Public Health England. COVID-19: investigation and initial clinical management of possible cases. Updated July 31, 2020. Accessed July 31, 2020. <https://www.gov.uk/government/publications/wuhan-novel-coronavirus-initial-investigation-of-possible-cases/investigation-and-initial-clinical-management-of-possible-cases-of-wuhan-novel-coronavirus-wn-cov-infection>
17. Salje H, Kiem CT, Lefrancq N, et al. Estimating the burden of SARS-CoV-2 in France. *Science* 2020;369:208–211.
18. Cariou B, Hadjadj S, Wargny M, et al. Phenotypic characteristics and prognosis of inpatients with COVID-19 and diabetes: the CORONADO study. *Diabetologia* 2020;63:1500–1515.
19. Roncon L, Zuin M, Rigatelli G, Zuliani G. Diabetic patients with COVID-19 infection are at higher risk of ICU admission and poor short-term outcome. *J Clin Virol* 2020;127:104354. doi:10.1016/j.jcv.2020.104354
20. Short KR, Kedzierska K, van de Sandt CE. Back to the Future: lessons learned from the 1918 influenza pandemic. *Front Cell Infect Microbiol* 2018;8:343. doi:10.3389/fcimb.2018.00343

**Annexe 3: Article soumis Ayari *et al*, Molecular Metabolism**

« Nuclear receptor HNF-4gamma gene invalidation protects against diet-induced obesity and is associated with intestinal lipid malabsorption in mice »

Sami Ayari, Eva Gil-Iturbe, **Léa le Gléau**, Céline Osinski, Nathalie Kapel, Hedi Soula, Armelle Leturque, Fabrizio Andreelli, Karine Clément, Patricia Serradas, Agnès Ribeiro

Soumis à Molecular Metabolism

**Nuclear receptor HNF-4gamma gene invalidation protects against diet-induced obesity  
and is associated with intestinal lipid malabsorption in mice**

Sami Ayari<sup>1</sup>, Eva Gil-Iturbe<sup>1</sup>, Léa le Gléau<sup>1</sup>, Céline Osinski<sup>1</sup>, Nathalie Kapel<sup>2</sup>, Hedi Soula<sup>1</sup>,  
Armelle Leturque<sup>1</sup>, Fabrizio Andreelli<sup>1,3</sup>, Karine Clément<sup>1,3</sup>, Patricia Serradas<sup>1</sup>, Agnès  
Ribeiro<sup>1\*</sup>

1- Sorbonne Université, INSERM, Nutrition and obesities: systemic approaches, F-75013  
Paris, France

2-AP-HP Hôpital Pitié-Salpêtrière-Charles Foix, Service de Coprologie Fonctionnelle, Paris,  
France

3- Assistance Publique/Hôpitaux de Paris, Pitié-Salpêtrière hospital, Nutrition department,  
Paris F-75013

**Present address:**

E G-I: Department of Psychiatry – Division of Molecular Therapeutics, Columbia University  
Irving Medical Center, New York, NY, USA

**\*Corresponding author:** Agnès Ribeiro, Sorbonne Unive INSERM, Nutrition and  
obesities: systemic approaches, F-75013 Paris, France – e-mail: [agnes.ribeiro@sorbonne-  
universite.fr](mailto:agnes.ribeiro@sorbonne-universite.fr)

## Highlights

- Loss of HNF-4 $\gamma$  protects against a diet-induced weight gain
- HNF-4 $\gamma$  is critical for dietary-lipid absorption
- Loss of HNF-4 $\gamma$  improves GLP-1 producing cell homeostasis and the incretin effect.
- Loss of HNF-4 $\gamma$  preserves against a diet-induced deregulated glucose homeostasis

## ABSTRACT

**Objective:** Changes in dietary habits have occurred concomitantly with a rise of type 2 diabetes (T2D) and obesity. Intestine is the first organ facing nutrient ingestion and has to adapt its metabolism with these dietary changes. HNF-4 $\gamma$ , a transcription factor member of the nuclear receptor superfamily and mainly expressed in intestine has been suggested involved in susceptibility to T2D. Our aim was to investigate the role of HNF-4 $\gamma$  in metabolic disorders and related mechanisms.

**Methods:** We submitted the constitutive *Hnf4g* gene invalidation mouse model to a high-fat/high-fructose (HF-HF) diet for 6 weeks, in order to induce obesity and T2D. Glucose homeostasis, energy homeostasis in metabolic cages, body composition and stool energy composition, as well as gene expression analysis in jejunum were analyzed.

**Results:** Despite an absence of decrease in calorie intake, of increase in locomotor activity or energy expenditure, *Hnf4g*<sup>-/-</sup> mice fed HF-HF are protected against weight gain after 6 weeks of HF-HF diet. We showed that *Hnf4g*<sup>-/-</sup> mice fed HF-HF display an increase in fecal calorie loss, mainly due to intestinal lipid malabsorption. Gene expression of lipid transporters, *Fatp4* and *Scarb1* and of triglyceride-rich lipoprotein secretion proteins, *Mttp* and *ApoB* are decreased in gut epithelium of *Hnf4g*<sup>-/-</sup> mice fed HF-HF, showing the *Hnf4g* role in intestine lipid absorption. Furthermore, plasma GLP-1, jejunal GLP-1 content and *Gcg* gene expression are

increased in *Hnf4g*<sup>-/-</sup> mice fed HF-HF, contributing to the glucose intolerance protection by an incretin effect.

**Conclusions:** The loss of HNF-4 $\gamma$  leads to a protection against a diet-induced weight gain and deregulated glucose homeostasis associated with lipid malabsorption.

**Keywords:** HNF-4 $\gamma$ , intestine, metabolic disorders, lipid malabsorption, high-fat/high fructose diet, mouse.

**Abbreviations:** ADRP: Adipose differentiation-related protein; Apo: apolipoprotein; AUC: area under curve; FABPm: membrane fatty acid binding protein, FATP4: fatty acid transport protein 4; GLP-1: glucagon like peptide 1; HF-HF: high fat-high fructose; HOMA-IR: Homeostasis Model Assessment of insulin resistance; MTTP: microsomal triglyceride transfer protein; NASH: Non-Alcoholic Steato-Hepatitis; NMR: nuclear magnetic resonance; OGTT: oral glucose tolerance test; T2D: type 2 diabetes; TG: triglycerides; TRL: triglyceride rich lipoprotein; WT: wild type.

## 1. INTRODUCTION

HNF-4 belongs to the nuclear receptor superfamily and in mammals, two paralog genes encoding the HNF-4 $\alpha$  and HNF-4 $\gamma$  forms. HNF-4 $\alpha$  is expressed in liver, kidney, pancreas and intestine [1]. Numerous studies *in vivo* and *in vitro* have shown that HNF-4 $\alpha$  plays pleiotropic roles in liver functions and is a central transcription factor at the crossroads between epithelial morphogenesis and functions [2-4]. Intestinal mice *Hnf4a* gene invalidation induces impairment of intestinal epithelium homeostasis, regeneration, cell architecture and fatty acid uptake [5-8].

HNF-4 $\gamma$  is expressed mainly in intestine and colon, in kidney and to a lesser extent in pancreas [9], being almost absent from liver [10; 11]. HNF-4 $\gamma$  is highly expressed during intestine specification [12]. Recently, a novel variant of HNF-4 $\gamma$ , designated HNF-4 $\gamma$ 2 was found to promote transactivation capacity and hepatic function of dedifferentiated hepatoma cells better than HNF-4 $\alpha$  [13]. Furthermore, an integrative multi-omics analysis in intestinal organoids highlighted HNF-4 $\gamma$  as a major driver of enterocyte differentiation [14]. It is noteworthy that the physiological role of HNF-4 $\gamma$  was much less studied than that of HNF-4 $\alpha$  and there is a lack of information on HNF-4 $\gamma$ . Using constitutive *Hnf4g* gene invalidation model fed control diet, we demonstrated that loss of HNF-4 $\gamma$  leads to an overproduction of GLP-1, leading to an exaggerated glucose-induced insulin secretion that improves glucose tolerance of *Hnf4g*<sup>-/-</sup> mice through an increase in GLP-1 incretin effect and a trophic impact on pancreatic  $\beta$ -cell mass [15]. HNF-4 $\gamma$  loss impacted on the abundance of  $\beta$ -cells but not on their insulin secretory capacity and led to a resistance to streptozotocin, a  $\beta$ -cell cytotoxic drug [15]. The role of HNF-4 $\gamma$  deserves thus further attention in the susceptibility to type 2 diabetes (T2D) using appropriate mouse model.

T2D is one of numerous co-morbidities associated with obesity as well as cardiovascular diseases [16]. The duration and the amplitude of the post-prandial peak of circulating triglyceride rich lipoproteins (TRL) from intestinal origin are risk of cardiovascular diseases [17-20]. Furthermore, changes of intestinal TRL secretion have been reported in the context of insulin resistance or diabetes, in animal models [21; 22] and in humans [23]. There is evidence for an increased basal rate of intestine-specific apolipoprotein (apo)B-48-containing lipoprotein secretion in insulin resistance and T2D [24]. Inversely, insulin reduces TRL and apoB-48 secretion [25]. In insulin resistant fructose-fed hamsters, *de novo* lipogenesis is enhanced [21; 26]. Hyperinsulinemic insulin-resistant human subjects display increased production rates of intestinal apoB48-containing lipoproteins [23], and in individuals with type 2 diabetes, intestinal chylomicron production is resistant to insulin's acute suppressive effects [27]. The relationships between T2D and lipid metabolism in the context of *hnf4g* invalidation deserve further investigation.

Changes in dietary habits, including increments in calorie and saturated fatty acid intakes, have occurred concomitantly with a rise of T2D and obesity [28]. Intestine has to adapt its metabolism to accommodate the increased lipid intake.

The intestine ensures the transport of alimentary fat, which is the most calorie-dense nutrient. Enterocytes ensure the transfer of dietary lipids to the organism through complex processes [29]. Triglycerides (TG) are hydrolyzed mainly by pancreatic enzymes into fatty acids and monoglycerides. The uptake of fatty acids occurs by passive diffusion and by a saturable/protein-mediated mechanism comprising the fatty acid translocase (CD36), the fatty acid-binding protein from the plasma membrane (FABPpm), as well as the fatty acid transport protein (FATP) family [20; 30; 31]. After resynthesis within the endoplasmic reticulum membrane, TG are used to form chylomicrons, the intestine-specific postprandial form of TRL, which will be secreted into the lymph and then directed toward circulation. The assembly of



one TRL results from the fusion between one apoB molecule, which is necessary for their formation, and one independently formed TG droplet [32]. The microsomal TG transfer protein (MTP) has a prominent role in chylomicron assembly, ensuring the lipidation-dependent stabilization of apoB and the transfer of lipids to the TG droplet in the endoplasmic reticulum lumen [33]. During the postprandial period, TG are also transiently stored in enterocytes, as cytosolic lipid droplets surrounded by proteins such as ADRP, which can be subsequently hydrolyzed to reenter the secretory pathway [34]. Thus perturbations of their basal level of expression and/or their nutrient-dependent modulation should interfere with the enterocyte function of dietary lipid absorption and would reveal functional role of HNF-4 $\gamma$  in intestinal absorption of lipids.

To test the hypothesis of a role of HNF-4 $\gamma$  in metabolic disorders and related mechanisms with intestine, we submitted the constitutive *Hnf4g* gene invalidation model to a high-fat/high-fructose (HF-HF) diet for 6 weeks, in order to induce obesity and T2D.

## **2. MATERIAL AND METHODS**

### **2.1. Animals and treatments**

Total and constitutive *Hnf4g* gene invalidation was as previously described [15]. *Hnf4g*<sup>-/-</sup> male mice were compared with C57Bl/6J wild-type male WT mice, matched in age and housed in the same room.

Animals were housed in a SPF facility on a 12h-light/12h-dark cycle and were fed with a standard diet (A03/R03, Safe). The high-fat/high-sucrose (HF-HF) diet was as described: high fat pellets (60% of kcal are fat) are from research Diet (D12492) and 30% (weight/volume) fructose (Sigma) was added in the drinking water. Mice were 2 month-old when HF-HF diet started for 6 weeks. Mice were euthanized by cervical dislocation. Experimental procedures were in agreement with the French ethical guidelines for animal studies and were approved by

the Regional Animal Care and Use Ethic Committee Charles Darwin C2EA – 05, agreement number (#4132 – 2016021710083817 v3).

