



Université
de Toulouse

THÈSE

En vue de l'obtention du
DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

Université Toulouse 3 Paul Sabatier (UT3 Paul Sabatier)

Discipline ou spécialité :

physiologie animale

Présentée et soutenue par :

Melle MASSEBOEUF Myriam

le : 13 octobre 2010

Titre :

rôle du glucagon like peptide 1 et de la dipeptidyl peptidase 4 dans le contrôle de la glycémie: influence des lipides nutritionnels

JURY

Mr Burcelin Rémy,
Mr Gourdy Pierre,
Mr Mithieux Gilles
Mr Séré Eric

Ecole doctorale :

Biologie, Santé, Biotechnologies (BSB)

Unité de recherche :

U858, équipe 2

Directeur(s) de Thèse :

Mr Burcelin Rémy

Rapporteurs :

Mr Gautier, Mr Mithieux, Mr Séré

Les années de thèse et la rédaction de ce manuscrit sont l'aboutissement d'une grande réflexion sur un sujet scientifique, le monde de la Science pour lesquels mes conclusions ont été inattendues mais enrichissantes.

Je remercie Rémy Burcelin, qui m'a accueillie au sein de son équipe. Il a su alimenter mon gout prononcé pour la physiologie. Et, par ce qu'il est et ce qu'il n'est pas en tant que directeur de laboratoire, directeur de thèse et, scientifique, il m'aura beaucoup appris de la Science, du monde politico-scientifique, de la gestion de groupe. Je garderai beaucoup de considération pour sa force de caractère, de travail.

Je remercie également les membres de son groupe que sont Vincent Blanco, Cendrine Cabou, Gérard Campistron Chantal Chabo, Mai-Anh Dao, Lucile Guéridou, Gaetan Jouglu, Pascale Klopp, Elodie Luche, Gaele Payros, Elodie Riant, Mattéo Serino, Christelle Vachoux, Aurélie Waget, avec qui j'ai pu apprécier l'entre-aide lors des manip et les moments de divertissements.

Je me souviendrai des discussions, des rires, des conseils voyages que j'ai partagés aux aurores avec Jean José Maoret. Dans cet institut, j'y ai aussi découvert un ami, André Colom, qui plus qu'un bout d'entrain et une valeur sure en amitié.

Mon équilibre passe bien sur par ma famille. Je n'oublie donc pas le soutien de ma mère, ma sœur et mon homme qui m'apportent beaucoup et avec lesquels je partage une harmonie de cœur et d'esprit qui s'affine au quotidien. J'ai une pensée pour mon père décédé en début de thèse et la naissance prochaine de mon petit être qui bouclera cette thèse.

Je remercie mes amis et les gens que j'ai pu rencontrer durant les voyages en solitaire avec lesquels le temps d'un instant ou sur de nombreuses années j'ai pu me réjouir de « petit rien » ou de « grand tout », qui font vivre la créativité.

Je terminerai en remerciant profondément le Dr Alain Czekajweski. Plus qu'un médecin, c'est un grand homme qui, me régénère par son écoute et les réponses qu'il puisse dans sa science de l'Homme et de son corps.

*Trouver l'intelligence
qui se cache dans chaque situation difficile
pour faire évoluer sa vie avec cœur et raison,*

Sommaire

INTRODUCTION	13-114
A/ Physiologie de l'homéostasie glucidique	17
I- Mécanismes généraux de détection et de régulation de la glycémie	17
1. Présentation	17
2. La détection des nutriments et ses conséquences	17
II- Mécanismes de détection et de régulation de la glycémie lors de la prise alimentaire	19
1. Le gluco-stat lors de la prise alimentaire	19
2. Le rôle des organes effecteurs dans le maintien de l'équilibre glycémique sous le contrôle de l'insuline	22
a. La sécrétion d'insuline	22
b. La clairance du glucose en réponse à l'insuline	23
i. Les principales voies de signalisation activées par le récepteur à l'insuline	23
ii. L'effet de l'insuline sur les cellules musculaires	26
iii. L'effet de l'insuline sur les adipocytes	27
iv. L'effet de l'insuline sur les hépatocytes	28
3. Effets du glucagon lors de la prise alimentaire	32
a. Mécanismes de sécrétions du glucagon	32
b. Régulation de la sécrétion de glucagon	34
c. Les effets du glucagon	36
III- Maintenir la glycémie nécessite un maintien du taux d'acides gras circulants.	38
1. L'absorption intestinale des lipides et le cycle hépatique	38
a. Transport des acides gras à travers la bordure en brosse de l'intestin	38
b. Métabolisme des acides gras dans l'entérocyte	39
c. Passage des acides gras dans la circulation sanguine	40
2. Métabolisme des acides gras dans les tissus périphériques	42
a. Dans le muscle et le foie	42
b. Dans les adipocytes	43
c. Dans les neurones hypothalamiques	44

i.	Passage de la barrière hémato-encéphalique par les acides gras circulants	44
ii.	Mise en évidence des effets des acides gras sur les neurones de l'hypothalamus	45
3.	Effets des acides gras sur la régulation de la glycémie en fonction de la voie d'administration	45
a.	Effets des acides gras circulants dans le sang sur le pancréas	45
b.	Effets des acides gras dans le cerveau	46
i.	Effet sur la prise alimentaire et production hépatique de glucose	46
ii.	Les acteurs moléculaires du sensing hypothalamique des acides gras	46
c.	Effet des acides gras administrés par voie intragastrique	48
i.	Effet sur la production hépatique de glucose et la sécrétion d'insuline	48
ii.	Mécanismes moléculaires induits par les lipides présents dans l'intestin	49
4.	Régulation du métabolisme des acides gras par les hormones pancréatiques	49
a.	Régulation des acides gras par l'insuline	49
i.	Dans le tissu adipeux	49
ii.	Dans le foie	50
b.	Régulation des acides gras par le glucagon	51
IV-	L'intestin	51
c.	Anatomie et histologie	52
a.	Anatomie	52
b.	Histologie	52
d.	Le système nerveux entérique	55
a.	Présentation	55
b.	Les différents types de neurones du SNE	56
c.	Les cellules gliales du SNE	56
e.	Les fibres du nerf vague afférentes au cerveau	56
f.	L'intérêt de l'intestin dans l'arc « reflexe métabolique anticipateur »	59
a.	Détection entérique de glucose, primordiale pour anticiper la régulation de la glycémie	59
b.	Capacité d'anticipation de l'intestin pour la régulation de la glycémie	60

V- L'axe « intestin-cerveau »	62
1. La communication entre le nerf vague et els centres intégrateurs du cerveau	62
2. Le système porte, la communication entre les cellules sensibles au glucose de la veine porte avec les centres intégrateurs du cerveau via le nerf vague	64
a. Localisation des cellules sensibles au glucose de la veine porte	64
b. Caractéristiques des cellules du système porte	64
c. Fonctions physiologiques du système porte	64
3. Les mécanismes de détections des nutriments par l'intestin	66
a. Transport et détection du glucose	67
b. Détection des nutriments par les récepteurs au goût	69
c. Détection des acides gras	69
4. Les hormones intestinales	71
a. L'origine de leur découverte	71
b. Les différentes hormones	72
VI- Le glucagon Like Peptide 1, le GLP-1	74
1. Introduction du concept incrétine	74
2. Identification des cellules sécrétrices de GLP-1	76
3. Synthèse et sécrétion	77
a. Synthèse	77
b. Sécrétion cérébrale de GLP-1	77
c. Sécrétion intestinale de GLP-1	78
i. Sécrétion anticipée de GLP-1 par les cellules iléales en réponse à une détection des nutriments dans la partie proximale de l'intestin	78
ii. Mécanismes cellulaires d'activation et de contrôle de la sécrétion de GLP-1	79
4. Le GLP-1 circulant	81
5. Dégradation du GLP-1 actif par la DPP-IV et ses métabolites générés	82
6. Le récepteur au GLP-1	83
7. Les effets biologiques du GLP-1	84
a. Effets directs du GLP-1 sur différents tissus	85
b. Effets directs du GLP-1 sur les îlots du pancréas	85

i.	Effet sur la sécrétion d'insuline	85
ii.	Effet sur la sécrétion de glucagon	86
iii.	Effet protecteur du GLP-1 sur les cellules pancréatiques	87
c.	Effet du GLP-1 cérébral sur les neurones de l'hypothalamus	88
8.	Une demi-vie courte du GLP-1 et des effets pléthoriques ?	89
a.	Effet indirect du GLP-1 sur la sphère gastro-intestinale	89
b.	Effet indirect du GLP-1 sur le pancréas	90
9.	Comment le GLP-1 endogène peut-il être étudié ?	90
VII-	Le GLP-1 endogène étudié grâce aux inhibiteurs de DPP-IV	91
1.	Les substrats de la DPP-IV	91
2.	Les différents inhibiteurs pharmacologiques de la DPP-IV	92
3.	Les effets du GLP-1 actif endogène mis en évidence par les inhibiteurs de la DPP-IV	93
B/	Physiopathologie, le diabète de type II	95
I-	Définition et caractéristiques du diabète	96
1.	Définition	96
2.	Diagnostiques et complication	96
3.	Origines de la pathologie	97
a.	Génétique	97
b.	Environnementale	97
i.	La flore bactérienne	97
ii.	La surcharge énergétique : régime alimentaire et sédentarité	100
II-	L'insulinorésistance et le défaut de sécrétion de l'insuline	101
1.	Caractéristiques	101
2.	Théorie de l'évolution de l'insulinorésistance	101
a.	L'insulinorésistance, perte d'action de l'insuline sur les tissus cibles	102
b.	Compensation de la cellule B du pancréas : augmentation de la sécrétion de l'insuline	104
i.	Stimulus nerveux	104
ii.	Stimulus endocrinien	104
		10

ii.	Stimulus métabolique : glucose, acides gras	104
c.	Glucolipototoxicité et apoptose de la cellule B	105
III-	Les lipides	107
1.	Les lipides qui rendent diabétiques	107
2.	Effet physiopathologique des lipides et des dérivés lipidiques	108
a.	Effet sur la voie de signalisation de l'insuline	108
b.	Effet sur le muscle et le foie	109
3.	Domage oxydatif par les lipides	109
IV-	Le diabète de type II et les inhibiteurs de DPP-IV	111
1.	Pourquoi choisir les inhibiteurs de DPP-IV en thérapeutique ?	111
2.	Effets thérapeutiques des inhibiteurs de DPP-IV	111
a.	Effets pharmacologiques	111
b.	Effets métaboliques	112
c.	Traitement recommandé	112
	OBJECTIF	115-120
	RESULTATS	121-172
	PREMIERE PARTIE	123-146
A/	Etude du contrôle de la glycémie par une concentration faible de sitagliptine (4µg) qui induit une concentration faible de GLP-1 (7-37) dans la sphère entéro-portale.	123
1.	Détermination de la dose orale minimale active de la sitagliptine qui régule la glycémie.	123
2.	Est-ce que seule l'inhibition de la DPP-IV entérique par la sitagliptine à 4µg induit une régulation de la glycémie? Comparaison avec une administration intraveineuse de cet agent.	126
3.	Implication du GLP-1 entérique (7-37) dans la régulation de la glycémie.	128
4.	Le GLP-1 cérébral est-il recruté lorsque la DPP-IV est inhibé seulement dans la sphère entérique ?	129

5. L'His-Ala : La face cachée du contrôle de la dégradation du GLP-1 par la DPP-IV.	130
6. Vérification de l'effet de l'His Ala sur des îlots de pancréas murins et humains	132
B/ Etude du contrôle de la glycémie par une concentration élevée de la sitagliptine (40mg) qui induit une concentration élevée de GLP-1 (7-37) dans la sphère entéro-portale.	134
1. Effet de la sitagliptine sur la régulation de la glycémie et de l'insulinémie.	134
a. Effet d'une administration orale d'une forte dose de sitagliptine sur la glycémie	134
b. Effet de la sitagliptine (40mg) sur l'insulinémie dans des conditions d'hyperglycémie	137
2. La régulation de la glycémie par la sitagliptine 40mg est-elle due au GLP-1 ?	138
3. L'effet de la sitagliptine sur la glycémie est-il uniquement dû au signal « GLP-1 entéro-portal » induit par la détection intestinale de glucose ?	140
4. L'effet non hyperglycémiant induit par la sitagliptine recrute-t-il le GLP-1 cérébral ?	142
5. La sitagliptine (40mg) modifie-t-elle la transmission nerveuse du signal glucose véhiculé par l'axe « intestin-cerveau » et le système porte ?	144
 DEUXIEME PARTIE	 147-172
A/ Quelle est la réponse métabolique induite par le sensing intestinal au glucose lorsque seul l'intestin ou le cerveau a détecté une forte dose de lipides, perfusés en continu sur 24h ?	147
1. Vérification du protocole	147
2. Quelles est la réponse métabolique induite par le sensing entérique au glucose lorsque seul l'intestin a détecté une forte charge en lipides ?	149
3. Quelle est la réponse métabolique induite par le sensing entérique de glucose lorsque seul le cerveau perçoit une forte dose de lipides?	151
B/ Quels sont les mécanismes moléculaires responsables de la perturbation de la	153

détection au glucose par l'intestin ?

1. Description de l'intestin après 24h de perfusion intragastrique de lipides.	153
2. Les lipides perturberaient-ils le système inflammatoire ?	155
3. Les lipides induisent-ils un stress oxydant dans l'intestin?	158
4. Après 6h de perfusion intragastrique, le stress oxydant induit par les lipides est-il déjà présent et altère-t-il la régulation de la glycémie ?	160
5. La prévention de la peroxydation lipidique par l'aminoguanidine restaure-t-elle un contrôle de la glycémie et de l'insulinémie ?	162
a. Vérification préliminaire de l'effet de l'aminoguanidine sur la peroxydation lipidique et la concentration en lipides circulants.	162
b. Le traitement à l'aminoguanidine prévient-il l'état diabétique?	163
6. L'aminoguanidine a-t-elle un effet propre ?	165
7. Les lipides induisent-ils une peroxydation lipidique dans le cerveau après 24h de perfusion intracarotidienne ?	166
C/ La peroxydation lipidique induite par les lipides affecte-t-elle la transmission entérique du signal glucose qui est transmis au cerveau par le nerf vague ?	168
ARTICLE	175- 232
Article 1	175-200
Article 2	201-232
DISCUSSION	235-246
BIBLIOGRAPHIE	247-267
Summary	269

Introduction

A/ Physiologie de l'homéostasie glucidique

I- Mécanismes généraux de détection et de régulation de la glycémie

1. Présentation

L'homéostasie glucidique correspond à l'ensemble des mécanismes physiologiques, cellulaires, et moléculaires qui ajustent étroitement la glycémie entre 0,8 et 1,2 g/L (1; 2). L'organisme doit alors gérer en permanence ces faibles variations de la concentration du glucose sanguin. En effet, celles-ci sont la résultante des changements de flux d'énergie au cours desquels les mécanismes responsables de l'utilisation du glucose par les tissus sont en équilibre avec ceux qui concourent à sa production. Cet équilibre doit être dynamique afin de permettre une régulation précise de l'homéostasie énergétique.

Ainsi, au cours d'un repas l'organisme doit être capable dans un premier temps de détecter l'entrée des nutriments, puis d'intégrer l'ensemble des signaux nutritionnels générés lors de l'absorption du glucose afin de mettre en place les fonctions cellulaires qui permettront l'utilisation de cette énergie. (Figure 1).

En période post absorptive, tel qu'au cours du jeûne, l'entrée du glucose dans l'organisme est nulle. Ce sont donc les organes producteurs, comme le foie, l'intestin, et les reins, qui assurent le flux de glucose vers les tissus utilisateurs tels que les muscles et le cerveau. Il est important de préciser que les variations de flux de glucose sont concomitantes à celles des lipides qui sont à l'origine de pathologies métaboliques telles que le diabète de type II.

2. La détection des nutriments et ses conséquences

La détection des nutriments, et plus précisément celle du glucose, implique que des cellules spécialisées soient capables de détecter les variations, même faibles ($\sim 0,5\text{mM}$), de la glycémie résultant de l'entrée ou de la sortie du glucose de l'organisme et du sang (3). Cette fonction dépend de mécanismes moléculaires spécifiques présents dans des cellules appelées « glucostat » soit encore « glucose-sensor », ou « senseur du glucose ». Elles émettent alors

un message endocrinien, nerveux, ou métabolique qui s'achemine vers des centres intégrateurs du cerveau. Ces cellules sont notamment localisées dans le tractus digestif, dans la veine porte, le pancréas, les corps carotidiens et, le cerveau (4).

D'autres organes mettent en place des mécanismes cellulaires en réponse à la variation de la glycémie tels que le foie et les reins. Cependant, ces derniers ne sont pas considérés comme glucostat pour l'organisme car aucun signal généré et transmis aux centres intégrateurs du cerveau n'a été mis en évidence en réponse à des variations de la glycémie.

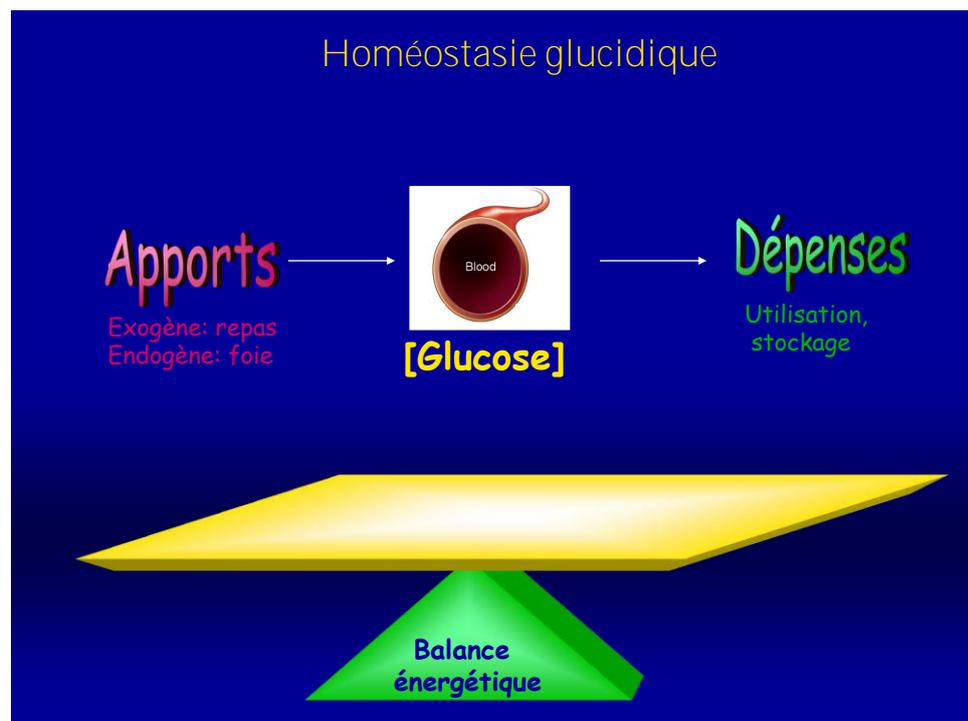


Figure 1 : Représentation de la balance énergétique équilibrée par les apports et les dépenses en énergie, qui régule l'homéostasie glucidique.

II- Mécanismes de détection et de régulation de la glycémie lors de la prise alimentaire

1. Le gluco-stat lors de la prise alimentaire

Lors d'un repas, le glucose est absorbé par les entérocytes et des cellules spécialisées du tractus digestif détectent alors l'entrée du glucose dans l'organisme (5). Dans la région entéro-portale, leur localisation et leur identification précises ne sont pas établies mais pourraient correspondre aux cellules endocrines de l'épithélium intestinal, ainsi qu'à des cellules d'origine nerveuses présentes dans la membrane basale musculaire de l'intestin et dans la veine hépato-portale (Figure 2). Des signaux métaboliques, endocriniens, et nerveux sont alors générés (2).

Les messages nerveux sont acheminés vers le cerveau par le nerf vague, où ils sont alors intégrés. C'est l'axe « **intestin-cerveau** » (2). Dans le tronc cérébral, des zones spécialisées du cerveau recueillent ces informations nerveuses qui sont retransmises vers des groupes de cellules spécialisées localisées dans les noyaux de l'hypothalamus. Situé au niveau du troisième ventricule, ce dernier intègre alors l'information nerveuse. Néanmoins, il possède une compétence supplémentaire qui est de pouvoir détecter les messages issus de la circulation sanguine grâce à sa localisation proche de la barrière fenêtrée hémato-encéphalique, qui est en contact avec la circulation périphérique.

Les signaux endocriniens et métaboliques, provenant de la sphère entérique, sont véhiculés en première instance par le sang portal pour les substrats hydrosolubles et, par la lymphe pour les métabolites liposolubles (lipoprotéines). Ils s'acheminent ensuite jusqu'au cerveau et les tissus périphériques (Figure 2). L'hypothalamus perçoit alors les métabolites tels que glucose, lactate, acides aminés, lipides, et les hormones comme la leptine, la ghreline, la cholécystokinine (CCK), provenant de la circulation générale. L'hypothalamus est donc capable de détecter directement les variations des nutriments et notamment de la glycémie.

L'hypothalamus génère alors de nouveaux signaux résultants donc de la triple intégration nerveuse, endocrinienne, et métabolique. Ces signaux sont dirigés vers les tissus périphériques via un relai dans le tronc cérébral et dans la moelle épinière. Dans le tronc cérébral prennent leur origine les fibres nerveuses des nerfs crâniens qui gouvernent le

système nerveux parasympathique et, dans la moelle épinière la chaîne ganglionnaire latérale initie le message nerveux orthosympathique.

Inversement, au cours du jeûne ou de l'exercice physique la concentration de glucose diminue dans le sang. L'hypothalamus, ainsi que les glucostats de la veine porte perçoivent cette baisse de la glycémie (6). Ces détecteurs de glucose envoient donc des signaux vers le cerveau. Ces derniers sont différents de ceux générés lors de la prise alimentaire et donnent l'ordre au foie de produire du glucose afin de rétablir la glycémie.

→ Ainsi, en réponse à des variations de la glycémie, l'organisme déclenche des **mécanismes** qui sont initiés par les glucostats et, qui préparent les cellules effectrices à la mise en place de leur fonction. Elles anticipent donc la régulation du métabolisme glucidique, définissant alors le processus appelé « **arc réflexe métabolique anticipateur** ».

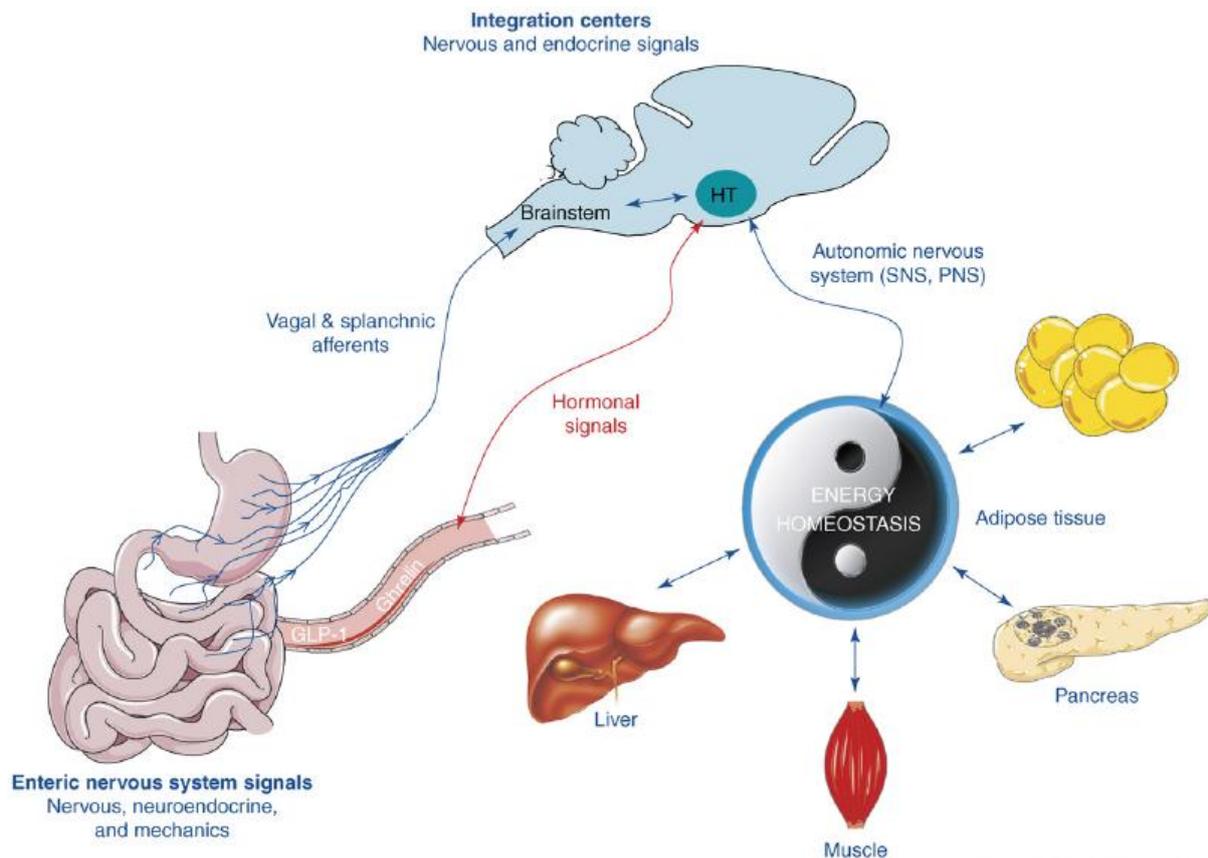


Figure 2 : L'arc réflexe métabolique. Lors d'un repas, la détection des nutriments par l'intestin, notamment des glucostats de la sphère entéro-portale, induit un message endocrinien et nerveux (nerf vague) aux centres intégrateurs du cerveau tels que le tronc cérébral (brainstem) et l'hypothalamus (HT). L'HT intègre les informations nerveuses et endocriniennes pour émettre un message nerveux efférent via le système nerveux autonome (SNS,PNS) aux organes effecteurs tels que le tissu adipeux, le pancréas, les muscles et le foie (2).