## **2.2. Glucose tolerance test**

Glucose tolerance tests were performed after 6 weeks of HF-HF or control diets. After overnight fasting, mice received a 3.6g/kg glucose load for oral glucose tolerance tests (OGTT). Blood glucose concentrations were measured with a glucometer (Accu-checkGo, Roche). Blood samples (70  $\mu$ l at t0 and 10 min after glucose challenge) were collected from the tail into EDTA pre-coated microvette (Sarstedt). Plasma insulin (Alpco) and total glucagon-like peptide-1 (GLP-1) (Millipore) were measured by ELISA.

## **2.3. Plasma triglyceride levels after an olive oil bolus**

The plasma triglyceride levels after an olive oil bolus were measured after 6 weeks of HF-HF or control diets. After overnight fasting, mice received a 200 microL olive oil load. Blood samples were collected as described in paragraph 2.2 at 0, 30, 60, 90 and 120 min after the olive oil challenge. Plasma triglyceride concentrations were measured with the kit Triglycérides FS (DiaSys).

## **2.4. Metabolic parameters, body composition and stool analysis**

After 4 weeks of HF-HF or control diets, mice were housed individually in metabolic cages (Phenomaster, TSE Systems) 1 week for habituation and 1 week for measurement and were fed *ad libitum* with control or HF-HF diet. Food and water intake as well as O<sub>2</sub> consumption, CO<sub>2</sub> production, respiratory quotient, whole energy expenditure and tridimensional locomotor activity were automated measured. The whole body composition was analyzed by NMR (minispec Live Analyzer, Bruker). Stools were daily collected and stored at -20°C. After homogenization, total and lipid and nitrogen energy contents were as determined as previously described in [35].

## **2.5. Intestinal GLP-1 protein content**

Proximal jejunum, distal ileum, and whole colon were sliced into small pieces, homogenized in ethanol/acid (100% ethanol/sterile water/12N HCl 74:25:1 v/v/v) solution (5 ml/g tissue) and incubated overnight at 4°C. Homogenates were centrifuged and supernatants were collected for total GLP-1 content measurement using ELISA kit (Millipore).

## **2.6. Intestinal epithelial cell isolation and protein concentration measurement**

After flushing with PBS, jejunum was cut into small pieces and incubated 4h (4°C) in Cell recovery solution (BD Biosciences) containing 2% protease inhibitors (Sigma). Epithelial cells were filtered, centrifuged, and washed with PBS, to obtain epithelial cell suspension [36]. Proteins were extracted from an aliquot of epithelial cells with a lysis buffer (Tris HCl 20 mM pH 7.4, NaCl 150 mM, EDTA 5 mM, Triton 1%, DOC 0.5 %, protease and phosphatase inhibitors). Protein concentration was determined from and using BCA protein assay kit (Pierce).

## **2.7. Triglyceride levels in epithelial cells**

Lipids were extracted from an aliquot of epithelial cells with five volumes of chloroform-methanol (2:1 vol/vol), with vigorous shaking for 5 min. After centrifugation for 20 min at 1,000 g, the lower organic phase was collected and dried at 45°C overnight. The triglyceride levels were measured with the TG PAP 150 kit (Biomérieux).

## **2.8. RNA extraction and gene expression analysis**

Total RNA were isolated from jejunum epithelial cells with Trizol reagent (MRC). Reverse transcription (RT) was performed with 5µg of RNA. Semi quantitative real-time PCR was performed with SYBR green (Applied) in a Stratagene system. Primer sequences are reported in Table 1.

## 2.9. Statistical Tests

Results were expressed as means  $\pm$  SEM. Statistical analyses were performed using GraphPad Prism (GraphPad Software, La Jolla, CA). The significance was evaluated by 1-way ANOVA or 2-way ANOVA and followed by four Tukey's multiple comparisons tests: WT vs *Hnf4g*<sup>-/-</sup> on CD, WT vs *Hnf4g*<sup>-/-</sup> on HF-HF, WT CD vs WT HF-HF, *Hnf4g*<sup>-/-</sup> CD vs *Hnf4g*<sup>-/-</sup> HFHF. A *P* value  $<0.05$  was considered statistically significant.

## 3. RESULTS

### 3.1. Impact of *Hnf4g* gene invalidation on weight gain induced by a high-fat/high-fructose.

Metabolic characteristics of *Hnf4g*<sup>-/-</sup> mice were compared with those of WT mice, both groups being fed *ad libitum* either with control diet or high-fat/high fructose (HF-HF) diet. The body weight gain curves were comparable between WT and *Hnf4g*<sup>-/-</sup> mice fed control diet. There was no weight gain after 6 weeks (99% for WT vs 94% for *Hnf4g*<sup>-/-</sup>) (Figure 1A). As expected, 6 weeks of HF-HF diet promoted weight gain by 35% in WT mice but surprisingly, by only 10% in *Hnf4g*<sup>-/-</sup> mice (Figure 1A). We then performed a body composition analysis by NMR. On control diet, *Hnf4g*<sup>-/-</sup> mice showed a non-significant 1.5-fold higher fat mass than WT mice (Figure 1B). As expected, on HF-HF diet WT mice showed a 2.4-fold increase in fat mass whereas *Hnf4g*<sup>-/-</sup> mice only 1.5-fold (Figure 1B). However, on HF-HF diet, the increase in fat mass was 1.6-fold lower in *Hnf4g*<sup>-/-</sup> mice than in WT mice (Figure 1B). In parallel, lean mass of *Hnf4g*<sup>-/-</sup> mice was similar to that of WT mice regardless the diet (data not shown). Thus *Hnf4g* gene invalidation led to a partial protection against diet-induced weight gain characterized by less fat-mass gain. In order to explain such a resistance to weight gain, we analyzed food intake, locomotor activity and energy expenditure.

### 3.2. Impact of high-fat/high-fructose diet on *Hnf4g*<sup>-/-</sup> mouse energy homeostasis

We next analyzed the energy homeostasis of WT and *Hnf4g*<sup>-/-</sup> mice fed control or HF-HF diets in metabolic cages after 5 weeks of diet. We showed that total calorie intake (high-fat pellets and fructose in the drinking water) normalized by mouse body weight was not affected by *Hnf4g* gene invalidation regardless the diet (Figure 1C). The XY and XZ axis locomotor activity was next recorded. There was no significant difference between WT and *Hnf4g*<sup>-/-</sup> mice for their XYZ axis locomotor activity regardless the diet but HF-HF diet induced a 1.4-fold decrease in the locomotor activity regardless the mouse genotype (Figure 1D). The calculated energy expenditure (normalized to mouse body weight) of *Hnf4g*<sup>-/-</sup> mice was similar to that of WT mice fed control diet (Figure 1E). As expected, the energy expenditure of WT fed HF-HF diet is 10% decreased compared to WT mice fed control diet (Figure 1E). However, the energy expenditure of *Hnf4g*<sup>-/-</sup> mice fed control diet is similar to that of fed HF-HF diet (Figure 1E). Thus, the WT mice weight gain, induced by HF-HF diet, is explained by an increase in fat mass, a decrease in locomotor activity and in energy expenditure. However, the partial protection to diet-induced weight gain of *Hnf4g*<sup>-/-</sup> mice was not due to a decrease in calorie intake, an increase in locomotor activity nor an energy expenditure. Then, we made the hypothesis that *Hnf4g* gene invalidation leads to nutrient malabsorption revealed by HF-HF diet.

### 3.3. Impact of *Hnf-4γ* gene invalidation on nutrient absorption

For assessment of intestinal absorption total calories were measured in feces. We showed a 25% increase in fecal calorie loss in *Hnf4g*<sup>-/-</sup> mice fed HF-HF diet compared to WT mice (Figure 2A). More strikingly, this calorie loss is mainly due to a 4-fold increase of lipids in feces (Figure 2B) whereas the protein and carbohydrate amounts were similar regardless genotypes and diets (Supplementary Fig. 1). The higher calorie loss in *Hnf4g*<sup>-/-</sup> mice could be responsible of the protection against weight gain induced by HF-HF diet. We made the hypothesis that the *Hnf4g* gene invalidation leads to a lipid malabsorption.

We measured the triglyceride level in jejunal epithelial cells and showed that in *Hnf4g*<sup>-/-</sup> mice fed control diet, intra-epithelial triglyceride amount is increased 2-fold (not significant) compared to WT mice. More strikingly, in WT mice fed HF-HF, the intra-epithelial triglycerides are increased 10-fold compared to that of control diet, whereas in *Hnf4g*<sup>-/-</sup> mice, the 2.6-fold increase is not-significant (Figure 2C).

We then analyzed the kinetic of plasma triglyceride concentrations after an olive oil bolus, as reflect of enterocyte triglyceride secretion. The plasma triglyceride concentrations after an olive oil bolus are similar in WT and *Hnf4g*<sup>-/-</sup> mice fed control diet. As expected under HF-HF, the concentration of plasma triglycerides in WT mice is increased 3- fold at 90min compared to that of mice on control diet whereas the concentration of plasma triglycerides in *Hnf4g*<sup>-/-</sup> mice remains similar to that of on control diet (Figure 2D).

The partial protection to diet-induced weight gain of *Hnf4g*<sup>-/-</sup> mice could be due to an intestinal lipid malabsorption at uptake step (showed by increased lipids in feces and decreased in jejunal epithelial cells) and at secretion step (showed by plasma concentrations).

### **3.4. Impact of high-fat/high-fructose diet on gene expression involved in lipid absorption in *Hnf4g*<sup>-/-</sup> mice gut epithelium**

We next analyzed gene expression of lipid membrane transporters in jejunum from *Hnf4g*<sup>-/-</sup> and WT mice fed control or HF-HF diet (Figure 3A). The HF-HF diet increased the fatty acid transporter gene expression *Fabpm* and *Cd36*, regardless the mouse genotype, *Hnf4g*<sup>-/-</sup> or WT (Figure 3A, upper panels). The gene expression of the fatty acid transporter *Fatp4* was reduced by 1.8-fold in *Hnf4g*<sup>-/-</sup> mice compared to WT mice, fed control diet and by 1.3-fold on mice fed HF-HF diet (Figure 3A, lower left panel). The HF-HF diet induced an increase in the gene expression of the cholesterol transporter *Scarb1* (encoding SR-B1) regardless the mouse genotype, *Hnf4g*<sup>-/-</sup> or WT. However, the *Scarb1* gene expression is not significantly reduced by

3-fold on control diet in *Hnf4g*<sup>-/-</sup> mice compared to WT mice, and by 1.6-fold on HF-HF diet (Figure 3A, lower right panel).

Then, we analyzed expression of genes involved in lipid storage (*Plin2*, encoding Perilipin 2 or ADRP) and secretion (*Mttp* and *ApoB*) (Figure 3B). The HF-HF diet induced an increased gene expression of *Plin2* (2.4-fold) and of *Mttp* (1.8-fold) in WT mice but not in *Hnf4g*<sup>-/-</sup> mice. However, the expression of *Plin2*, *Mttp* and *apoB* is lowered in *Hnf4g*<sup>-/-</sup> mice fed HF-HF diet by 1.5-, 3.9- and 1.8-fold, respectively (Figure 3B). Note that gene expression of *Hnf4a* was 1.6- and 2.4-fold increase in *Hnf4g*<sup>-/-</sup> mice than in WT mice on control and HF-HF diets, respectively (Supplementary Fig. 2).

This decrease in gene expression of lipid transporters, lipid storage and secretion proteins could explain in part the lipids fecal calorie loss suggesting a lipid malabsorption due to lipid transfer failing toward blood circulation.