La régulation de la glycémie a souvent été étudiée en fonction de la capacité des organes effecteurs à métaboliser le glucose. En effet, le pancréas, les muscles, le tissu adipeux et, le foie mettent en place une réponse biochimique adaptée à la régulation des variations de glucose sanguin qui sont notamment sous le contrôle de l'insuline et du glucagon. Il est donc nécessaire de connaître les voies métaboliques induites par ces deux hormones.

2. Le rôle des organes effecteurs dans le maintien de l'équilibre glycémique sous le contrôle de l'insuline

a. La sécrétion d'insuline.

Lorsque la glycémie augmente, le glucose est détecté par les cellules B (béta) du pancréas. Le glucose est pris en charge par le transporteur de glucose de la membrane plasmique, GLUT2, dont le Km avoisine les 10-20 mM (7) (Figure 3). Cette caractéristique permet d'équilibrer très rapidement le glucose de part et d'autre de la membrane plasmique. Puis, la glucokinase (GK) phosphoryle immédiatement le glucose en glucose 6 phosphate (G6P), représentant l'étape limitante du métabolisme du glucose par la cellule B (8). Le glucose est ensuite métabolisé en pyruvate dans la voie de la glycolyse ce qui génère de l'ATP, diminuant alors le rapport ADP/ ATP. Ceci a pour effet de fermer les canaux K^+ sensibles à l'ATP (9). Ces canaux sont composés de sous unités Kir6.2 (K inward rectifying channel) et Sur (Sulfonylurea) qui sont aussi présents à la membrane plasmique des cellules « glucostats » de l'intestin et des neurones de l'hypothalamus (4). La fermeture des canaux K^+ sensibles à l'ATP provoque une dépolarisation de la membrane cellulaire qui active l'ouverture de canaux Ca^{2+} sensibles au voltage permettant alors un flux entrant de Ca^{2+} , nécessaire à l'exocytose des granules d'insuline dans le sang.

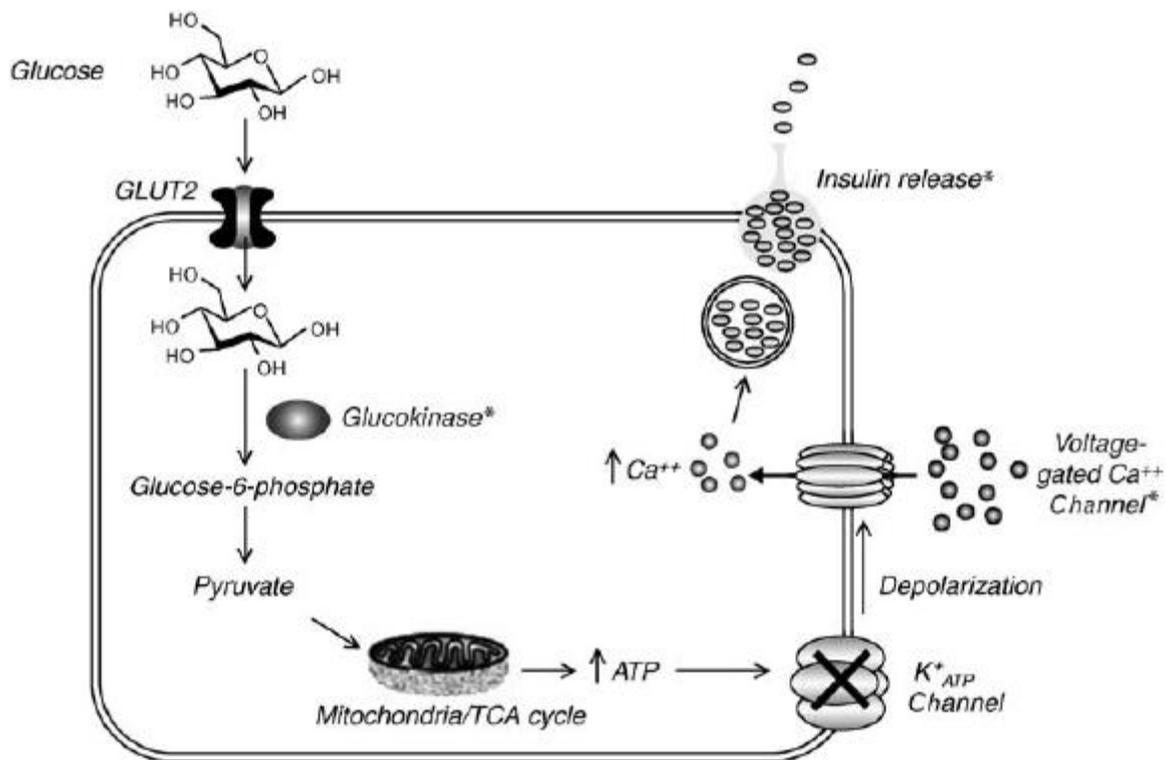


Figure 3 : Schéma de la sécrétion d'insuline dans les cellules B du pancréas induite par la métabolisation du glucose et la production ATP. L'augmentation cytoplasmique d'ATP lors de l'oxydation du glucose induit la fermeture des canaux K^+ sensibles à l'ATP et permet une dépolarisation de la membrane plasmique. Ce changement de potentiel membranaire favorise l'ouverture de canaux calciques sensibles au changement de potentiel, ainsi que l'entrée massive de Ca^{2+} dans la cellule. Ce flux calcique est indispensable à l'exocytose des vésicules qui contiennent de l'insuline (10).

L'insuline sécrétée est alors déversée dans la circulation sanguine générale et peut agir sur ces tissus cibles, qui sont notamment les organes effecteurs énumérés ci avant (A/II.1). L'insuline est une hormone hypoglycémiante. Ainsi, par l'activation de différentes voies de signalisation et de différentes voies métaboliques, elle favorise la clairance du glucose par son utilisation et/ou son stockage.

b. La clairance du glucose en réponse à l'insuline

i. Les principales voies de signalisation activées par le récepteur à l'insuline

L'insuline circulante se fixe sur son récepteur présent à la surface de la plupart des cellules de l'organisme. Ce récepteur transmembranaire est un hétérodimère Alpha-Beta qui appartient à la famille des tyrosines-kinases (11; 12) (Figure 4).

L'activation du récepteur à l'insuline déclenche la phosphorylation de protéines à domaine SH2, ce sont des docking protéines. Les plus connues sont les protéines IRS (insulin receptor substrate) mais il existe aussi les Gab-1, P60, Cbl, les isoformes Shc (13). A la surface des cellules musculaires, hépatiques et des adipocytes, deux principales voies métaboliques impliquent la phosphorylation des IRS (Figure 5) (13-15).

La première voie implique la phosphorylation de la PI3Kinase (phosphatidyl inositol triphosphate kinase). Par son activité sérine kinase, elle peut agir sur différents substrats, notamment la phosphoinositide dependant kinase-1 (PDK1). La PDK1 possède une activité sérine kinase qui phosphoryle alors la sérine/thréonine kinase Akt/PKB (13). Celle-ci a un domaine PH (pleckstrin homology) qui interagit avec des phosphoinositols tels que PI(3,4,5)P₃; mais elle est aussi connue pour agir sur des enzymes clés du métabolisme du glucose telles que la glycogène synthase (GSK).

La seconde voie d'activation du récepteur à l'insuline couplée à la phosphorylation des IRS induit l'expression de gènes codant pour la prolifération cellulaire. Ainsi, l'IRS phosphorylé interagit avec une protéine d'adaptation Grb2 qui recrute la protéine SOS (Son Of Sevenless). Cette association active alors de la protéine Ras dont la fonctionnalité dépend aussi de son interaction avec la protéine SHP-2. Cette dernière a été préalablement activée par l'IRS (13-15). La protéine Ras active alors une cascade de sérines kinases telles les protéines de la voie des MAPKinase (MAPK, ERK). La protéine ERK est transloquée dans le noyau et active alors la transcription de gènes codant pour la prolifération et la différenciation cellulaire.

Une autre voie de signalisation induite par l'activation du récepteur à l'insuline est celle qui favorise le métabolisme du glucose en augmentant la capture cellulaire de glucose. La phosphorylation du récepteur à l'insuline permet la phosphorylation du protooncogène Cbl. Ce dernier se lie au récepteur à l'insuline via une protéine adaptatrice CAP qui possède un domaine SH3, riche en proline. L'association CAP-Cbl phosphorylé se transloque vers la membrane, puis se lie à un domaine lipidique de la membrane via une protéine adaptatrice, CRK II. CRKII forme un complexe avec C3G et TCT10. TCT10 favorise alors la

translocation à la membrane de vésicules contenant le transporteur du glucose, GLUT4 (Figure 6) (16).

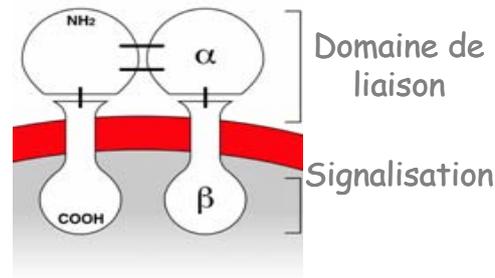


Figure 4 : Représentation des domaines de liaison et de signalisation du récepteur à l'insuline.

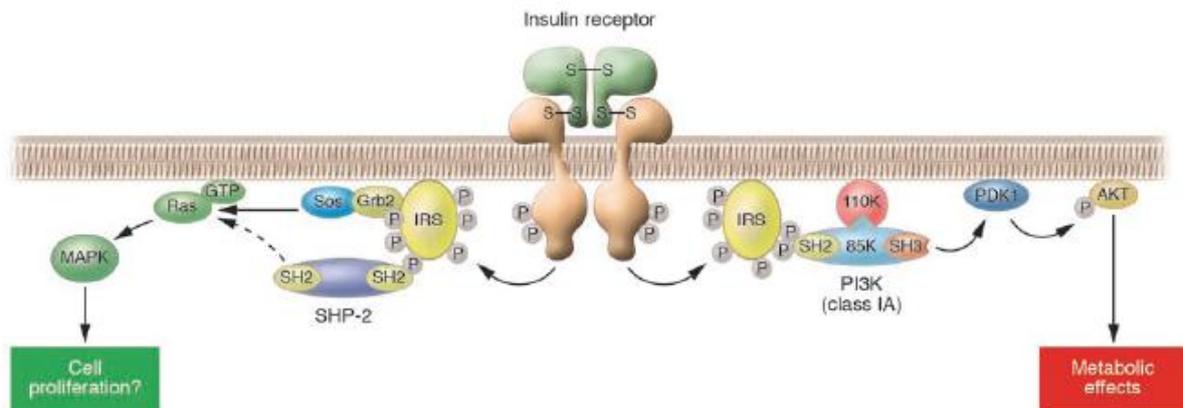


Figure 5 : Le récepteur à l'insuline s'autophosphoryle sur les tyrosines de la chaîne B lors de la fixation de l'insuline sur les chaînes A. Ce mécanisme permet l'activation d'une activité tyrosine kinase de la chaîne B. Cette activité tyrosine kinase induit également la phosphorylation de substrats tels que les Insulin Receptor Substrates (IRS). Il s'en suit deux voies principales d'activation. L'une des voies le recrutement de la protéine Sos via la protéine d'adaptation Grb2. SOS active alors Ras qui est aussi dépendante de l'activation de SHP2. SHP2 a été phosphorylé par l'IRS. L'activation de Ras permet l'activation de la voie des MAPKinase dont les effets nucléaires favorisent la prolifération cellulaire. L'autre voie induite par la phosphorylation de l'IRS active la phosphorylation de la PI3Kinase (composées

de 2 sous unités 85K et 110K). Par réaction en cascade, elle active la PDK1 puis la phosphorylation de la protéine Akt. Cette dernière engendre alors des effets métaboliques notamment par la phosphorylation d'enzyme du métabolisme glucidique. (15).