### **3.5. Impact of high-fat/high-fructose diet on *Hnf4g*<sup>-/-</sup> mice glucose homeostasis**

The lipid malabsorption that could protect *Hnf4g*<sup>-/-</sup> mice against weight gain induced by an HF-HF diet, could also allow a preferential use of glucose and thus protects from a deregulation of glucose homeostasis. We challenged glucose tolerance by an OGTT and as expected, WT mice fed HF-HF present a glucose intolerance compared to WT mice fed control diet (Figure 4A). The area under the curve (AUC) was 1.8- fold higher in WT mice fed HF-HF diet than in WT mice fed control diet (Figure 4B). We also confirmed as previously described in Baraille & al, that *Hnf4g* gene invalidation led to improvement of glucose tolerance in mice fed control diet (Figure 4A) [15]. Indeed, the AUC was 1.4- fold lower in *Hnf4g*<sup>-/-</sup> mice fed control diet than in WT mice (Figure 4B). This feature was further exacerbated in *Hnf4g*<sup>-/-</sup> mice fed HF-HF diet compared to WT mice (Figure 4A) since AUC was 1.8-fold lower in *Hnf4g*<sup>-/-</sup> HF-HF fed mice than in WT mice (Figure 4A). Importantly, AUC of oral glucose tolerance test of *Hnf4g*<sup>-/-</sup> HF-HF fed mice was similar to that of WT HF-HF diet fed mice (Figure 4B). As expected, fasting

blood glucose and insulin were increased 1.18- and 2.74- fold respectively, in WT mice fed HF-HF compared to control diet (Figure 4C, D) whereas fasting blood glucose and insulin remained unaffected in *Hnf4g*<sup>-/-</sup> mice fed HF-HF compared to control diet (Figure 4C, D). Furthermore, the HF-HF diet induced a 3.3-fold increase of HOMA-IR in WT mice without significant effect on HOMA-IR in *Hnf4g*<sup>-/-</sup> mice (Figure 4E). These results indicate that *Hnf4g* gene invalidation protects mice against glucose intolerance and insulin resistance induced by the HF-HF diet.

### **3.6. Impact of high-fat/high-fructose diet on *Hnf4g*<sup>-/-</sup> mice GLP-1 intestinal homeostasis**

We then measured the total plasma GLP-1 concentration 10 min after a glucose challenge. As previously described in Baraille & al, we confirmed that plasma total GLP-1 concentration was 3.3-fold increase in *Hnf4g*<sup>-/-</sup> than in WT mice fed control diet, (Figure 5A)[15]. The HF-HF diet induced a 3-fold increase in plasma total GLP-1 concentration in WT mice and a 1.4-fold non-significant increase in *Hnf4g*<sup>-/-</sup> mice. However, on HF-HF diet, the plasma total GLP-1 concentration in WT mice remained 1.53-fold lower than in *Hnf4g*<sup>-/-</sup> mice. We next measured GLP-1 content in mouse jejunum and we showed that GLP-1 content in jejunum of *Hnf4g*<sup>-/-</sup> mice is 2- and 1.7-fold increase in control and HF-HF diet, respectively (Figure 5B). In jejunum, the level of *Gcg* mRNA, encoding proglucagon, is increased by HF-HF diet 1.95- and 1.6-fold in WT and *Hnf4g*<sup>-/-</sup> mice, respectively (Figure 5C). These results showed that the *Hnf4g* gene invalidation in mice fed HF-HF diet leads to an increase in *Gcg* gene expression and GLP-1 jejunum content that could explain the increase in plasma GLP-1 in response to glucose challenge. Altogether, this could participate to the protection against glucose intolerance and insulin resistance thanks to the GLP-1 incretin effect.

## **4. DISCUSSION**

Our results demonstrate that the gene invalidation of the nuclear receptor HNF-4 $\gamma$  induces a protection against the weight gain induced by a high-fat/high-fructose diet. The weight gain



protection is mainly due to intestinal lipid malabsorption leading to a calorie loss in feces. The lipid malabsorption also protects *Hnf4g*<sup>-/-</sup> mice against glucose intolerance and insulin resistance induced by the HF-HF diet. An increase in jejunal GLP-1 content could participate to this protection due to an incretin effect.

Mice invalidated for *Hnf4g* gene were reported to present a lower food intake, associated with lower night energy expenditure, than wild type mice [37]. Our previous results did not show difference in food intake in *Hnf4g*<sup>-/-</sup> and *WT* mice fed control diet but a strong improvement of glucose tolerance of *Hnf4g*<sup>-/-</sup> mice [15], suggesting that HNF-4 $\gamma$  could be involved in susceptibility to type 2 diabetes. In order to generate rapid glucose intolerance and insulin resistance, we challenged mice with a high fat and high fructose diet. This long term diet (16 weeks) is widely used to induce NASH but a glucose intolerance along with insulin resistance appear earlier after 4 weeks of diet along with weight gain [38-40]. As expected we observed in *WT* mice fed HF-HF a weight gain from one week and a glucose intolerance at 6 weeks that are mainly due to an increase in fat mass and a decrease in locomotor activity and in energy expenditure. One of the most striking effect of *Hnf4g* gene invalidation is a weight gain and a glucose intolerance protection against HF-HF diet. We could expect an increase in energy expenditure or in locomotor activity to explain this protection. However, energy homeostasis analysis in metabolic cages does not show differences between *WT* and *Hnf4g*<sup>-/-</sup> mice fed HF-HF. We hypothesized that *Hnf4g* gene invalidation induces a loss of ingested calories and we showed increased calories in feces. We made the hypothesis of a lipid failing absorption revealed by the HF-HF diet challenge.

Enterocytes ensure the absorption of dietary lipids to the organism through complex processes that can be summarized into three major steps: uptake, storage and/or secretion [29]. The increase lipid content in feces, the decrease in intra-epithelium triglyceride content and the decrease of plasma triglyceride concentration after an olive oil bolus indicate that *Hnf4g* gene

invalidation in HF-HF diet fed mice leads to a lipid malabsorption at the three major steps uptake, storage and secretion. We expected a down-regulation of lipid transporters gene expression in *Hnf4g*<sup>-/-</sup> mice fed HF-HF. Although HF-HF diet induces an increase in gene expression of fatty acid transporters, such as the *Cd36* and *Fabpm* in jejunum of both *Hnf4g*<sup>-/-</sup> and *WT* mice, *Hnf4g* gene invalidation impacts the gene expression of *Fatp4* and *Scarb1* regardless the diet.

We could hypothesize that gene expression of lipid transporters *Cd36* and *Fabpm* is up-regulated to compensate a lipid malabsorption in *Hnf4g*<sup>-/-</sup> mice fed HF-HF. Although there is a gene overexpression of these transporters, we cannot exclude a translational down regulation of these transporters or a membrane mislocalization, both could participate in lipid malabsorption.

Although the role of FATP4 as a transporter for fatty acid uptake remains unclear, it has been shown that intestinal FATP4 is exclusively found intracellular instead of on the plasma membrane. FATP4 plays a role in fatty acid uptake through its intrinsic intracellular enzymatic activity, through a process known as “vectorial acylation”, i.e., the obligatory step of acyl-CoA formation for fatty acid transport across the plasma membrane, from intestinal lumen toward enterocytes [41; 42]. Thereby, a 25% decrease in *Fatp4* expression could participate to lipid malabsorption in *Hnf4g*<sup>-/-</sup> mice fed HF-HF.

The scavenger receptor is known for its function as a cholesterol transporter SR-B1, however its role in cholesterol and lipid metabolism remains unclear in intestine. It has been shown *in vitro* that addition of lipid micelles triggers SR-B1 lipid sensing and a signaling cascade leading to ApoB translocation from the apical membrane to the secretory basolateral domains [43; 44]. Some reports show that SR-B1 plays an important role in intestinal chylomicron production [45; 46]. Thus, through an indirect effect, the decrease in *Scarb1* gene expression prevents the lipid transfer in *Hnf4g*<sup>-/-</sup> mice fed HF-HF.

The chylomicron production loss is amplified by the decrease in gene expression of *Mttp* and *ApoB* that are necessary to the production of the lipoprotein particle.

A defect in biliary acid metabolism could also account for lipid malabsorption. When the entero-hepatic biliary acid cycle leading to micelle formation is deficient, dietary lipids are not properly embedded with micelles, precluding adequate absorption by enterocytes [47]. A down regulation of pancreatic lipase expression, enzyme responsible of dietary lipid hydrolysis before micelle embedding, could also be questioned [48].

In our previous work, we demonstrated that HNF-4 $\gamma$  plays a critical role in glucose homeostasis and that HNF-4 $\gamma$  loss leads to an improvement of glucose tolerance through a rise of GLP-1 incretin effect [15]. Here we show that the glucose tolerance improvement is maintained in *Hnf4g*<sup>-/-</sup> mice despite HF-HF feeding, in such a way that *Hnf4g* gene invalidation leads to a protection against the dietary glucose intolerance and insulin resistance. Accordingly, the jejunum GLP-1 content is increased in *Hnf4g*<sup>-/-</sup> mice fed HF-HF. The expression of *Gcg* gene, encoding GLP-1 in intestine, are increased in *Hnf4g*<sup>-/-</sup> mice fed control diet and are maintained in *Hnf4g*<sup>-/-</sup> mice fed HF-HF. The loss of HNF-4 $\gamma$  improves the GLP-1 producing cell homeostasis and the incretin effect, leading to a protection against a diet-induced deregulated glucose homeostasis.

In absence of HNF-4 $\gamma$ , there is an overexpression of HNF-4 $\alpha$  regardless the diet. It is difficult to assert that the observed effects were the direct consequence of HNF-4 $\gamma$  loss or resulted indirectly from HNF-4 $\alpha$  increment in *Hnf4g*<sup>-/-</sup> mouse intestine. However, we could hypothesized that HNF-4 $\alpha$  is able to compensate the loss of HNF-4 $\gamma$  for intestinal lipid absorption under control diet but that is overtaken under HF-HF diet. HNF-4 $\alpha$  and HNF-4 $\gamma$  are encoded by two different genes but share high homology in their DNA and ligand binding domains [11; 49]. Indeed, it has been recently shown that HNF-4 $\alpha$  and HNF-4 $\gamma$  share almost all their binding sites on chromatin [50] and regulate the expression of genes involved in fatty-

acid oxydation [51]. However, these two transcription factors have a different spatial distribution along the crypt-villus axis, HNF-4 $\alpha$  being expressed along the crypt to villus axis and HNF-4 $\gamma$  being restricted to the villus [52]. Furthermore, 9 isoforms of HNF-4 $\alpha$  raised from differential splicing and from 2 different promoters have been described [53]. These isoforms can have opposite roles in colitis and colitis associated colon cancer [54]. These observations show that the two forms of HNF-4, HNF-4 $\alpha$  and HNF-4 $\gamma$  play some specific roles but we cannot exclude redundancy for others roles, the balance between the expression of HNF-4 $\alpha$  and HNF-4 $\gamma$  being finely regulated to maintain gut homeostasis.

## **5. CONCLUSION**

We demonstrated here that loss of HNF-4 $\gamma$  in mice prevents obesity, glucose intolerance and insulin resistance induced by HF-HF diet. The protection against metabolic deleterious effects of HF-HF diet is mainly due to intestinal lipid malabsorption and glucose homeostasis improvement. Interestingly in human, *HNF4G* was identified as an obesity-associated locus in a meta-analysis of GWAS study [55] and could also be associated with pediatric obesity [56].

## **ACKNOWLEDGMENTS**

We thank C Ayassamy (Centre d'Exploration Fonctionnelle –UMRS 1138) for mouse care, C Amorin (Centre de génotypage et de biochimie – UMRS 1138) for mouse genotyping and A Lacombe (Preclin – IHU ICAN) for metabolic cage experiments.

## **AUTHORS' CONTRIBUTIONS**

S.A., C.O., E.G.-I., L.L.G., N.K., H.S. and A.R. designed experiments, acquired and analyzed data. S.A., H.S., F.A., K.C., P.S., A.L. and A.R. contributed to data interpretation and to the discussion. S.A., H.S., P.S., A.L. and A.R. wrote the manuscript. P.S. and A.R. reviewed and edited manuscript. A.R. is the guarantor of this work and, as such, had full access to all data in

the study and takes responsibility for the integrity of the data and the accuracy of the data analysis.

## **FUNDINGS**

This work was supported by INSERM, France, and Pierre & Marie Curie University (UPMC), Paris, France. S.A. and L.L.G. were recipient of a doctoral fellowship from Sorbonne Université. E.G.I. was recipient of an internship fellowship from University of Navarra and Caixa Bank (Spain).