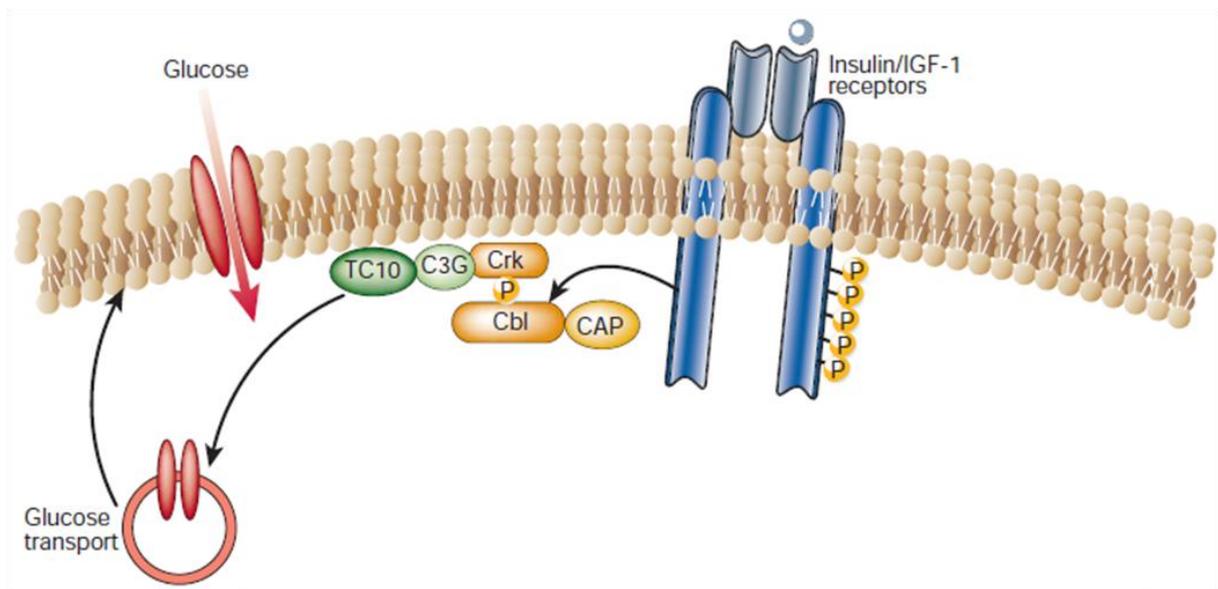


Figure 6 : voie de signalisation de l'insuline impliquant les protéines Cap Cbl. Cbl se lie au récepteur par la protéine d'adaptation CAP. Par cette fixation le récepteur à l'insuline phosphoryle Cbl. Le couple CAP-Cbl se transloque à la membrane et s'y fixe via la protéine Crk. Cette dernière est couplée à C3G et TCT10. TCT10 active alors la translocation à la membrane de vésicules contenant le transporteur au glucose GLUT4 (13).

ii. *L'effet de l'insuline sur le métabolisme glucidique des cellules musculaires*

Au cours d'un repas, 75% du glucose circulant est pris en charge par les muscles pour y être métabolisé. Ainsi, l'insuline en se fixant sur son récepteur déclenche son autophosphorylation et l'activation de la voie des IRS. Il existe de nombreux isoformes IRS (14; 17). Dans les muscles la forme majoritaire est l'IRS1 qui, une fois phosphorylée par l'activité tyrosine kinase du récepteur se fixe sur la sous unité régulatrice de la PI3 kinase, P85. Ceci a pour effet de libérer la sous unité catalytique de la PI3Kinase, P110, pour aboutir à la phosphorylation d'inositides tels que PIP2 en PIP3 (13). Par la suite, ces phospholipides

permettent d'activer des sérines thréonines kinases telles que Akt/PKB. Celles-ci activent alors les enzymes clés de la glycolyse, de la synthèse de glycogène, et de l'oxydation mitochondriale. Ainsi, par la glycolyse, le glucose est oxydé en pyruvate. Le pyruvate est métabolisé en ATP par le cycle de Krebs et, les intermédiaires énergétiques de la glycolyse, le NADH₂ et FADH₂, sont oxydés lors de leur utilisation dans la chaîne respiratoire.

A l'image de la voie des MAPKinsases, l'activation de la PI3K par l'insuline permet aussi d'activer l'expression de certains gènes du métabolisme glucidique tels que l'hexokinase II (18), la pyruvate kinase (19), ou encore le transporteur de glucose GLUT4 (20).

iii. L'effet de l'insuline sur le métabolisme glucidique des adipocytes

Lorsque les apports en énergie sont supérieurs aux dépenses énergétiques, le glucose qui pénètre dans les adipocytes est métabolisé en acides gras puis stocké sous forme de triglycérides, par la voie de la lipogenèse *de novo* (21) (Figure 7). Ce processus existe aussi dans le foie.

Le pyruvate provenant de la glycolyse est métabolisé en acétyl coA par la pyruvate déshydrogénase (PDH) dans la mitochondrie. La membrane mitochondriale n'étant pas perméable au passage de l'acétyl coA vers le cytoplasme, ce dernier est alors converti en citrate. Par réaction inverse, le citrate est métabolisé en acétyl coA pour être redirigé vers le cytoplasme. L'acétyl coA est alors métabolisé en malonyl coA par l'acétyl coA carboxylase (ACC). Le malonyl coA et l'acétyl coA sont les substrats d'un complexe enzymatique, la fatty acid synthase (FAS), qui génère des acyls coA à longue chaîne (AGCL). Ces derniers sont ensuite estérifiés avec du glycérol pour synthétiser des triglycérides.

L'insuline régule la lipogenèse *de novo* (22) en activant des facteurs de transcription qui contrôlent l'expression de gènes lipogéniques, dont le plus connu est SREBP-1 (sterol response element-binding protein 1). Ce dernier active par exemple l'expression génique de la FAS (21).

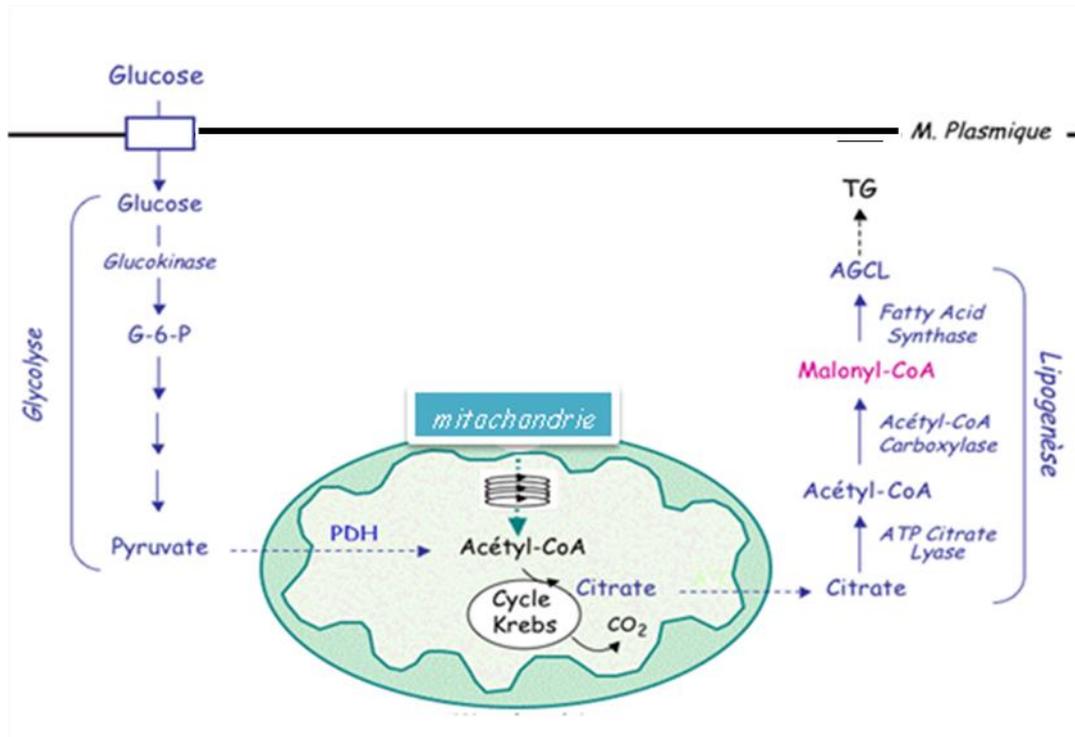


Figure 7: Schéma de la lipogenèse *de novo* dans l'adipocyte. La première étape est la glycolyse qui métabolise le glucose en pyruvate (à gauche). Le pyruvate est métabolisé en citrate dans la mitochondrie. Le citrate passe dans le cytoplasme pour être métabolisé en acétyl coA puis en malonyl coA respectivement par l'ATP citrate lyase et l'acétyl coA carboxylase. Le malonyl coA est alors un substrat (avec un acétyl coA non représenté ici) de la fatty acid synthase (FAS) afin de synthétiser des acides gras à longues chaînes (AGCL). C'est la lipogenèse (droite). Les AGCL sont ensuite estérifiés avec du glycérol pour former des triglycérides (TG).

iii. L'effet de l'insuline sur le métabolisme glucidique des hépatocytes

Le foie est le principal organe capable à la fois de produire et de stocker du glucose.

Au cours d'un jeûne et de l'exercice physique, la production hépatique de glucose provient du catabolisme du glycogène (la glycogénolyse) et de la synthèse de glucose à partir de métabolites tels que les acides aminés (la néoglucogenèse).

Au cours d'un repas, le glucose est stocké sous forme de glycogène (glycogénogenèse) pour être libéré sous forme de glucose lors du jeûne ou de l'exercice physique. Le glucose peut aussi être stocké sous forme de triglycérides (lipogenèse *de novo*).

La clairance du glucose par l'insuline sur les hépatocytes résulte de ses effets inhibiteurs sur la production de glucose (la glycogénolyse et la gluconéogenèse) et de ses effets activateurs sur l'utilisation et le stockage de glucose (la glycolyse et de la glycogénogénèse, lipogénèse *de novo*).

Ainsi, l'insuline empêche la production de glucose notamment en inhibant des facteurs de transcription, tels que HNF/FoxA, qui activent la transcription de gènes codant pour certaines enzymes de la gluconéogenèse. Ainsi, la phosphoénol pyruvate carboxykinase (PEPCK), la fructose 1,6 phosphatase (F1,6Ptase) et la glucose 6 phosphatase (G6Ptase) ne peuvent pas transformer le pyruvate en glucose 6 phosphate (13; 23).

D'un autre côté, l'insuline favorise l'utilisation de glucose en activant des facteurs de transcription, comme SREBP, qui permettent l'expression de gènes impliqués dans la glycolyse, telles que la phosphofructokinase (PFK) et la pyruvate kinase (PK) (Figure 8). Elle favorise aussi le stockage de glucose en activant la PI3K qui induit alors la déphosphorylation de la glycogène synthase (13). Dans l'hépatocyte, l'insuline régule aussi largement la lipogénèse *de novo*, en activant des facteurs de transcription, tels que SREBP-1, chREBP, et des cofacteur comme PGC1, qui sont impliqués dans l'expression des gènes codant pour l'ACC et la FAS (Figure 9) (13; 23) . Néanmoins, l'insuline autocontrôlerait cette voie métabolique en phosphorylant l'IRS2 qui inhiberait le facteur de transcription FOX1 impliqué dans l'expression de gènes de la lipogénèse.

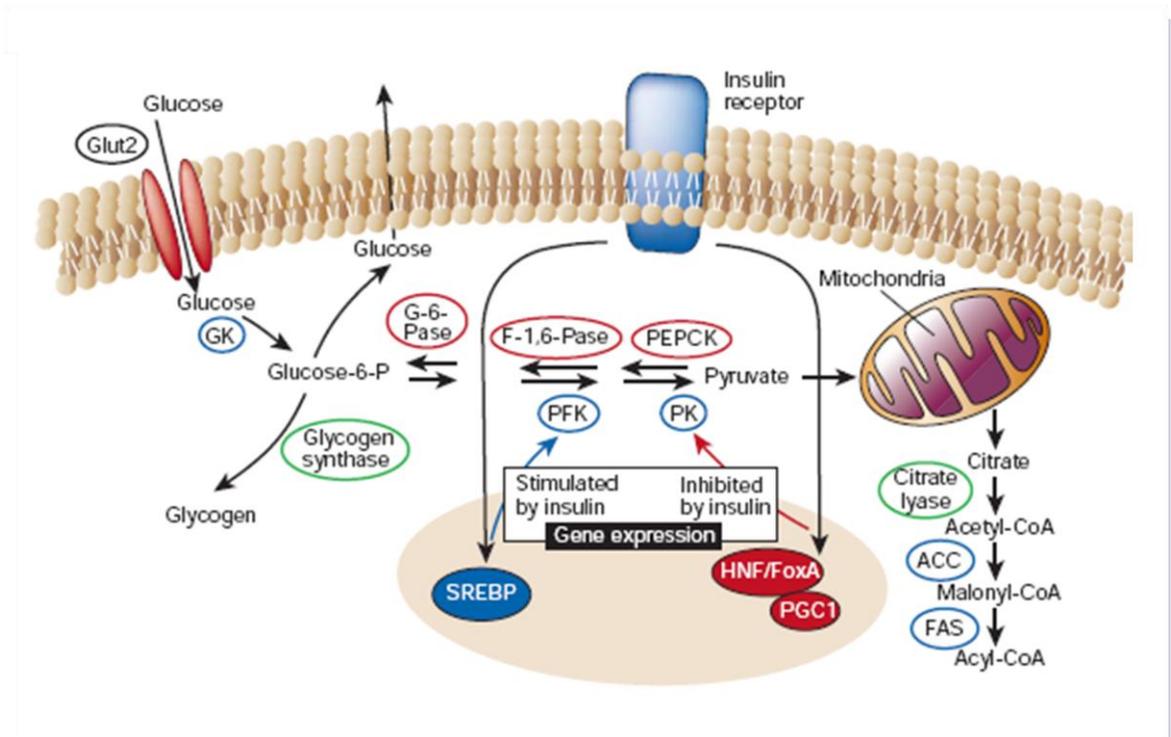


Figure 8 : effet de l'insuline sur le métabolisme glucidique du foie. L'insuline inhibe la production de glucose (flèche vers le glucose-6-P) mais stimule l'utilisation (flèche vers le pyruvate) et le stockage (flèche vers le glycogène et l'acyl-coA) du glucose. La production de glucose contrôlée par l'insuline est dépendante de l'inhibition de facteurs de transcription tels que HNF, FoxA qui activent l'expression de gènes de la glycogénèse (PEPCK, F1-6Pase, G-6-Pase (en rouge)). L'insuline favorise l'utilisation du glucose en activant le facteur de transcription SREBP qui permet l'expression de gènes de la glycolyse (PFK, PK(en bleu)). L'insuline permet aussi le stockage de glucose d'une part en glycogène par la phosphorylation de la glycogène synthase (vert) et d'autre part, en acides gras par la lipogénèse *de novo*. Ce processus est régula par l'insuline par l'activation de la citrate lyase via la PI3K ainsi que par l'activation du facteur de transcription SREBP qui active l'ACC et la FAS ; ou l'inhibition du cofacteur des PPAR, PGC1 (13).

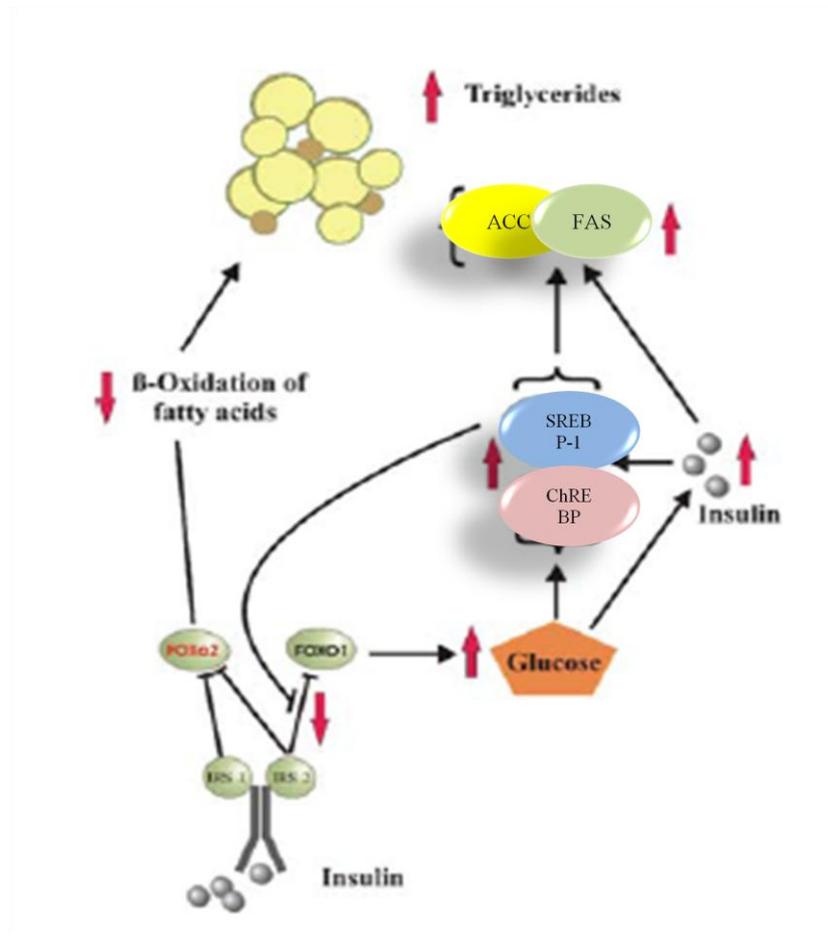


Figure 9: Dans les hépatocytes, l'insuline favorise la lipogenèse *de novo* tout en la retrocontrôlant. Elle permet l'activation des facteurs de transcription SREBP-1c et ChREBP, qui favorisent l'expression des gènes codant pour l'ACC et la FAS. Néanmoins, par l'activation de l'IRS2, l'insuline inhibe un facteur de transcription, FOXO1, qui est responsable de la production hépatique de glucose en activant notamment des gènes de la glycolyse. D'autre part en inhibant FOXO2, qui favorise l'oxydation des acides gras, l'insuline favorise la balance lipidique (23).

➔ Lors de la prise alimentaire, l'insuline régule donc la glycémie par un large spectre d'actions sur les différents organes effecteurs pour favoriser la clairance du glucose. Cependant, au cours du temps, la glycémie est un paramètre qui s'ajuste, par la complémentarité d'au moins deux hormones, l'insuline et le glucagon. Il est donc souhaitable de connaître les effets du glucagon qui s'observent surtout en période de jeûne.

3. Effets du glucagon lors de la prise alimentaire

a. Mécanismes de sécrétion du glucagon

Les cellules A (alpha) des îlots de Langerhans qui sécrètent le glucagon sont juxtaposées aux cellules B.

Le glucagon est sécrété lorsque les concentrations de glucose sont faibles (2-3mM). Au dessus de 5-6mM de glucose, la sécrétion de glucagon est inhibée par différents facteurs décrits ci-après.

A l'image de la sécrétion d'insuline, le glucose qui pénètre dans la cellule A est métabolisé en pyruvate qui génère de l'ATP par son oxydation mitochondriale (24-28). L'ATP, initialement présent en faible quantité dans la cellule, augmente, ce qui ferme les canaux K^+ sensibles à l'ATP. Ainsi, la concentration intracellulaire d'ions K^+ est augmentée ce qui dépolarise légèrement la membrane plasmique. Lorsque le potentiel membranaire atteint -60 mV, les canaux Ca^{2+} de type T sont activés et induisent un flux entrant d'ions Ca^{2+} . Le potentiel membranaire atteint donc -40 ou -30 mV (25; 28) (Figure 10,11). Les canaux Na^+ puis les canaux Ca^{2+} de type L et N, sensibles au voltage induisent un potentiel de membrane de + 10 mV qui favorise l'exocytose du glucagon. Le retour au potentiel de membrane à l'équilibre est due à l'activation de canaux K^+ de type A. Il est à noter cependant que ce mécanisme est encore fortement controversé (24).

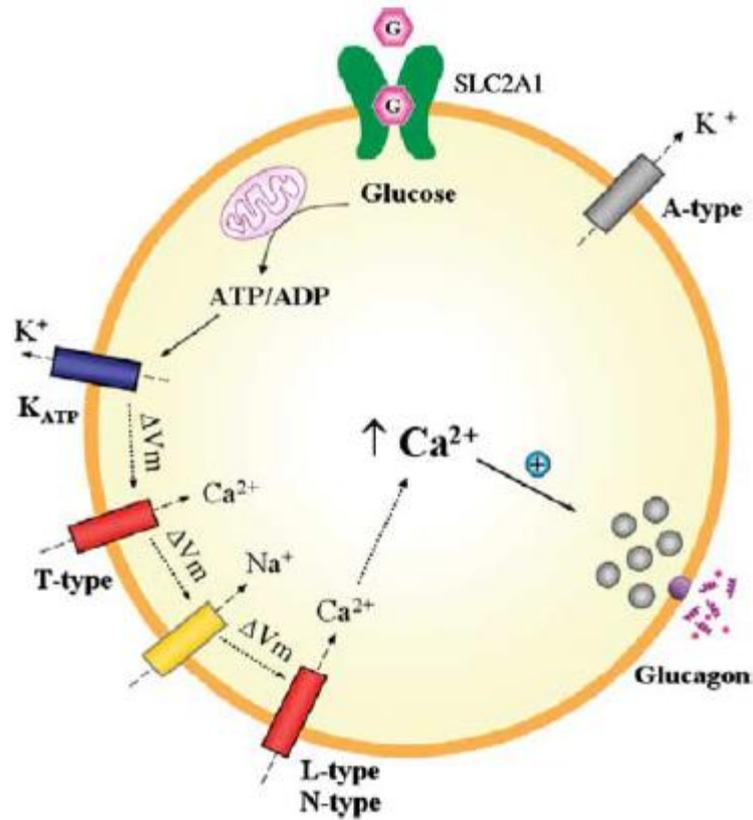


Figure 10 : Sécrétion du glucagon. Le glucose qui pénètre dans la cellule A du pancréas via son transporteur est métabolisé en pyruvate puis en ATP. L'ATP active alors une cascade de canaux sensibles au voltage. Ainsi par succession de variations du potentiel de membrane, un flux entrant d'ion Ca^{2+} dans le cytosol déclenche l'exocytose des vésicules de glucagon (26). Ce schéma reste débattu.

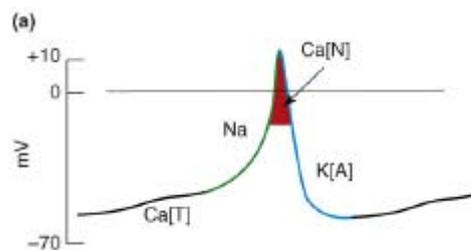


Figure 11 : représentation du potentiel d'action de la cellule A nécessaire à l'activation de la sécrétion de glucagon. L'augmentation d'ATP dans la cellule A du pancréas déclenche l'activation de canaux sensibles au voltage qui dépolarisent la membrane. Ainsi, l'ATP active des canaux Ca^{2+} de type T qui induisent une variation du potentiel de membrane de -30 mV. Le potentiel de membrane étant alors de -40 mV, les canaux Na^+ puis les canaux Ca^{2+} de type

N s'ouvrent. Le potentiel membranaire est alors de +10 mV et le glucagon est sécrété (zone rouge). Le retour à l'équilibre du potentiel de membrane est en parti du aux canaux K^+ de type A(28).

b. Régulation de la sécrétion de glucagon

Dans des conditions de stress, de jeûne ou d'exercice physique, des signaux nerveux tels que le système nerveux sympathique, le glutamate (29), les signaux hormonaux tels que la ghréline, l'obéstatine, l'adrénaline (25; 26) et, des signaux métaboliques comme le glucose à faible concentration (< 3mM), les acides aminés (25; 26), les acides gras lors d'une courte exposition (30-32), sont capables d'induire la sécrétion de glucagon. Lors d'une diminution de la glycémie, le tonus du système nerveux parasympathique (nerf vague) est aussi augmenté et favorise la sécrétion de glucagon.

A l'inverse, dans le contexte de la prise alimentaire, lorsque la glycémie augmente, la sécrétion de glucagon est inhibée car la concentration de Ca^{2+} intracellulaire n'augmente pas (24-26).

Ainsi, lors d'hyperglycémie, le tonus du système nerveux parasympathique est augmenté et active le système nerveux parasympathique. Cependant, une hormone intestinale, le GLP-1 (27; 36), activerait les terminaisons nerveuses du nerf vague localisées dans la veine porte, qui via un relais cérébral inhiberait la sécrétion de glucagon (24).

L'insuline et les différents éléments contenus dans ses vésicules d'exocytose, tels que le GABAa, les atomes de Zn^{2+} (25; 26), inhibent directement la sécrétion de glucagon (33; 34) (Figure 12). Ainsi, le GABAa et atomes de Zn^{2+} induisent une hyperpolarisation de la membrane, respectivement par l'activation de canaux Cl^- et l'activation des canaux K^+ ATP dépendant. L'insuline favorise ces deux voies d'action.

La somatostatine est une hormone sécrétée par le cerveau, le pancréas et l'intestin qui inhibe la sécrétion de glucagon ainsi que d'insuline. Dans la cellule A, la somatostatine active des canaux K^+ dépendants de l'activation de protéine G_i (33; 34). Ainsi, la fixation de cette

hormone à son récepteur active une protéine Gi qui inhibe la voie de signalisation qui implique l'AMPC et la PKA.