## **CONFLICT OF INTEREST**

No potential conflicts of interest relevant to this article were reported.

**PRIOR PRESENTATION.** Parts of these data were presented at 51<sup>st</sup> annual meeting of the European Association for the Study of Diabetes (Diabetologia, 58 S28, 2015).

## REFERENCES

- [1] Benoit, G., Cooney, A., Giguere, V., Ingraham, H., Lazar, M., Muscat, G., et al., 2006. International Union of Pharmacology. LXVI. Orphan nuclear receptors. *Pharmacol Rev* 58(4):798-836.
- [2] Battle, M.A., Konopka, G., Parviz, F., Gaggl, A.L., Yang, C., Sladek, F.M., et al., 2006. Hepatocyte nuclear factor 4alpha orchestrates expression of cell adhesion proteins during the epithelial transformation of the developing liver. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(22):8419-8424.
- [3] Ribeiro, A., Archer, A., Le Beyec, J., Cattin, A.-L., Saint-Just, S., Pinçon-Raymond, M., et al., 2007. Hepatic Nuclear Factor-4, a key transcription factor at the crossroads between architecture and function of epithelia. *Recent Patents on Endocrine, Metabolic & Immune Drug Discovery* 1(2):176-181
- [4] Hwang-Verslues, W.W., Sladek, F.M., 2010. HNF4alpha--role in drug metabolism and potential drug target? *Curr Opin Pharmacol* 10(6):698-705.
- [5] Cattin, A.L., Le Beyec, J., Barreau, F., Saint-Just, S., Houllier, A., Gonzalez, F.J., et al., 2009. Hepatocyte nuclear factor 4alpha, a key factor for homeostasis, cell architecture, and barrier function of the adult intestinal epithelium. *Mol Cell Biol* 29(23):6294-6308.
- [6] Frochot, V., Alqub, M., Cattin, A.L., Carriere, V., Houllier, A., Baraille, F., et al., 2012. The transcription factor HNF-4alpha: a key factor of the intestinal uptake of fatty acids in mouse. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 302(11):G1253-1263.
- [7] Montenegro-Miranda, P.S., van der Meer, J.H.M., Jones, C., Meisner, S., Vermeulen, J.L.M., Koster, J., et al., 2020. A Novel Organoid Model of Damage and Repair Identifies HNF4alpha as a Critical Regulator of Intestinal Epithelial Regeneration. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol* 10(2):209-223.
- [8] Saandi, T., Baraille, F., Derbal-Wolfrom, L., Cattin, A.L., Benahmed, F., Martin, E., et al., 2013. Regulation of the tumor suppressor homeogene Cdx2 by HNF4alpha in intestinal cancer. *Oncogene* 32(32):3782-3788.
- [9] Bookout, A.L., Jeong, Y., Downes, M., Yu, R.T., Evans, R.M., Mangelsdorf, D.J., 2006. Anatomical profiling of nuclear receptor expression reveals a hierarchical transcriptional network. *Cell* 126(4):789-799.
- [10] Plengvidhya, N., Antonellis, A., Wogan, L.T., Poleev, A., Borgschulze, M., Warram, J.H., et al., 1999. Hepatocyte nuclear factor-4gamma: cDNA sequence, gene organization, and mutation screening in early-onset autosomal-dominant type 2 diabetes. *Diabetes* 48(10):2099-2102.
- [11] Taraviras, S., Mantamadiotis, T., Dong-Si, T., Mincheva, A., Lichter, P., Drewes, T., et al., 2000. Primary structure, chromosomal mapping, expression and transcriptional activity of murine hepatocyte nuclear factor 4gamma. *Biochim Biophys Acta* 1490(1-2):21-32.
- [12] Li, X., Udager, A.M., Hu, C., Qiao, X.T., Richards, N., Gumucio, D.L., 2009. Dynamic patterning at the pylorus: formation of an epithelial intestine-stomach boundary in late fetal life. *Dev Dyn* 238(12):3205-3217.
- [13] Sasaki, S., Urabe, M., Maeda, T., Suzuki, J., Irie, R., Suzuki, M., et al., 2018. Induction of Hepatic Metabolic Functions by a Novel Variant of Hepatocyte Nuclear Factor 4gamma. *Mol Cell Biol* 38(24).
- [14] Lindeboom, R.G., van Voorthuijsen, L., Oost, K.C., Rodriguez-Colman, M.J., Luna-Velez, M.V., Furlan, C., et al., 2018. Integrative multi-omics analysis of intestinal organoid differentiation. *Mol Syst Biol* 14(6):e8227.
- [15] Baraille, F., Ayari, S., Carriere, V., Osinski, C., Garbin, K., Blondeau, B., et al., 2015. Glucose Tolerance Is Improved in Mice Invalidated for the Nuclear Receptor HNF-4gamma: A Critical Role for Enteroendocrine Cell Lineage. *Diabetes* 64(8):2744-2756.

- [16] Stahel, P., Xiao, C., Nahmias, A., Lewis, G.F., 2020. Role of the Gut in Diabetic Dyslipidemia. *Front Endocrinol (Lausanne)* 11:116.
- [17] Bansal, S., Buring, J.E., Rifai, N., Mora, S., Sacks, F.M., Ridker, P.M., 2007. Fasting compared with nonfasting triglycerides and risk of cardiovascular events in women. *JAMA* 298(3):309-316.
- [18] Duez, H., Pavlic, M., Lewis, G.F., 2008. Mechanism of intestinal lipoprotein overproduction in insulin resistant humans. *Atheroscler Suppl* 9(2):33-38.
- [19] Hsieh, J., Hayashi, A.A., Webb, J., Adeli, K., 2008. Postprandial dyslipidemia in insulin resistance: mechanisms and role of intestinal insulin sensitivity. *Atheroscler Suppl* 9(2):7-13.
- [20] Nordestgaard, B.G., Benn, M., Schnohr, P., Tybjaerg-Hansen, A., 2007. Nonfasting triglycerides and risk of myocardial infarction, ischemic heart disease, and death in men and women. *JAMA* 298(3):299-308.
- [21] Haidari, M., Leung, N., Mahbub, F., Uffelman, K.D., Kohen-Avramoglu, R., Lewis, G.F., et al., 2002. Fasting and postprandial overproduction of intestinally derived lipoproteins in an animal model of insulin resistance. Evidence that chronic fructose feeding in the hamster is accompanied by enhanced intestinal de novo lipogenesis and ApoB48-containing lipoprotein overproduction. *J Biol Chem* 277(35):31646-31655.
- [22] Vine, D.F., Takechi, R., Russell, J.C., Proctor, S.D., 2007. Impaired postprandial apolipoprotein-B48 metabolism in the obese, insulin-resistant JCR:LA-cp rat: increased atherogenicity for the metabolic syndrome. *Atherosclerosis* 190(2):282-290.
- [23] Duez, H., Lamarche, B., Uffelman, K.D., Valero, R., Cohn, J.S., Lewis, G.F., 2006. Hyperinsulinemia is associated with increased production rate of intestinal apolipoprotein B-48-containing lipoproteins in humans. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26(6):1357-1363.
- [24] Adeli, K., Lewis, G.F., 2008. Intestinal lipoprotein overproduction in insulin-resistant states. *Curr Opin Lipidol* 19(3):221-228.
- [25] Levy, E., Sinnott, D., Thibault, L., Nguyen, T.D., Delvin, E., Menard, D., 1996. Insulin modulation of newly synthesized apolipoproteins B-100 and B-48 in human fetal intestine: gene expression and mRNA editing are not involved. *FEBS Lett* 393(2-3):253-258.
- [26] Lewis, G.F., Uffelman, K., Naples, M., Szeto, L., Haidari, M., Adeli, K., 2005. Intestinal lipoprotein overproduction, a newly recognized component of insulin resistance, is ameliorated by the insulin sensitizer rosiglitazone: studies in the fructose-fed Syrian golden hamster. *Endocrinology* 146(1):247-255.
- [27] Nogueira, J.P., Maraninchi, M., Beliard, S., Padilla, N., Duvillard, L., Mancini, J., et al., 2012. Absence of acute inhibitory effect of insulin on chylomicron production in type 2 diabetes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 32(4):1039-1044.
- [28] Shikany, J.M., White, G.L., Jr., 2000. Dietary guidelines for chronic disease prevention. *South Med J* 93(12):1138-1151.
- [29] Williams, K.J., 2008. Molecular processes that handle -- and mishandle -- dietary lipids. *J Clin Invest* 118(10):3247-3259.
- [30] Gimeno, R.E., Hirsch, D.J., Punreddy, S., Sun, Y., Ortegon, A.M., Wu, H., et al., 2003. Targeted deletion of fatty acid transport protein-4 results in early embryonic lethality. *J Biol Chem* 278(49):49512-49516.
- [31] Stahl, A., Hirsch, D.J., Gimeno, R.E., Punreddy, S., Ge, P., Watson, N., et al., 1999. Identification of the major intestinal fatty acid transport protein. *Mol Cell* 4(3):299-308.
- [32] Davidson, N.O., Shelness, G.S., 2000. APOLIPOPROTEIN B: mRNA editing, lipoprotein assembly, and presecretory degradation. *Annu Rev Nutr* 20:169-193.
- [33] Iqbal, J., Hussain, M.M., 2009. Intestinal lipid absorption. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 296(6):E1183-1194.

- [34] Robertson, M.D., Parkes, M., Warren, B.F., Ferguson, D.J., Jackson, K.G., Jewell, D.P., et al., 2003. Mobilisation of enterocyte fat stores by oral glucose in humans. *Gut* 52(6):834-839.
- [35] Layec, S., Beyer, L., Corcos, O., Alves, A., Dray, X., Amiot, A., et al., 2013. Increased intestinal absorption by segmental reversal of the small bowel in adult patients with short-bowel syndrome: a case-control study. *Am J Clin Nutr* 97(1):100-108.
- [36] Archer, A., Sauvaget, D., Chauffeton, V., Bouchet, P.E., Chambaz, J., Pincon-Raymond, M., et al., 2005. Intestinal apolipoprotein A-IV gene transcription is controlled by two hormone-responsive elements: a role for hepatic nuclear factor-4 isoforms. *Mol Endocrinol* 19(9):2320-2334.
- [37] Gerdin, A.K., Surve, V.V., Jonsson, M., Bjursell, M., Bjorkman, M., Edenro, A., et al., 2006. Phenotypic screening of hepatocyte nuclear factor (HNF) 4-gamma receptor knockout mice. *Biochem Biophys Res Commun* 349(2):825-832.
- [38] Charlton, M., Krishnan, A., Viker, K., Sanderson, S., Cazanave, S., McConico, A., et al., 2011. Fast food diet mouse: novel small animal model of NASH with ballooning, progressive fibrosis, and high physiological fidelity to the human condition. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 301(5):G825-834.
- [39] Dissard, R., Klein, J., Caubet, C., Breuil, B., Siwy, J., Hoffman, J., et al., 2013. Long term metabolic syndrome induced by a high fat high fructose diet leads to minimal renal injury in C57BL/6 mice. *PLoS One* 8(10):e76703.
- [40] Tsuchiya, H., Ebata, Y., Sakabe, T., Hama, S., Kogure, K., Shiota, G., 2013. High-fat, high-fructose diet induces hepatic iron overload via a hepcidin-independent mechanism prior to the onset of liver steatosis and insulin resistance in mice. *Metabolism* 62(1):62-69.
- [41] Digel, M., Staffer, S., Eehalt, F., Stremmel, W., Eehalt, R., Fullekrug, J., 2011. FATP4 contributes as an enzyme to the basal and insulin-mediated fatty acid uptake of C(2)C(1)(2) muscle cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 301(5):E785-796.
- [42] Milger, K., Herrmann, T., Becker, C., Gotthardt, D., Zickwolf, J., Eehalt, R., et al., 2006. Cellular uptake of fatty acids driven by the ER-localized acyl-CoA synthetase FATP4. *J Cell Sci* 119(Pt 22):4678-4688.
- [43] Beaslas, O., Cueille, C., Delers, F., Chateau, D., Chambaz, J., Rousset, M., et al., 2009. Sensing of dietary lipids by enterocytes: a new role for SR-BI/CLA-1. *PLoS One* 4(1):e4278.
- [44] Saddar, S., Carriere, V., Lee, W.R., Tanigaki, K., Yuhanna, I.S., Parathath, S., et al., 2013. Scavenger receptor class B type I is a plasma membrane cholesterol sensor. *Circ Res* 112(1):140-151.
- [45] Bura, K.S., Lord, C., Marshall, S., McDaniel, A., Thomas, G., Warriar, M., et al., 2013. Intestinal SR-BI does not impact cholesterol absorption or transintestinal cholesterol efflux in mice. *J Lipid Res* 54(6):1567-1577.
- [46] Hayashi, A.A., Webb, J., Choi, J., Baker, C., Lino, M., Trigatti, B., et al., 2011. Intestinal SR-BI is upregulated in insulin-resistant states and is associated with overproduction of intestinal apoB48-containing lipoproteins. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 301(2):G326-337.
- [47] Nordskog, B.K., Phan, C.T., Nutting, D.F., Tso, P., 2001. An examination of the factors affecting intestinal lymphatic transport of dietary lipids. *Adv Drug Deliv Rev* 50(1-2):21-44.
- [48] Alkaade, S., Vareedayah, A.A., 2017. A primer on exocrine pancreatic insufficiency, fat malabsorption, and fatty acid abnormalities. *Am J Manag Care* 23(12 Suppl):S203-S209.
- [49] Drewes, T., Senkel, S., Holewa, B., Ryffel, G.U., 1996. Human hepatocyte nuclear factor 4 isoforms are encoded by distinct and differentially expressed genes. *Mol Cell Biol* 16(3):925-931.