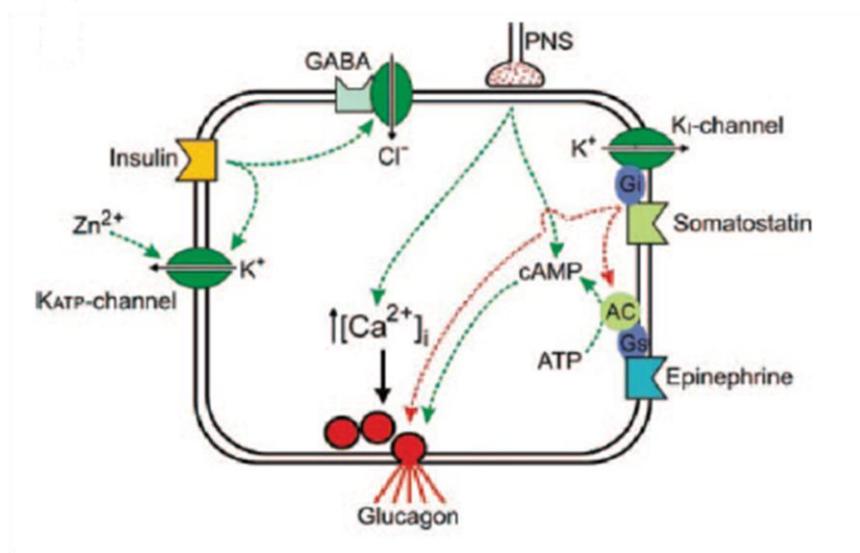


Figure 12 : Régulation de la sécrétion de glucagon. Les acteurs mis en jeu lors de stress, d'exercice physique, et de jeun tels que l'adrénaline, les terminaisons nerveuses du système parasympathique (PNS) favorisent la sécrétion de glucagon en augmentant de la concentration du Ca^{2+} cytoplasmique. A l'inverse, en condition de prise alimentaire, l'insuline, le GABA, les ions Zn^{2+} et la somatostatine inhibent la sécrétion de glucagon. Le GABA et les atomes Zn^{2+} activent respectivement des canaux Cl^- et des canaux K^+ sensibles à l'ATP qui induisent une hyperpolarisation de la membrane plasmique. L'insuline agit sur ces deux types de canaux. La fixation de la somatostatine à son récepteur active une protéine Gi qui active l'ouverture des canaux K^+ (25).

c. Les effets du glucagon

Pour lutter contre l'hypoglycémie, le glucagon libéré dans le sang agit essentiellement sur le foie pour favoriser la production hépatique de glucose.

A cet effet, le glucagon favorise la production hépatique de glucose en activant la glycogénolyse, et la néoglucogenèse à partir de l'oxaloacétate (OAA). Par contre, il inhibe la glycolyse.

Ainsi, par fixation à son récepteur à sept domaines transmembranaires couplé à une protéine Gs, le glucagon favorise la production hépatique de glucose en activant l'adényl

cyclase qui augmente la production d'AMPc (26; 35). L'AMPc active alors une protéine kinase A (PKA). Celle-ci induit des effets rapides par l'activation et l'inhibition d'enzymes métaboliques, ainsi que des effets à plus long terme par l'activation de facteurs de transcription tels que CREB (cAMP response element-binding protein).

Ainsi, la PKA phosphoryle la glycogène phosphorylase qui dégrade le glycogène en glucose 1 phosphate (Figure 13). Elle agit aussi sur des enzymes clés de la néoglucogénèse telles que la pyruvate carboxylase (PCK), la fructose biphosphatase (FBP2) et la glucose 6 phosphatase (G6Ptase) (26). De cette manière la production hépatique de glucose est augmentée.

Par complémentarité, le glucagon inhibe l'utilisation du glucose et le stockage du glucose en inhibant respectivement une enzyme de la glycolyse, la pyruvate kinase et, la glycogène synthase (Figure 13).

Le récepteur au glucagon peut aussi être lié à une protéine Gq qui active la phospholipase C (PLC). La PLC produit l'inositol IP3 à partir du PIP2. L'IP3 favorise l'augmentation de la concentration cytosolique de Ca^{2+} . Cette voie complète l'action de la PKA sur la phosphorylation des enzymes de la glycogénolyse et glycolyse.

Ainsi, une perte de contrôle de la régulation du glucagon favorise l'hyperglycémie. La présentation des effets des deux hormones responsable de la régulation de la glycémie souligne l'importance de leur complémentarité.

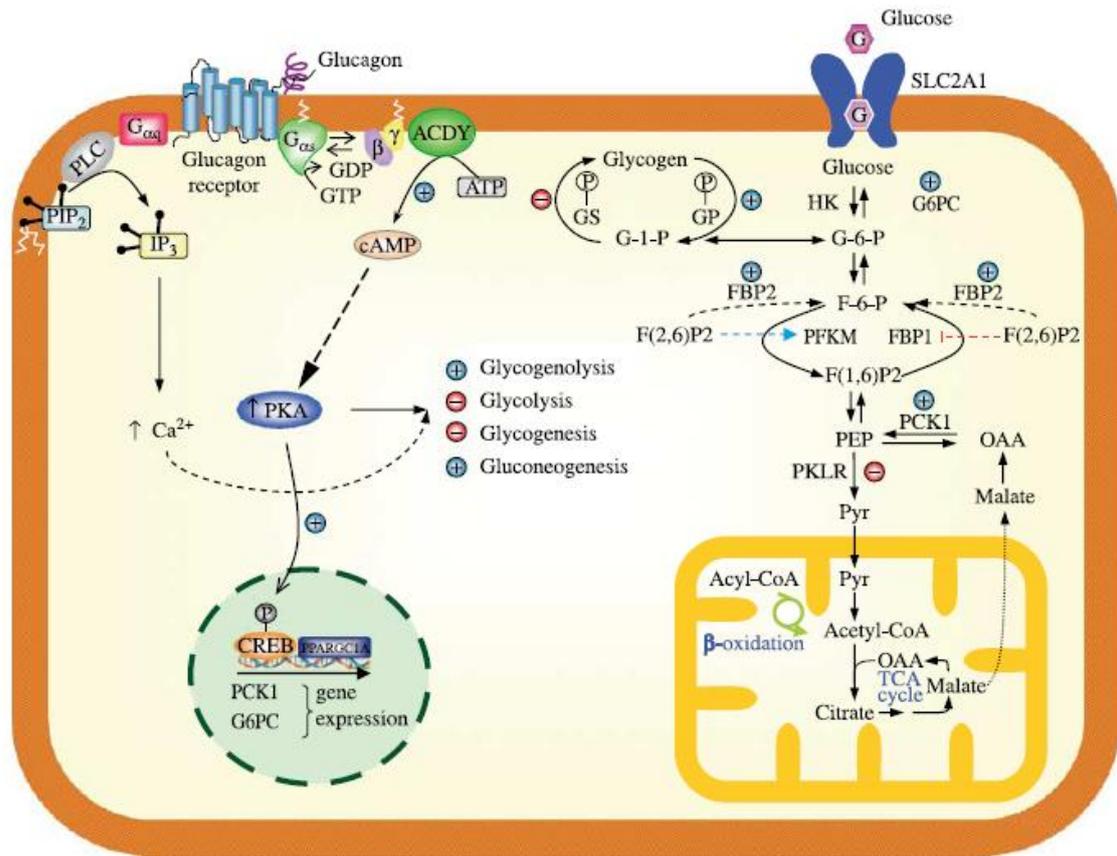


Figure 13 : Effets du glucagon sur le métabolisme glucidique des hépatocytes. Le récepteur au glucagon est un récepteur à 7 domaines transmembranaires, qui est couplé à une protéine Gs, ou Gq. Ainsi, la voie induite par la protéine Gs active une PKA. La PKA induit alors des effets rapides par phosphorylation d'enzymes et des effets à plus long terme en activant des facteurs de transcription tels que CREB qui augmente l'expression d'enzymes métaboliques. Ainsi, la PKA active des enzymes clés de la glycogénolyse (glycogène phosphorylase (GP)) et de la néoglucogénèse (fructose biphosphatase (FBP2), glucose phosphorylase (G6PC), pyruvate carboxykinase (PCK)), représentées par un singe « + bleu ». En revanche, elle inhibe la glycogène synthase (GS) et une enzyme de la glycolyse, la pyruvate kinase (PKLR) (signe « - rouge »). Lorsque le récepteur au glucagon recrute la protéine Gq, la phospholipase C (PLC) produit de l'inositol IP3. L'IP3 favorise alors l'augmentation cytosolique de Ca²⁺ qui supplémente l'effet rapide de la PKA sur les enzymes (26).

→ La régulation de la glycémie serait, *in fine*, primordiale pour subvenir au besoin énergétique du cerveau qui utilise essentiellement le glucose comme source énergétique. Les acides gras ne sont pas utilisés par le cerveau bien que les corps cétoniques puissent être utilisés dans certaines conditions telles que la grossesse. Néanmoins, la panoplie de

mécanismes effecteurs déclinés pour réguler la glycémie cache la nécessité de réguler en concomitance un autre substrat énergétique, les lipides et précisément les acides gras circulants. En effet, le métabolisme de chaque cellule serait ajusté par une équation calorique entre les apports et les dépenses en glucose et en acides gras. Un déséquilibre lipidique perturberait donc l'équilibre glycémique, conduisant alors à des maladies métaboliques, telles que le diabète de type II.

III- Maintenir la glycémie nécessite un maintien du taux d'acides gras circulants.

1. L'absorption intestinale des lipides et le cycle hépatique

a. Transport des acides gras à travers la bordure en brosse de l'intestin

Les acides gras qui arrivent dans la lumière intestinale proviennent de la digestion de triglycérides, de phospholipides et d'ester de cholestérol. Cependant, comme ils sont peu solubles dans l'eau, les acides gras s'associent aux sels biliaires pour former des micelles. La capture des acides gras contenus dans les micelles, par les entérocytes, est alors dépendante de leur concentration dans la phase aqueuse qui borde l'épithélium intestinal (36). Un régime riche en lipides faciliterait donc leur capture. En effet, la bordure en brosse de l'intestin est en étroite relation avec un microenvironnement particulier, constitué d'eau, de mucus formé de glycoprotéines hydrophiles et, du glycocalyx (Figure 14). Des pompes à protons localisées sur le pôle apical des entérocytes créent un gradient de pH qui permet de dissoudre les micelles et de libérer les acides gras (37; 38). Ces derniers sont alors capturés par diffusion simple dans l'entérocyte. En revanche lorsqu'ils sont en faible quantité, les acides gras seraient transportés par des protéines spécifiques, à forte affinité pour les acides gras, les fatty acid binding protein (FABP), ou le transporteur FAT/CD36 (36).

Dans l'intestin, les FABP sont situés essentiellement sur différents types cellulaires : les entérocytes, les macrophages, les cellules dendritiques, les cellules M et les plaques de Peyer (39). Le FAT/CD36 est un autre transporteur d'acides gras qui est capable de transporter plusieurs acides gras à la fois (40). Le rôle précis de ce transporteur reste à définir. En effet, chez la souris, l'inactivation du transporteur CD36 présent sur la membrane apicale des

entérocyte, ne diminue pas la capture des acides gras à la différence son invalidation dans le muscle et du tissu adipeux (36).

b. Métabolisme des acides gras dans l'entérocyte

Après le passage apical des entérocytes, les acides gras sont métabolisés en acyl coA puis en triglycérides (TG) ou en phospholipides (PL) par le recrutement de la diacylglycérol-acyltransferase (DGAT) (Figure 14). Les TG néosynthétisés pénètrent alors le réticulum endoplasmique grâce au transporteur MTP (microsomal triglyceride transfert protein) où ils s'associent à l'apoprotéine A et à l'ApoB48 pour former des chylomicrons. Des souris mutées pour le gène exprimant la MTP développent des gouttelettes lipidiques dans le cytoplasme des entérocytes (41). Ce phénotype se retrouve chez des souris nourries par une charge en lipide (42). Ceci suggère que l'entérocyte peut se comporter comme un adipocyte, capable de stocker de l'énergie sous forme de « pool de TG » qui serait mobilisable pour les périodes de jeûne.

Les chylomicrons sont ensuite véhiculés dans la circulation lymphatique pour être déversés dans la circulation sanguine par le canal thoracique au niveau des veines sous-clavières.

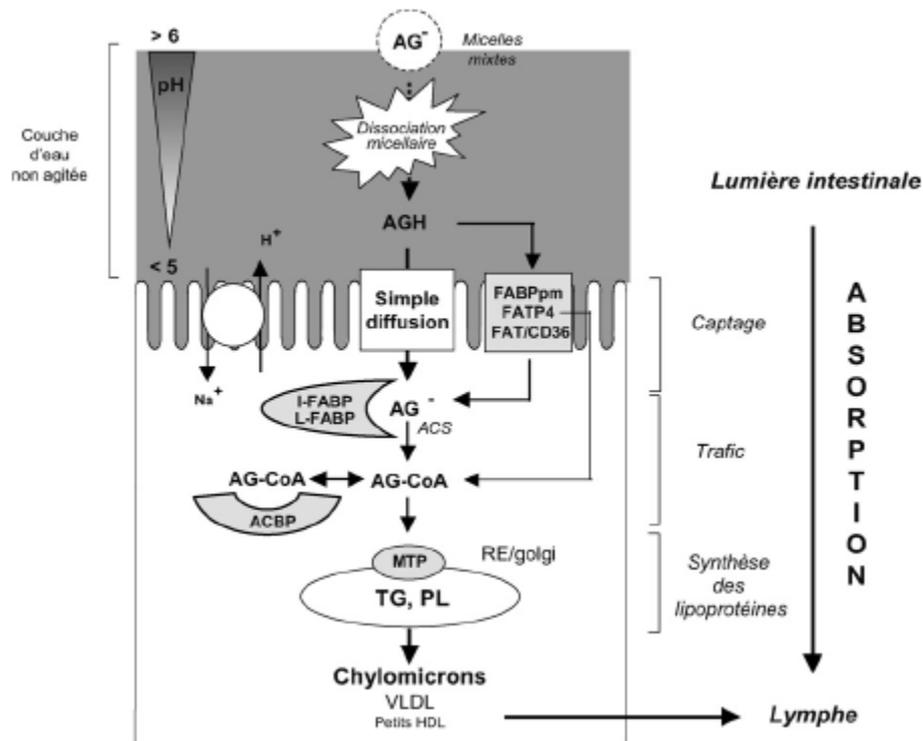


Figure 14 : Passage entérocytaire des acides gras. Dans la lumière intestinale les acides gras (AG) sont dissociés des micelles et, sont hydrogénés (AGH) pour pénétrer dans l'entérocyte par diffusion simple ou par une protéine de transport dont les plus connus dans l'intestin sont CD36, FABP4. Dans l'entérocyte, les AG sont métabolisés en acyl coA (AG-CoA) et transportés dans le réticulum endoplasmique (RE) et le golgi où ils se lient à des apoprotéines A pour former des chylomicrons. Les chylomicrons sont alors véhiculés dans la lymphe (42).

c. Passage des acides gras dans la circulation sanguine.

Arrivés dans la circulation sanguine, des chylomicrons libèrent des acides gras issus de l'hydrolyse triglycérides des lipoprotéines par la lipoprotéine lipase (LPL). Les acides gras sont alors captés par des transporteurs appartenant à la famille des FABP. En effet, il existerait au moins 9 isoformes de FABP dont la structure génique est conservée au sein des espèces. Ainsi, les FABP se trouvent sur la membrane cellulaire des tissus cibles tels que le tissu adipeux (A-FABP), le foie (L-FABP) et le cœur (H-FABP), le cerveau (B-FABP) (43) (Figure 15). Les résidus non hydrolysés des chylomicrons, de petite taille, sont alors appelés des remnants. Ces derniers peuvent alors passer au travers de fenêtres de l'endothélium hépatique pour être capturés par les hépatocytes où ils participent à la constitution des

lipoprotéines riches en triglycérides, les VLDL (very low density lipoprotein), qui sont sécrétés ensuite dans la circulation sanguine et peuvent fournir à leur tour des acides gras pour les tissus périphériques.

Hormis le foie et l'intestin, le tissu adipeux est le seul tissu périphérique capable de produire des acides gras. Dans le sang, ces derniers ne sont pas contenus dans une lipoprotéine mais sont liés à l'albumine. Ils sont donc appelés acides gras libres. Ils sont captés par les muscles et le foie pour être oxydés par le processus de la B-oxydation.

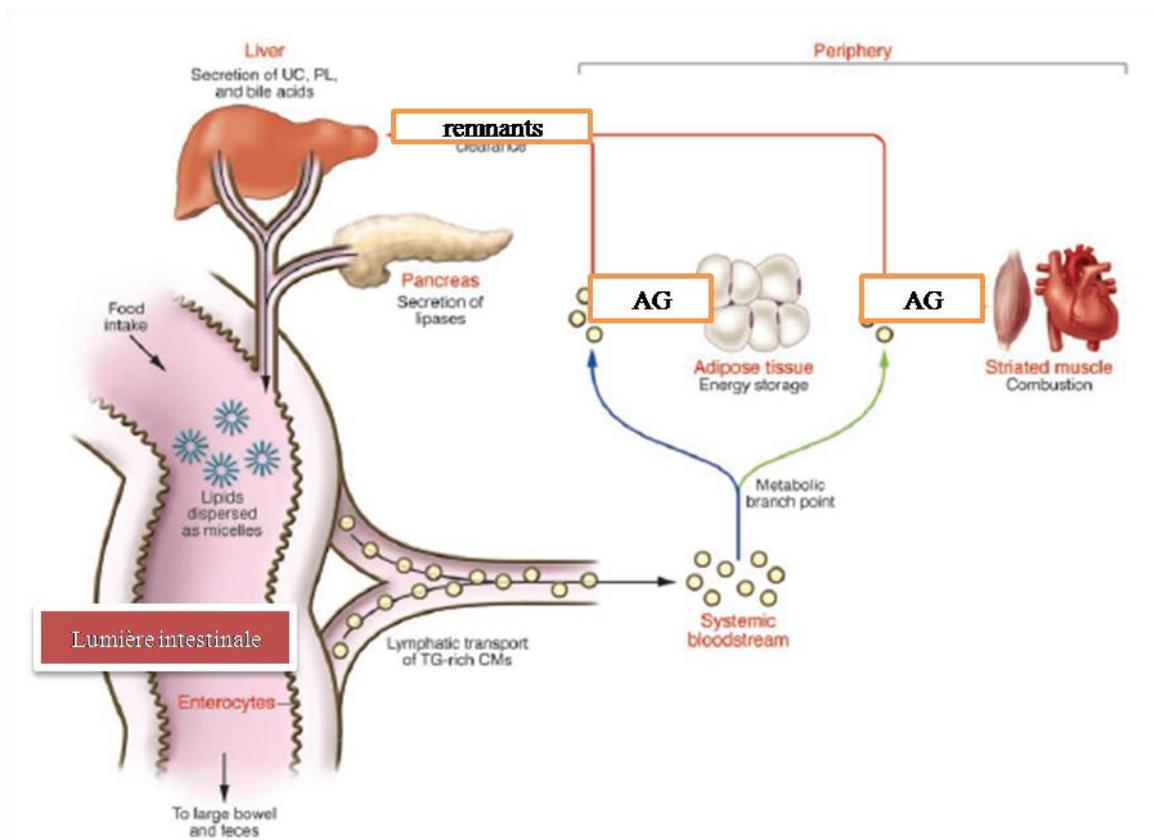


Figure 15: Distribution des triglycérides issus de l'intestin. Après le passage entérocytaire, les chylomicrons circulent dans la lymphe pour rejoindre la circulation sanguine où les acides gras sont dissociés de la lipoprotéine, captés dans les cellules et, utilisés par le tissu adipeux et les muscles. Les chylomicrons contenant peu de triglycérides sont des remnants qui sont véhiculés vers le foie (44).

Ainsi, la régulation du taux des acides gras circulant est dépendant de leur métabolisation notamment dans les muscles, le foie et, de leur stockage principalement dans le tissu adipeux.

2. Métabolisme des acides gras dans les tissus périphériques

a. Dans le muscle et le foie

Dans les cellules musculaires et hépatiques, les acides gras sont métabolisés en acyl coA par l'acyl coA synthase (ACS). Ils sont ensuite transportés dans la mitochondrie par la carnitine acyl transférase-1 (CPT-1) où ils sont alors oxydés en acétyl coA par le processus de B-oxydation (45) (Figure 16).

Dans les cellules du foie et, et de manière moindre dans les cellules musculaires, ils peuvent être stockés sous forme de triglycérides via plusieurs étapes d'estérification à partir de l'acyl coA et du glycérol 3 phosphate (G-3-P) (Figure 16). Il est à noter que le stockage musculaire des triglycérides est délétère pour les cellules et source d'insulinorésistance. Il en va de même dans le foie où le stockage excessif des lipides peut aboutir à la stéatose hépatique.

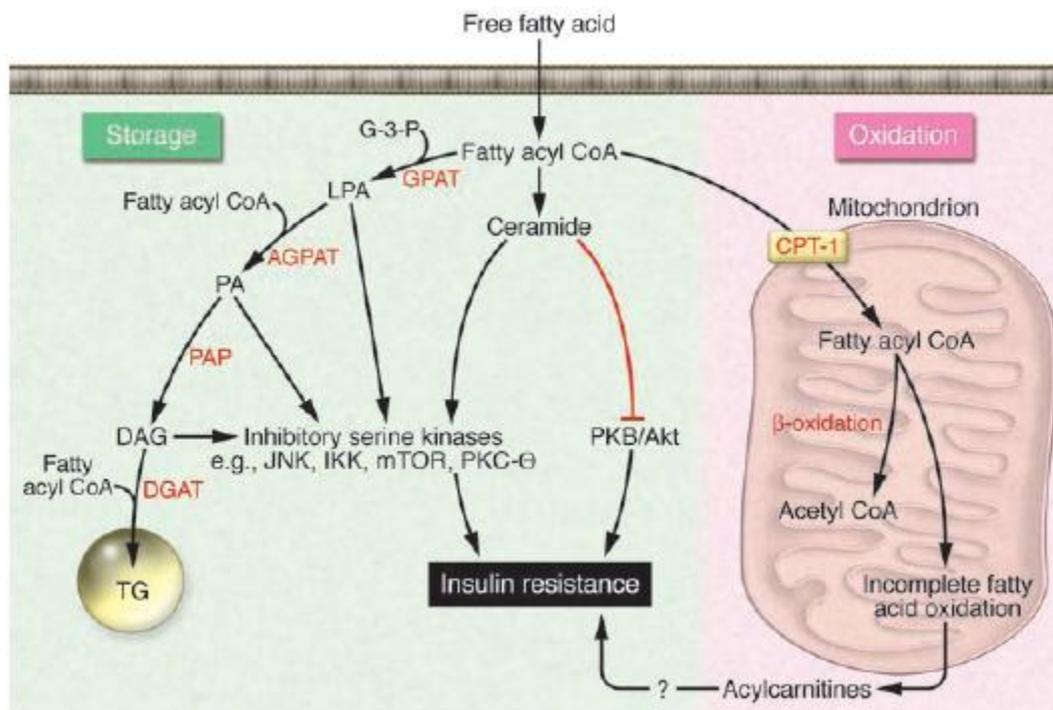


Figure 16 : métabolisme des acides gras dans le foie et les muscles. Les acides gras sont métabolisés en acyl coA pour être stockés ou oxydés. Lorsqu'ils sont stockés sous forme de triglycérides (TG), les acyl coA subissent différentes étapes de maturation. Ainsi lorsqu'un acyl coA est estérifié avec un glycérol 3 phosphate (G3P) il forme un acide lysophosphatidique (LPA). L'addition d'un second acyl coA au LPA produit un acide phosphatidique (PA) puis un diacylglycérol (DAG). Le DAG s'estérifie avec un dernier acyl coA pour former un TG. D'autre part l'acyl coA peut aussi être acheminé dans la mitochondrie par le transporteur CPT-1 pour être oxydé. Ainsi les acyls coA produisent des acetyls coA par la B-oxydation. Lorsque les acides gras représentent un excès d'énergie qui ne peut plus être stocké, les intermédiaires de synthèse des TG, la synthèse de céramides, peuvent induire un état d'intolérance à l'insuline en agissant sur des kinases qui activent des facteurs proinflammatoires (IKK, mTOR) ou qui inhibent PKB/Akt. La saturation de l'oxydation des acyls coA induit aussi des dérivés (acylcarnitines) propices au développement de l'insulinorésistance (45).

b. Dans les adipocytes

Les acides gras pénétreraient les adipocytes en partie par le transporteur A-FABP. Cependant, les mécanismes de transport des acides gras dans ces cellules restent à élucider (43; 46). Les acides gras dans les adipocytes se lient au glycérol pour former des triglycérides qui forment alors des gouttelettes lipidiques. Ces vésicules lipidiques s'apparentent à des

lipoprotéines puisqu'elles sont entourées de lipides estérifiés. Elles sont aussi entourées d'un manteau protéique constitué de protéines de la famille des périlipines (47).

Ce stockage de lipides est nécessaire pour tamponner un excès d'énergie qui conditionnerait une lipotoxicité. En revanche, en situation de jeûne, les triglycérides des gouttelettes lipidiques servent de substrat énergétique en étant métabolisés en acides gras et en glycérol par le processus de la lipolyse.