- [50] Chen, L., Toke, N.H., Luo, S., Vasoya, R.P., Fullem, R.L., Parthasarathy, A., et al., 2019. A reinforcing HNF4-SMAD4 feed-forward module stabilizes enterocyte identity. *Nat Genet* 51(5):777-785.
- [51] Chen, L., Vasoya, R.P., Toke, N.H., Parthasarathy, A., Luo, S., Chiles, E., et al., 2020. HNF4 Regulates Fatty Acid Oxidation and Is Required for Renewal of Intestinal Stem Cells in Mice. *Gastroenterology* 158(4):985-999 e989.
- [52] Sauvaget, D., Chauffeton, V., Citadelle, D., Chatelet, F.P., Cywiner-Golenzer, C., Chambaz, J., et al., 2002. Restriction of apolipoprotein A-IV gene expression to the intestine villus depends on a hormone-responsive element and parallels differential expression of the hepatic nuclear factor 4alpha and gamma isoforms. *J Biol Chem* 277(37):34540-34548.
- [53] Torres-Padilla, M.E., Fougere-Deschatrette, C., Weiss, M.C., 2001. Expression of HNF4alpha isoforms in mouse liver development is regulated by sequential promoter usage and constitutive 3' end splicing. *Mech Dev* 109(2):183-193.
- [54] Chellappa, K., Deol, P., Evans, J.R., Vuong, L.M., Chen, G., Briancon, N., et al., 2016. Opposing roles of nuclear receptor HNF4alpha isoforms in colitis and colitis-associated colon cancer. *Elife* 5.
- [55] Berndt, S.I., Gustafsson, S., Magi, R., Ganna, A., Wheeler, E., Feitosa, M.F., et al., 2013. Genome-wide meta-analysis identifies 11 new loci for anthropometric traits and provides insights into genetic architecture. *Nat Genet* 45(5):501-512.
- [56] Selvanayagam, T., Walker, S., Gazzellone, M.J., Kellam, B., Cytrynbaum, C., Stavropoulos, D.J., et al., 2018. Genome-wide copy number variation analysis identifies novel candidate loci associated with pediatric obesity. *Eur J Hum Genet* 26(11):1588-1596.

**Table 1**

Oligonucleotide sequences used for qPCR analysis

<b>Gene name</b>	<b>Sequence (5' to 3')</b>
<i>cyclophilin</i>	Fwd: GCCTTAGCTACAGGAGAGAA
	Rev: TTCCTCCTGTGCCATCTC
<i>fabpm</i>	Fwd: ATGGCTGCTGCCTTTCAC
	Rev: GATCTGGAGGTCCCATTTC
<i>Srb1</i>	Fwd: GCCCATCATCTGCCAACT
	Rev: TCCTGGGAGCCCTTTTTACT
<i>Adrp</i>	Fwd: CTCCACTCCACTGTCCACCT
	Rev: GCTTATCCTGAGCACCTGA
<i>Gcg</i>	Fwd: CACGCCCTTCAAGACACAG
	Rev: GTCCTCATGCGCTTCTGTC
<i>Apo B</i>	Fwd: GCCCATTGTGGACAAGTTGATC
	Rev: CCAGGACTTGGAGGTCTTGGA
<i>Mtp</i>	Fwd: GGCAGTGCTTTTTCTCTGCT
	Rev: TGAGAGGCCAGTTGTGTGAC
<i>CD36</i>	Fwd: GCCAAGCTATTGCGACATGA
	Rev: ATCTCAATGTCCGAGACTTTTCAAC
<i>Fatp4</i>	Fwd: TATGGCTTCCCTGGTGTACTAT
	Rev: TTCTTCCGGATCACCACAGTC

## Figure legends

**Figure 1: Impact of high fat-high fructose diet on energy homeostasis in *Hnf4g*<sup>-/-</sup> and WT mice.** (A) Body weight of mice fed control diet or HF-HF diet during 6 weeks. Results were from 5 independent experiments with  $12 \leq n \leq 36$  for each condition. (B) Body fat mass evaluated by MNR at 5 weeks of diet. (C) Food intake is the sum of pellet quantity and drinking water volume recorded for 5 consecutive days in metabolic cages and is expressed in kcal/day/Kg mouse. Control diet = 3.2kcal/g; High-fat diet = 5.24kcal/g; Fructose 30% = 1.2kcal/mL. (D) The locomotor activity is the sum of XY and XZ mean locomotor activity from 5 consecutive nights and days. (E) The energy expenditure, measured by indirect calorimetry, is the mean of the energy expenditure from 5 consecutive nights and days. Results (B-E) were from 2 independent experiments. \*\*\*\*  $p < 0.0001$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*  $p < 0.05$ ; ns not significant.

**Figure 2: Impact of high fat-high fructose diet on intestinal nutrient absorption in *Hnf4g*<sup>-/-</sup> and WT mice.** (A) Total fecal calories were determined by bomb calorimetry in daily collected feces from 3 to 5 consecutive days. Results are the mean of 4 independent measures during 2 experiments (n = 5 or 6 animals in each condition). (B) The lipid content into feces from *Hnf4g*<sup>-/-</sup> and WT mice were measured Results are the mean of 3 independent measures during 2 experiments (n = 5 or 6 animals in each condition). (C) The amount of triglycerides stored in epithelial cells were quantified in isolated epithelial cells. (D) Plasma triglyceride concentrations were measured at 30, 60, 90 and 120 min after a 200 microL olive oil bolus (T0 is indicated by an arrow). n= 4 or 5 animals per condition. \*\*\*  $p < 0.001$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*  $p < 0.05$ ; ns not significant.

**Figure 3: Impact of high fat-high fructose diet on jejunal expression of genes involved in lipid uptake, storage and secretion in *Hnf4g*<sup>-/-</sup> and WT mice.** Quantitative RT-PCRs for gene expression of (A) fatty acid and cholesterol membrane transporters and (B) genes involved in storage and secretion of chylomicrons in jejunum of *Hnf4g*<sup>-/-</sup> and WT mice fed control diet or HF-HF diet. The mRNA levels were normalized by cyclophilin mRNA level. Results were mean of 3 to 6 independent experiments. \*\*\*  $p < 0.001$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*  $p < 0.05$ ; ns not significant.

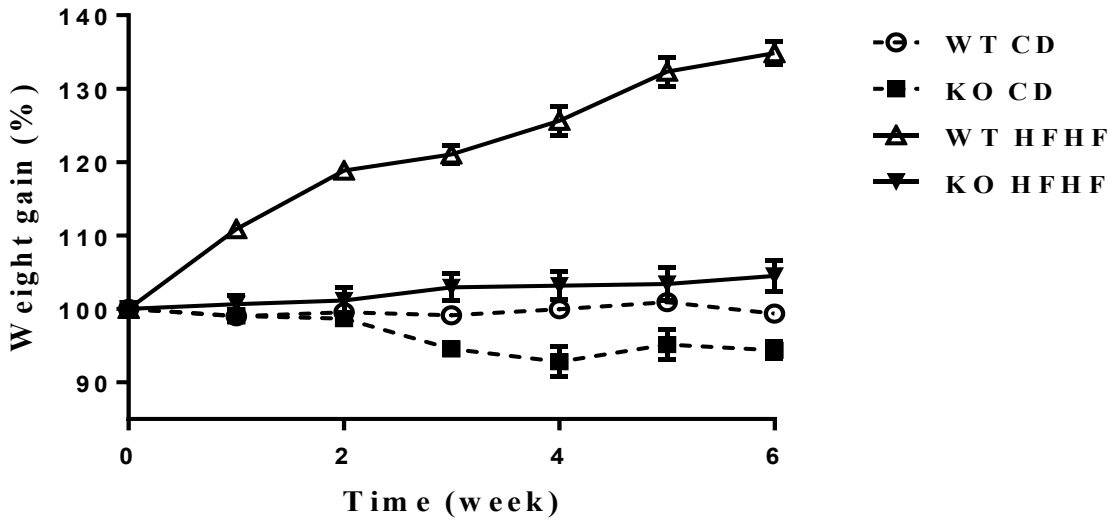
**Figure 4: Impact of high fat-high fructose diet on the glucose homeostasis in *Hnf4g*<sup>-/-</sup> and WT mice.** (A) Oral glucose tolerance test (OGTT, 3.6g glucose/kg) after 15h fasting. (B) Area under the curve of the OGTT. (C) Fasted blood glucose. Results (A-C) were mean of 6 independent experiments. (D) Fasted blood insulin. (E) The HOMA-IR was calculated from blood glucose and insulin values in (C) and (D) as follow: [fasted blood glucose (mg/dL)] x [fasted blood insulin (mU/L)] / 405. Results (D-E) were mean of 3 independent experiments. \*\*\*  $p < 0.001$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*  $p < 0.05$ ; ns not significant.

**Figure 5: Impact of high fat-high fructose diet on the intestinal GLP-1 homeostasis in *Hnf4g*<sup>-/-</sup> and WT mice.** (A) Total plasma total GLP-1 10 min after glucose bolus. Results were mean of 4 independent experiments. (B) Total GLP-1 content in jejunum. Results were mean of 2 independent experiments. (C) Quantitative RT-PCRs for *Gcg* gene expression. The mRNA levels were normalized by cyclophilin mRNA level. Results were mean of 4 independent experiments. \*\*\*  $p < 0.001$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*  $p < 0.05$ ; ns not significant

## Supplementary Figure legends

**Supplementary Figure 1: Nutrient composition of feces.** Results are from pooled feces daily collected for 5 consecutive days. (n = 5 to 6 for each condition).

**Supplementary Figure 2: Quantitative RT-PCRs for gene expression of HNF-4a in jejunum of *Hnf4g*<sup>-/-</sup> and WT mice fed control diet or HF-HF diet.** The mRNA levels were normalized by cyclophilin mRNA level. Results were mean of 5 independent experiments. \*\*\*\*  $p < 0.0001$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ .

**A**

multiple comparison test	1 week	2 week	3 week	4 week	5 week	6 week
WT CD vs KO CD	ns	ns	ns	ns	*	ns
WT HFHF vs KO HFHF	ns	**	**	**	***	****
WT CD vs WT HF-HF	ns	**	***	***	***	****
KO CD vs KO HF-HF	ns	ns	ns	ns	ns	ns

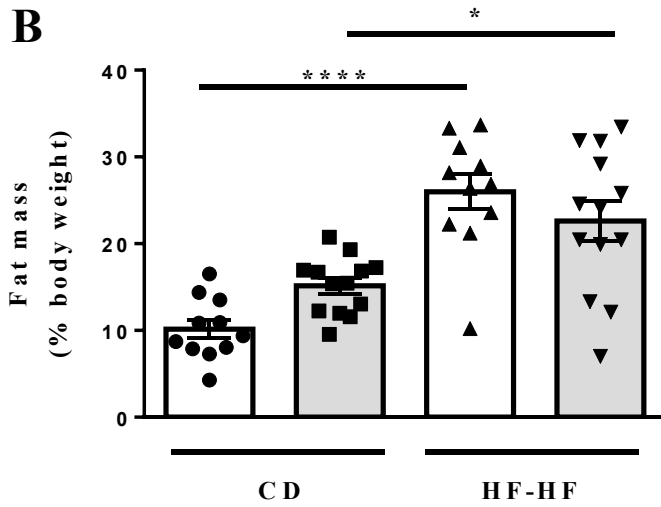
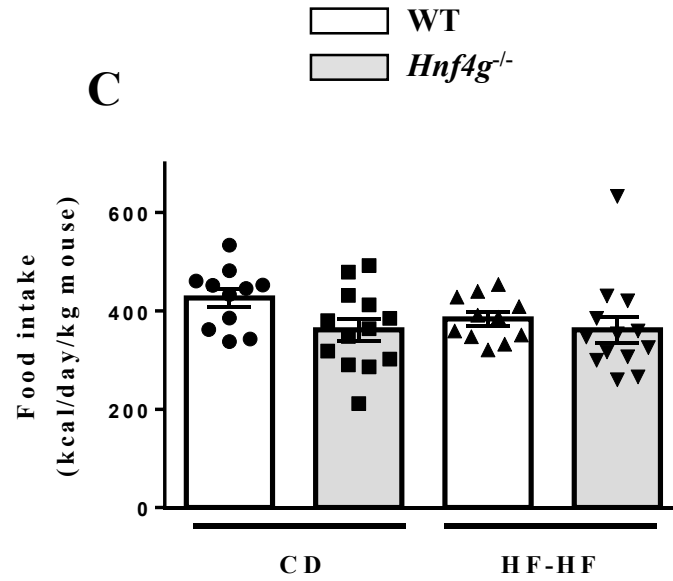
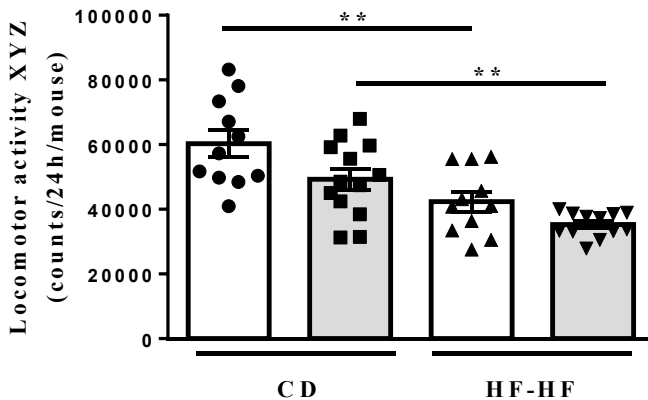
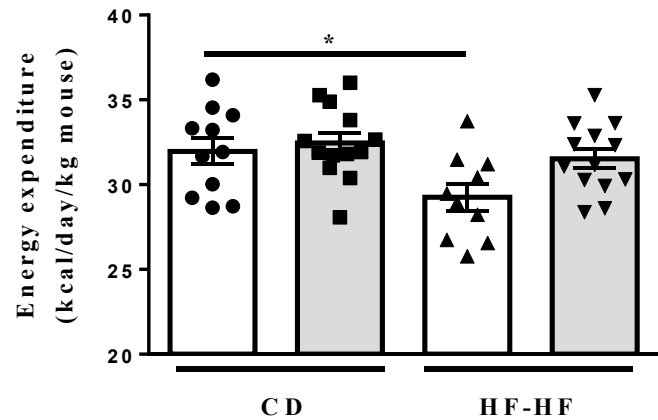
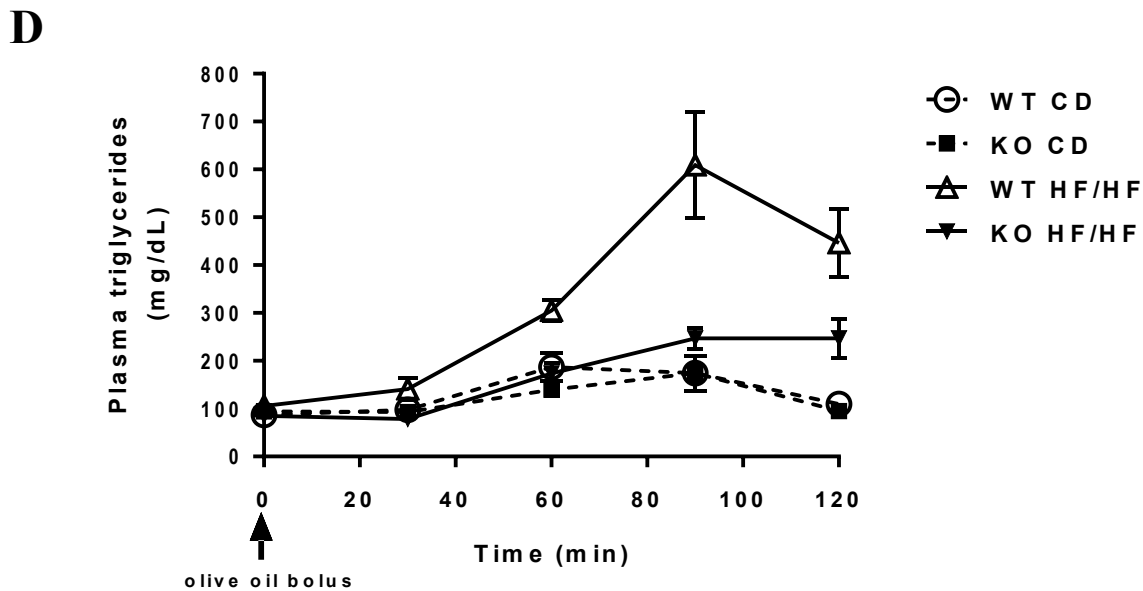
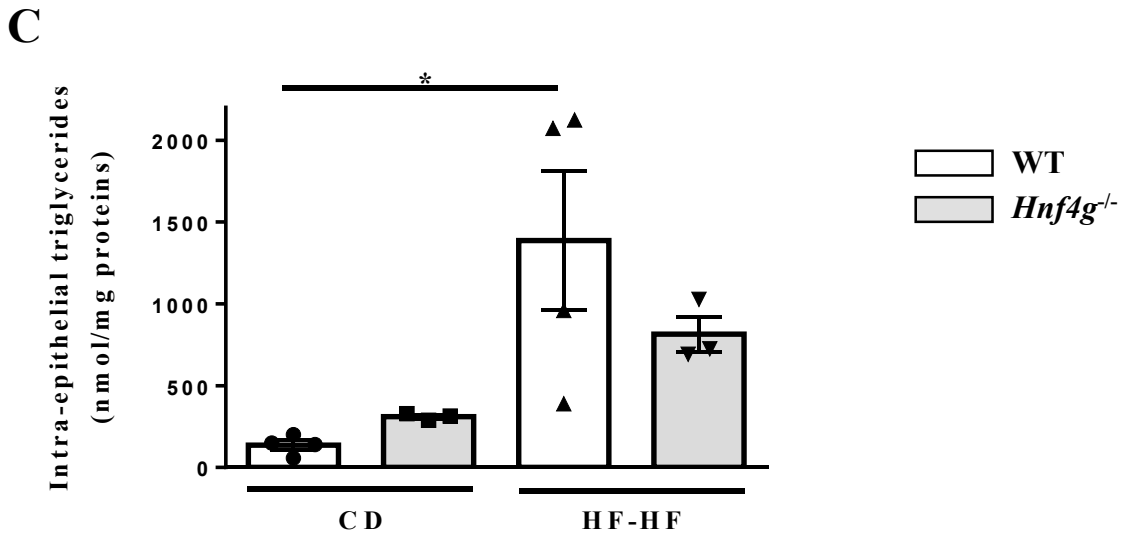
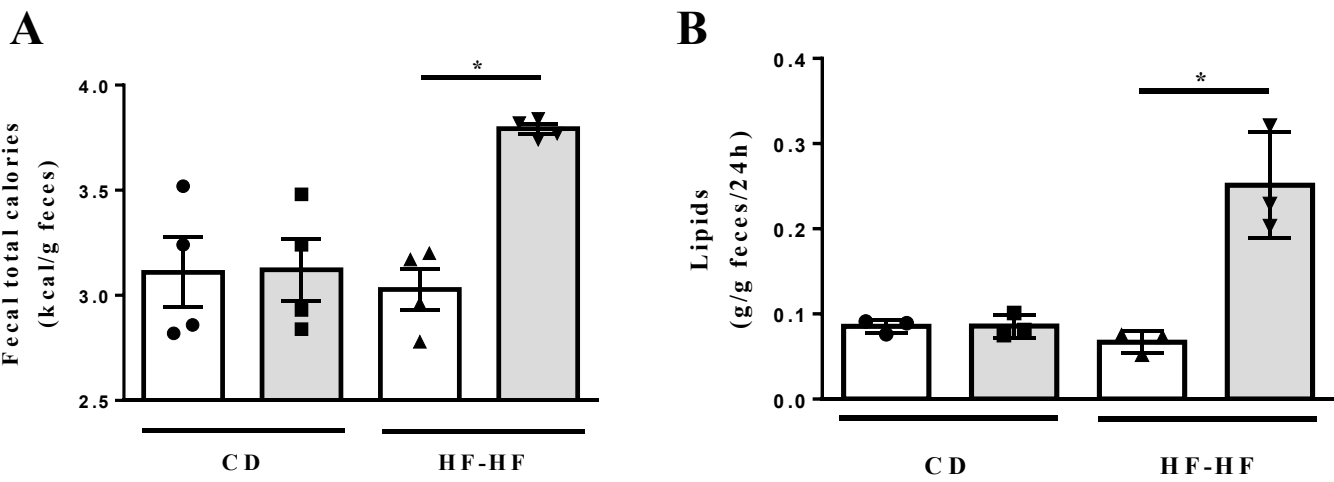
**B****C****D****E**

Figure 1, Ayari S &amp; al



multiple comparison test	30 min	60 min	90 min	120 min
WT CD vs KO CD	ns	ns	ns	ns
WT HFHF vs KO HFHF	ns	ns	****	**
WT CD vs WT HF-HF	ns	ns	****	****
KO CD vs KO HF-HF	ns	ns	ns	*

Figure 2, Ayari S & al

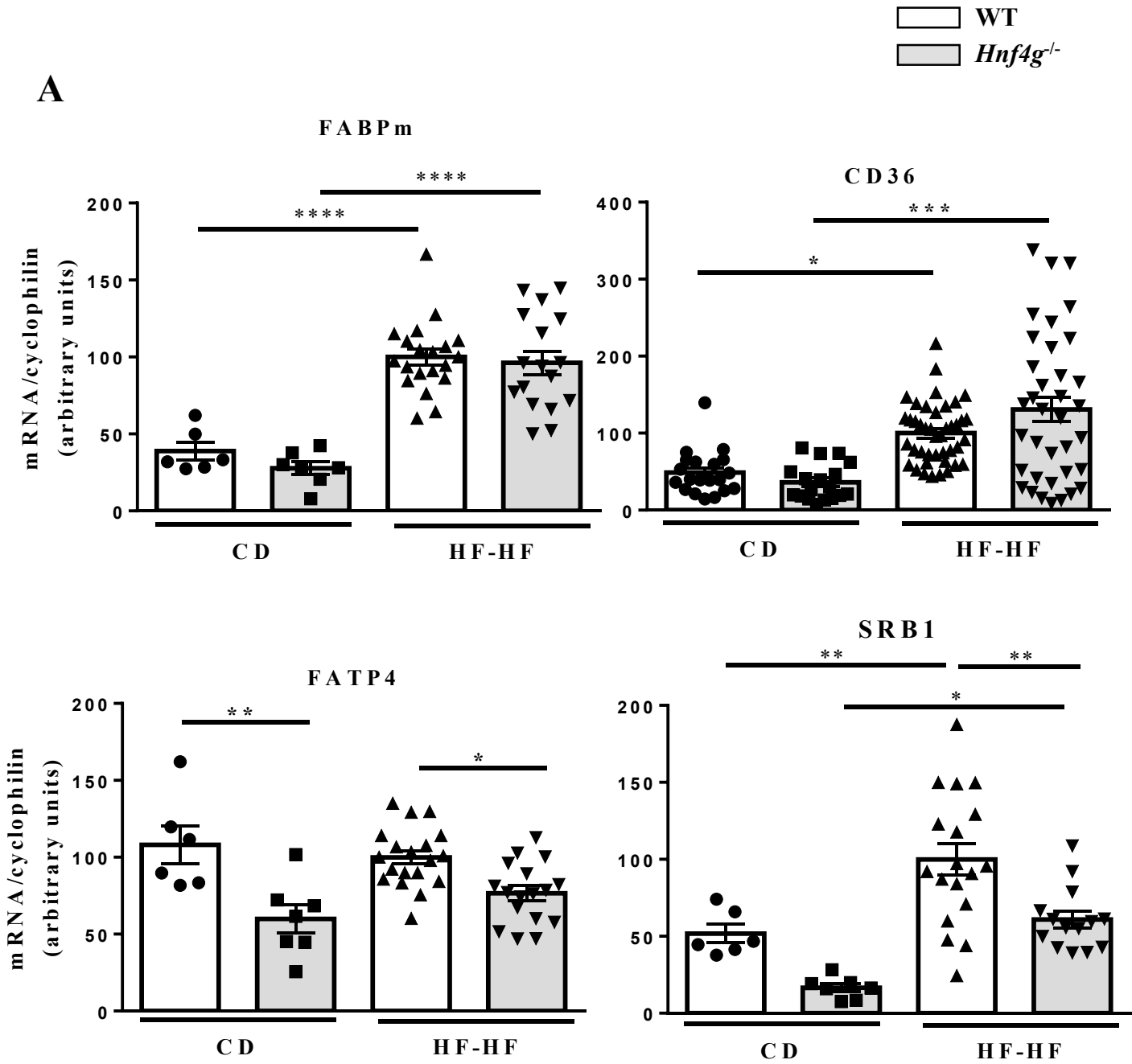
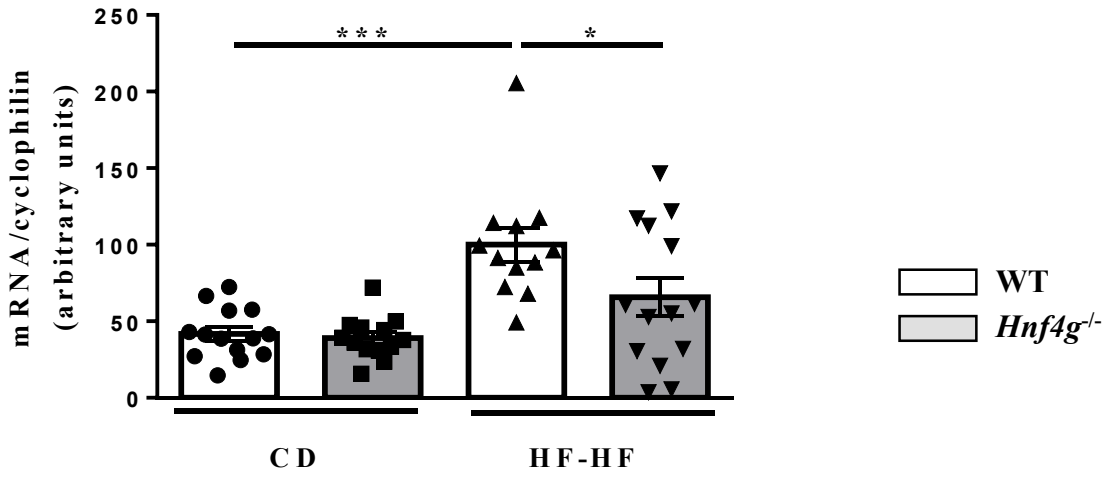
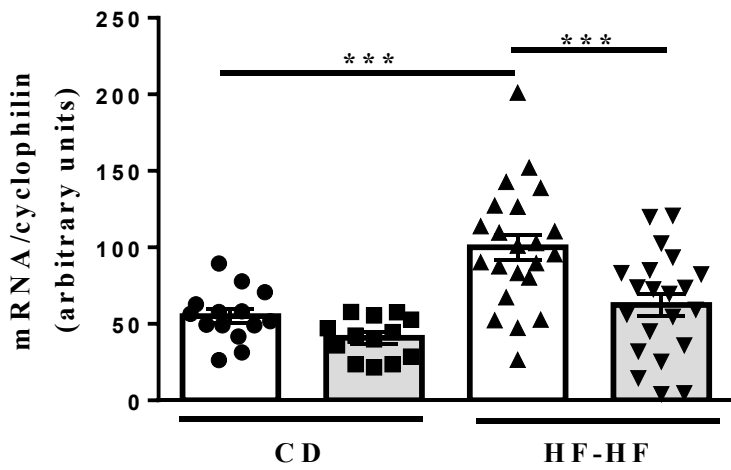
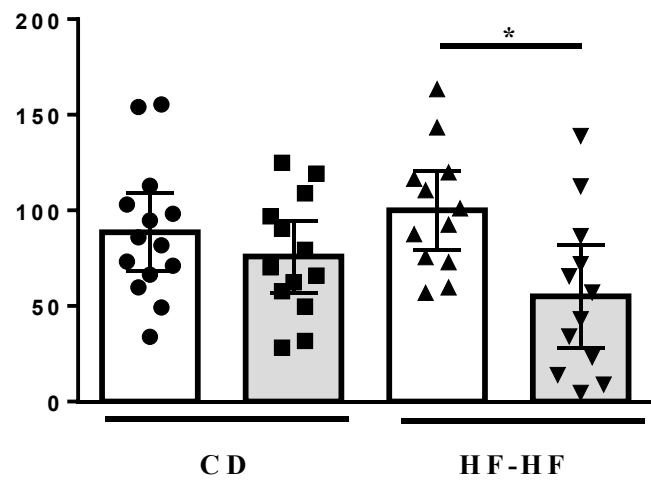
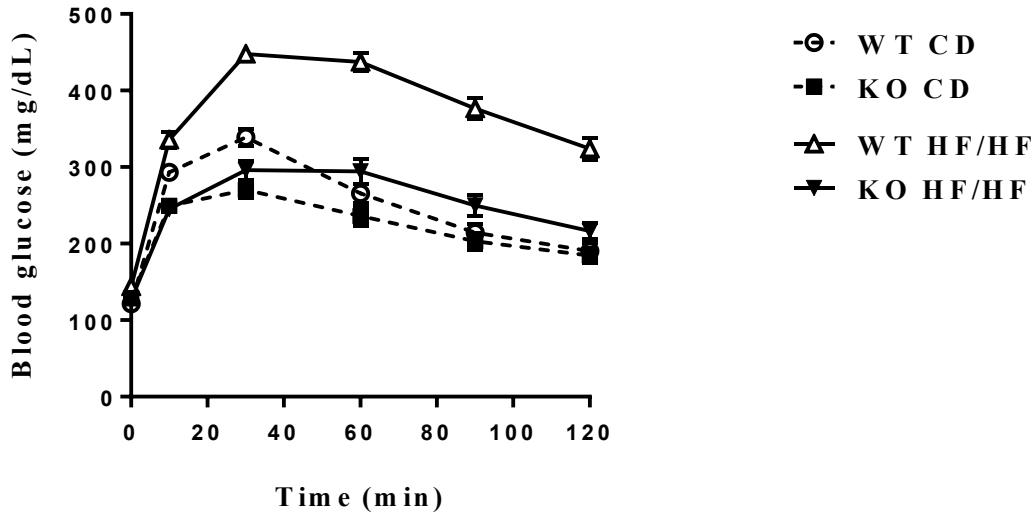


Figure 3, Ayari S & al



**B****A D R P****M T T P****A p o B****Figure 3, Ayari S & al**

**A**

multiple comparison test	10 min	30 min	60 min	90 min	120 min
WT CD vs KO CD	*	****	ns	ns	ns
WT HFHF vs KO HFHF	****	****	****	****	****
WT CD vs WT HF-HF	*	****	****	****	****
KO CD vs KO HF-HF	ns	ns	**	*	ns

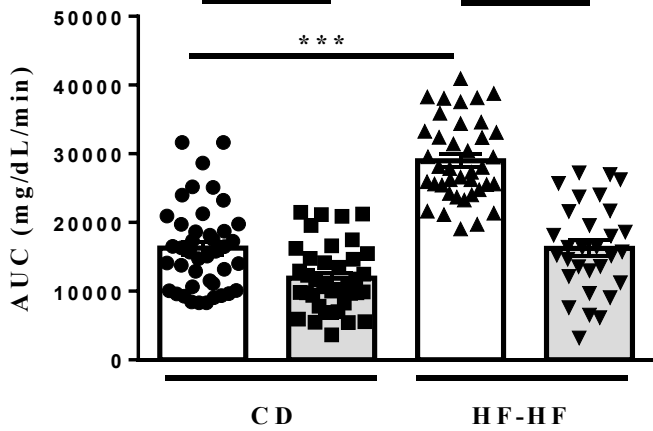
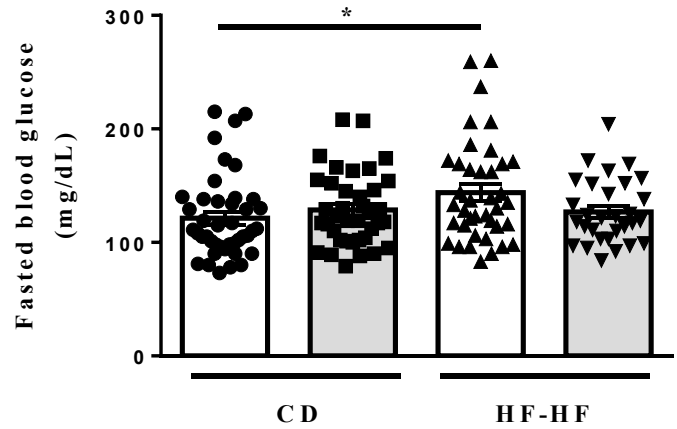
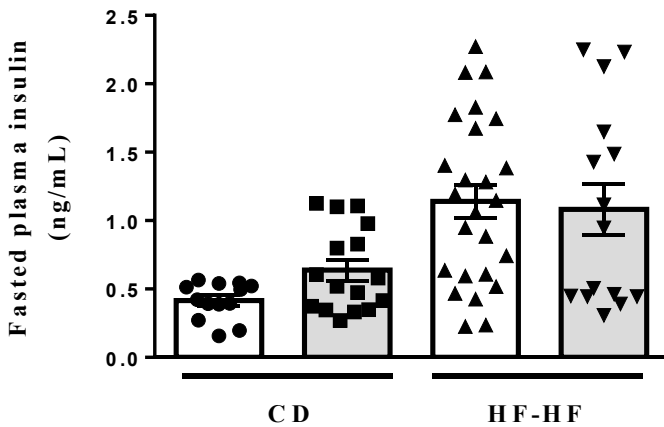
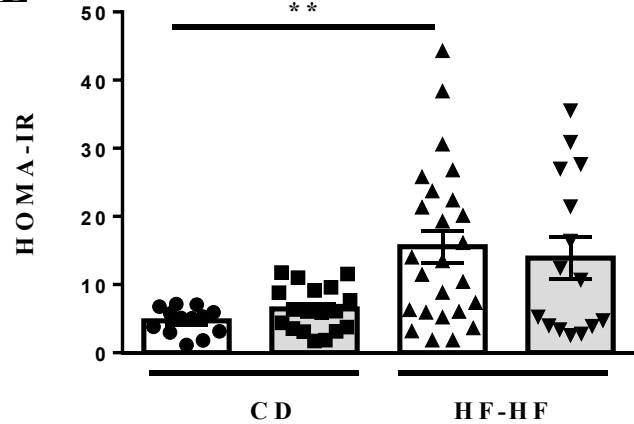
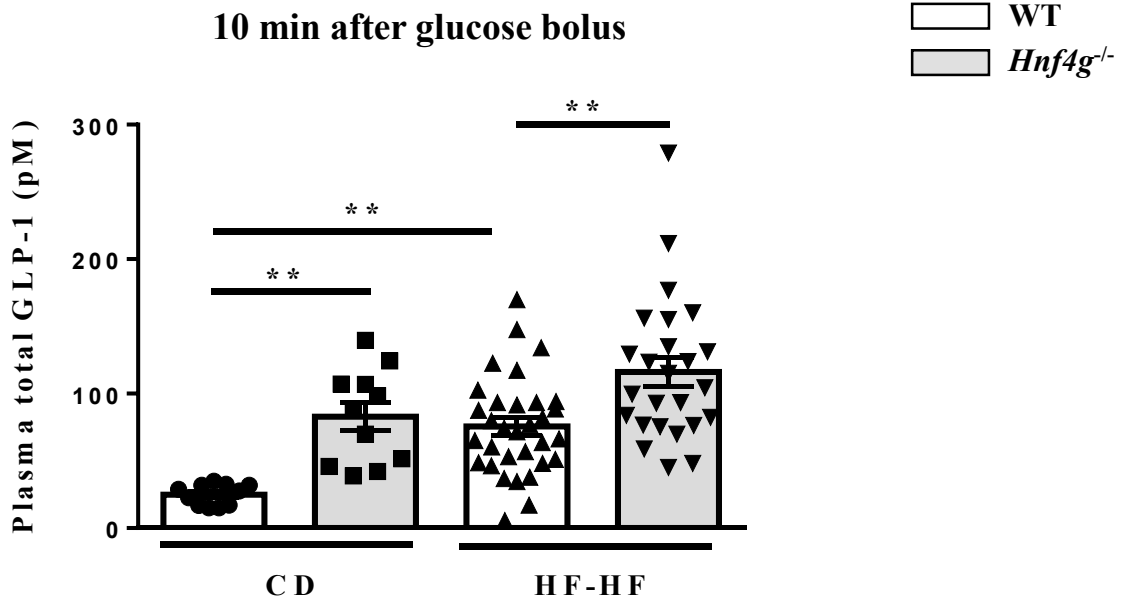
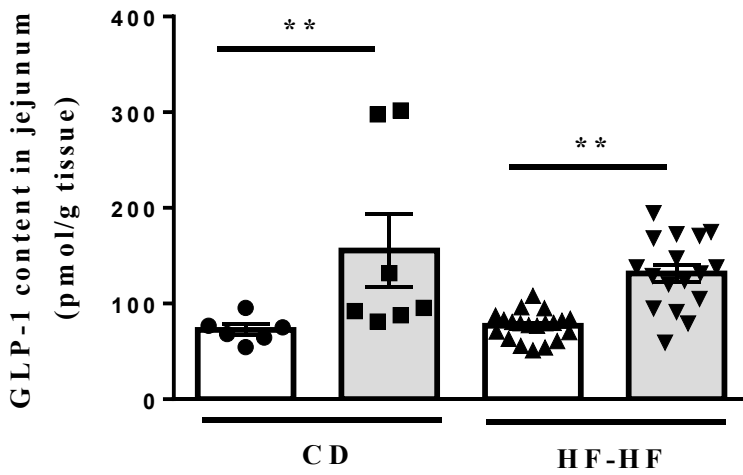
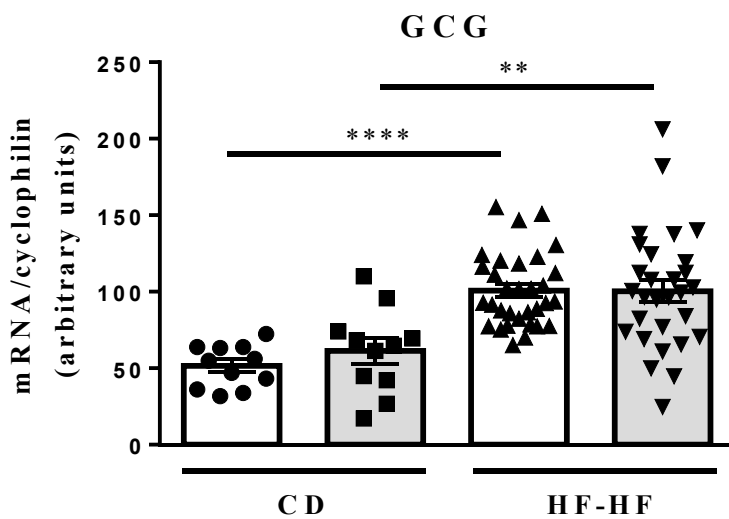
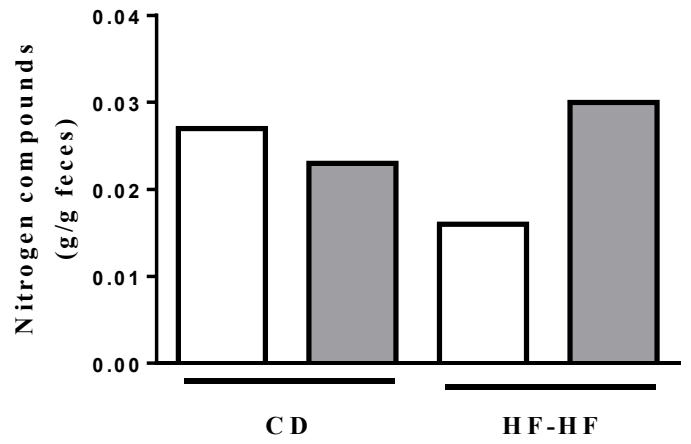
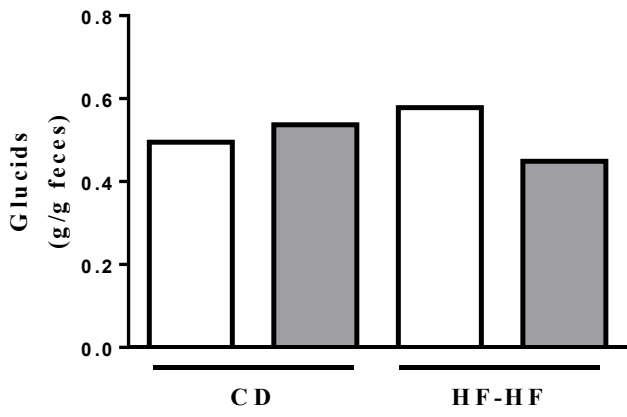
**B****C****D****E**

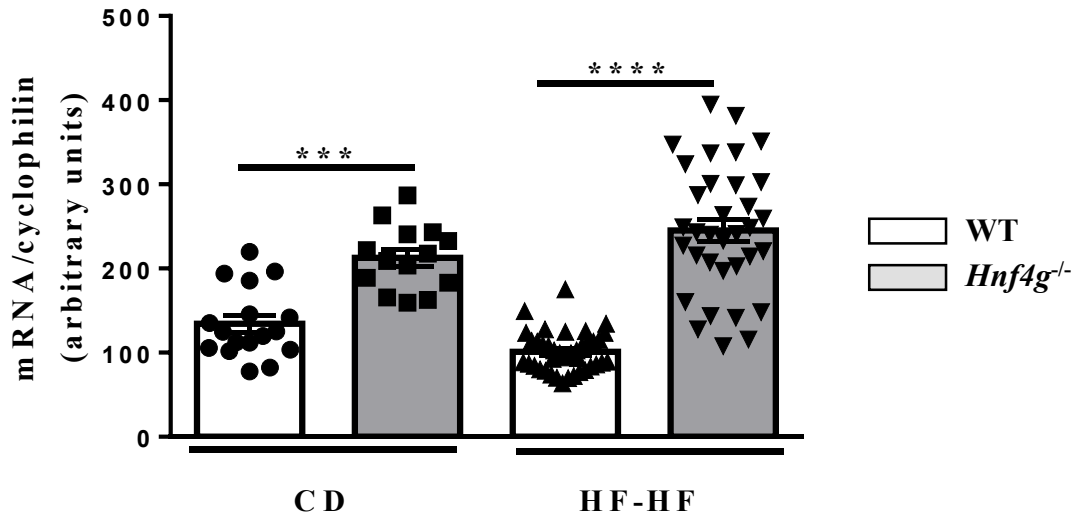
Figure 4, Ayari S &amp; al

**A****B****C****Figure 5, Ayari S & al**

□ WT  
■ *Hnf4g*<sup>-/-</sup>



# HNF4 $\alpha$



## Résumé

Les glucides et les édulcorants sont détectés par le récepteur du goût sucré à la membrane apicale des cellules entéroendocrines (CEE). Ce récepteur est un hétérodimère T1R2/T1R3 couplés à la protéine G gustducine dont la sous-unité  $\alpha$  est codée par le gène *GNAT3*. L'activation du récepteur du goût sucré entraîne une cascade de signalisation conduisant à la sécrétion de l'incrétine GLP-1 par les CEE. Les maladies métaboliques telles que l'obésité et le diabète de type 2 sont associées à des altérations de l'homéostasie glucidique et énergétique. Elles entraînent notamment une diminution de la concentration plasmatique en entérohormones comme le GLP-1, dont la sécrétion est restaurée après rémission des maladies métaboliques. L'objectif de ma thèse a été d'étudier le rôle de la voie de transduction du goût sucré, et particulièrement de l' $\alpha$ -gustducine, dans les maladies métaboliques et leur rémission. Les résultats obtenus montrent que l'obésité conduit à une altération de la voie de transduction du goût sucré dans les CEE et notamment à une sous-expression de *GNAT3* participant au défaut de sécrétion du GLP-1. Dans un contexte d'amélioration métabolique après remodelage intestinal, la restauration de la sécrétion de GLP-1 est en partie due à une sur-expression de *GNAT3* dans l'anse alimentaire. De plus, la voie de transduction du goût sucré est exprimée dans l'intestin spécifiquement dans les CEE. En revanche, le microbiote intestinal dysbiotique n'a pas d'impact significatif sur l'expression de *GNAT3* lors de la mise en place des maladies métaboliques. Pour conclure, cette étude met en exergue le rôle de la voie de transduction du goût sucré dans le défaut de sécrétion de GLP-1 dans les maladies métaboliques. L'identification de molécules capables de stimuler la voie intestinale de transduction du goût sucré permettrait de stimuler la sécrétion endogène de GLP-1 chez les patients obèses avec ou sans diabète.

*Mots clés : intestin ;  $\alpha$ -gustducine ; GNAT3 ; transduction du goût sucré ; obésité ; diabète de type 2*

## Abstract

Carbohydrates and sweeteners are detected by sweet taste receptor at the apical membrane of enteroendocrine cells (EEC). This receptor form T1R2-T1R3 heterodimer coupled to the G protein gustducin, of which the  $\alpha$  subunit is encoded by *GNAT3*. Activation of sweet taste receptor induces a signaling cascade leading to the secretion of GLP-1 incretin by EEC. Metabolic diseases such as obesity and type 2 diabetes are associated with alterations in carbohydrate and energy homeostasis. They cause, in particular, decreased plasma concentration of enterohormones such as GLP-1, the secretion of which is restored after remission of metabolic disorders. The aim of my thesis was to study the role of sweet taste transduction pathway, and especially  $\alpha$ -gustducin, in metabolic diseases and their remission. Our results show that obesity leads to an alteration of the sweet taste transduction pathway in EEC and in particular to a down-regulation of *GNAT3* participating in the defect in GLP-1 secretion. In the context of metabolic improvement after intestinal remodeling, the restoration of GLP-1 secretion is in part due to an up-regulation of *GNAT3* in the proximal segments after surgery. Moreover, the sweet taste transduction pathway is expressed in the gut specifically in EEC. However, the dysbiotic gut microbiota does not have a significant impact on the expression of *GNAT3* during the onset of metabolic diseases. To conclude, this study highlights the role of the sweet taste transduction pathway in the defect of GLP-1 secretion in metabolic diseases. The identification of molecules able to induce the intestinal sweet taste transduction pathway would stimulate the endogenous secretion of GLP-1 in obese patients with or without diabetes.

Keywords: intestine;  $\alpha$ -gustducin; *GNAT3*; sweet taste transduction; obesity; Type 2 diabetes