La balance entre le stockage et la dépense des triglycérides dans l'adipocyte serait en partie dépendante de l'activité des perilipine qui est régulée par l'activation d'une PKA (47).

c. Dans les neurones hypothalamiques

Le cerveau est un réservoir naturel de lipides, principalement de phospholipides. Ils participent au développement du cerveau, aux fonctions cognitives (48) et à sa neuro-protection (49). Le cerveau est donc le lieu d'un fort métabolisme oxydatif, favorisant la libération d'espèces réactives à l'oxygène (ROS). Cependant, contre toute attente, le système anti-oxydant du cerveau est mal équipé puisqu'il se limite au glutathion. Les maladies neuro-dégénératives seraient donc en partie dues à une augmentation des ROS dans les neurones et ses cellules avoisinantes qui n'est pas suffisamment contrebalancée par une augmentation du système anti-oxydant (50).

Les acides gras provenant de la circulation sanguine périphérique sont impliqués dans le métabolisme des cellules nerveuses.

i. Passage de la barrière hémato-encéphalique par les acides gras circulants

Les acides gras qui proviennent de la circulation sanguine périphérique sont des acides gras libres liés à l'albumine ou associés aux lipoprotéines telles que les chylomicrons. Le mécanisme de passage des acides gras à travers les cellules endothéliales de la barrière hémato-encéphalique reste un sujet ouvert. Ils traverseraient la membrane par diffusion simple ou grâce à un transporteur B-FABP (51).

ii. Mise en évidence des effets des acides gras sur les neurones de l'hypothalamus

Oomura et coll. démontrent par électrophysiologie, que les acides gras agissent spécifiquement sur des coupes de neurones de l'hypothalamus, notamment sur l'hypothalamus latéral (LH) (52). D'autre part, par technique de patch clamp sur des coupes de cerveau de rats, l'équipe de Magnan met en évidence, qu'à l'image du pancréas, l'effet des acides gras est aussi dépendant du glucose. Ainsi, en présence de 2,5 mM de glucose dans le cerveau, qui représente la concentration de glucose en condition nourrie, l'acide oléique active 13% des neurones du noyau arqué (NA) et en inhibe 6% (53). En présence de faible concentration de glucose (0,1mM), mimant des conditions de jeûne, l'acide oléique inhibe 30% des neurones du NA. Ces derniers n'ont pas été excités en présence de 2,5mM de glucose. Les lipides activent donc différentes populations de neurones en fonctions de la concentration de glucose.

3. Effets des acides gras sur la régulation de la glycémie en fonction de la voie d'administration

a. Effet des acides gras circulants dans le sang sur le pancréas

Le glucose et les acides gras participent conjointement à l'augmentation de la sécrétion d'insuline. En effet, lorsque les taux d'acides gras produit pendant 24h de jeûne sont diminués par un agent anti-lipolytique, l'orlistat, le glucose ne stimulerait pas la sécrétion d'insuline (54; 55). On constatera donc que les périodes interprandriales où les taux d'acides gras sont augmentés correspondent à une phase de préparation à la sécrétion d'insuline déclenché par la prise d'un repas (55; 56) (55).

Les acides gras agiraient sur la cellule B en se fixant à leur récepteur membranaire, le GRP40. Ce signal induirait une cascade d'amplification qui permettrait alors la sécrétion d'insuline via une libération de Ca^{2+} (57). L'effet potentialisateur de la sécrétion d'insuline par les acides gras serait dépendant de la longueur de chaîne et du degré de saturation. Ainsi,

la sécrétion d'insuline augmente avec le nombre de carbones ou de doubles liaisons carbone-carbone (58).

b. Effets des acides gras dans le cerveau

i. Effets sur la prise alimentaire et la production hépatique de glucose

Une injection intracérébroventriculaire d'un acide gras à longue chaîne, l'acide oléique, pendant six heures, induit une diminution de la prise alimentaire. Cet effet est indépendant d'une variation de l'hormone qui induit la satiété, la leptine. Les acides gras auraient donc un effet propre sur la prise alimentaire. Cependant cette diminution de prise alimentaire est accompagnée d'une diminution d'un neuropeptide orexigénique, le neuropeptide Y (NPY) (59).

L'inhibition de la prise alimentaire s'accompagne d'une régulation du métabolisme glucidique du foie. Ainsi, chez des rats, une perfusion d'acide gras dans la jugulaire (60), qui mime le flux des acides gras vers le cerveau ou, une perfusion intracérébroventriculaire (59; 61), qui mime l'action locale et centrale des acides gras, induit une inhibition de la production hépatique de glucose (PHG).

Les acides gras seraient donc détectés et intégrés par les neurones comme un signal de « suffisance énergétique », et conditionneraient donc le message nerveux efférent aux tissus périphériques.

ii. Les acteurs moléculaires du sensing hypothalamique des acides gras

Moléculairement, des dérivés des acides gras jouent le rôle de signaux métaboliques détecteurs de l'état énergétique central, appelé « sensing des acides gras » (62).

A cet effet, les conditions expérimentales ont nécessité des perfusions intracérébrales de lipides suffisamment longues (6h à 24 heures) pour créer des conditions d'excès d'énergie et qui pourraient miner un début de pathologie métabolique ou un état d'adaptation avant le développement d'une pathologie.

La première étape de métabolisation des acides gras est leur métabolisation en acyl coA par l'acyl coA synthase (ASC). La littérature relate que par l'inhibition pharmacologique de l'ACS, par le triascine C, le taux d'acyl coA cytoplasmique est diminué et empêche l'inhibition de la PHG et la prise alimentaire (63). L'estérification des acides gras en acyls coA par l'ACS est donc une étape clé requise pour contrôler leurs effets systémiques (Figure 17).

Lorsque les acides gras sont métabolisés en acyl coA, ils sont transportés dans la mitochondrie par le transporteur carnityl palmitoyltransferase (CPT) pour être oxydés via la B-oxydation. Sur des rats perfusés pendant 24 heures par une solution de lipides via la jugulaire, l'inhibition pharmacologique de la CPT centrale par l'etomoxir empêche l'inhibition de la prise alimentaire dans les noyaux neuronaux appelés VMH (hypothalamus ventromédian), PVN (noyau paraventriculaire) et le noyau arqué. L'etomoxir bloque aussi l'inhibition de la PHG induite par les lipides et, altère l'augmentation de la sécrétion d'insuline induite par le glucose (64). Ainsi, l'oxydation des acyl coA dans l'hypothalamus est la seconde étape clé qui conditionne le métabolisme glucidique périphérique.

Ainsi, le rapport des acides gras sur acyl coA, et la B oxydation sont des « thermostats » des neurones de l'hypothalamus qui permettent la régulation périphérique de la glycémie. La perte de contrôle des ces derniers engendreraient donc un désordre métabolique (Figure 17).

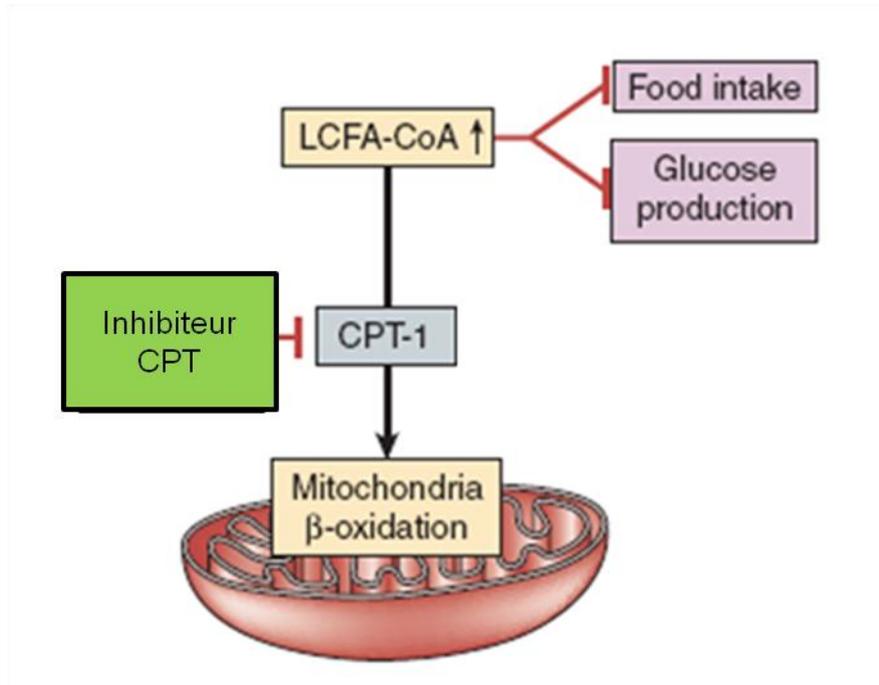


Figure 17 : Acteurs moléculaires du sensing des lipides dans l'hypothalamus. Le sensing lipidique notamment dans les neurones du VMH, PVN est défini par le taux cytoplasmique d'acyls coA à longues chaînes (LCFA-CoA) et par leur oxydation mitochondriale. Le rapport entre les LCFA-CoA sur les acyl coA oxydés conditionnerait alors l'inhibition de la prise alimentaire et de la production hépatique de glucose. Ces deux régulateurs peuvent être étudiés par des inhibiteurs de la CPT (modifié d'après(62)).

→ Lorsque les **acides gras circulants** arrivent au cerveau, ils activent la voie « cerveau-périphérie » qui modulerait un message nerveux efférent qui diminuerait la production de glucose et qui serait propice au stockage et l'utilisation du glucose. Les **lipides** nutritionnels qui atteignent la barrière **intestinale**, en amont dans l'activation de l' « arc réflexe » génèreraient-ils donc des **signaux d'anticipation** à l'arrivée d'excès d'énergie dans les tissus ?

c. Effets des acides gras administrés par voie intragastrique

i. Effet sur la production hépatique de glucose et la sécrétion d'insuline

Chez des rats, une solution de lipides (intralipid) perfusée dans l'intestin pendant 50 minutes, qui n'augmente pas le taux acides gras circulants, induit une inhibition de la PHG mesurée lors d'un clamp hyperinsulinémique (65). Comme dans les neurones de l'hypothalamus, l'effet des acides gras sur la PHG serait dépendante de l'ACS (65). En inhibant pharmacologiquement les terminaisons nerveuses du nerf vague dans l'intestin par un anesthésiant, la trétacaine, ou par dénervation, les lipides n'induisent plus une diminution la PHG. De plus, l'inhibition pharmacologique par le MK-801 des terminaisons nerveuses du nerf vague provenant de l'intestin et qui communiqueraient avec des neurones NMDAergiques présents dans le tronc cérébral, empêche la diminution de la PHG induite par les lipides (65). Le message lipidique intestinal serait donc bien dépendant de l' « arc réflexe métabolique » qui via le nerf vague nécessiterait un relais cérébral pour moduler un message nerveux efférent au foie.

ii. **Mécanismes moléculaires induits par des lipides présents dans l'intestin**

La longueur de chaîne des acides gras induirait une activation différentielle du nerf vague. Ainsi, un acide gras à chaîne courte, le butyrate, agirait directement sur les fibres nerveuses du nerf vague (66) alors qu'un acide gras à longue chaîne agirait via un intermédiaire tel que la CCK (66) ou le récepteur à la douleur TRPV1 (67). D'autres récepteurs aux lipides, les GRP, sont présents dans l'intestin. Ils ont pour principale fonction la détection des nutriments. Je développerai leur mécanisme dans un prochain paragraphe.

Ces données suggèrent donc des mécanismes fins de régulation par les lipides.

→ Les effets des lipides nutritionnels sur le métabolisme glucidique semblent donc générer un message d'anticipation à l'arrivée de l'énergie dans le sang. Cependant les mécanismes d'actions des lipides sur les cellules de l'intestin restent un sujet ouvert.

4. Régulation du métabolisme des acides gras par les hormones pancréatiques.

a. Régulation du métabolisme des acides gras par l'insuline

i. Dans le tissu adipeux

L'insuline agit sur le stockage de l'énergie en facilitant le stockage des acides gras en activant l'entrée des acides gras dans les adipocytes par la FATP (43).

D'autre part, l'insuline empêche la libération d'acide gras vers le sang circulant en inhibant la lipolyse. La lipolyse est la libération des acides gras et du glycérol à partir des triglycérides par la lipase hormono-sensible (LHS) (21; 22). Elle est activée par la voie des récepteurs B-adrénérgiques qui activent l'adénylate cyclase qui produit alors de l'AMPc à partir de l'ATP. L'AMPc active ensuite une protéine kinase A (PKA) qui phosphoryle la LHS. Par la voie des IRS PI3K/Akt, l'insuline active une phosphodiesterase (PDE) qui linéarise l'AMPc en 5'AMP. De cette manière, la LHS ne peut plus être activée, la lipolyse est alors inhibée (21; 22) (Figure 18).

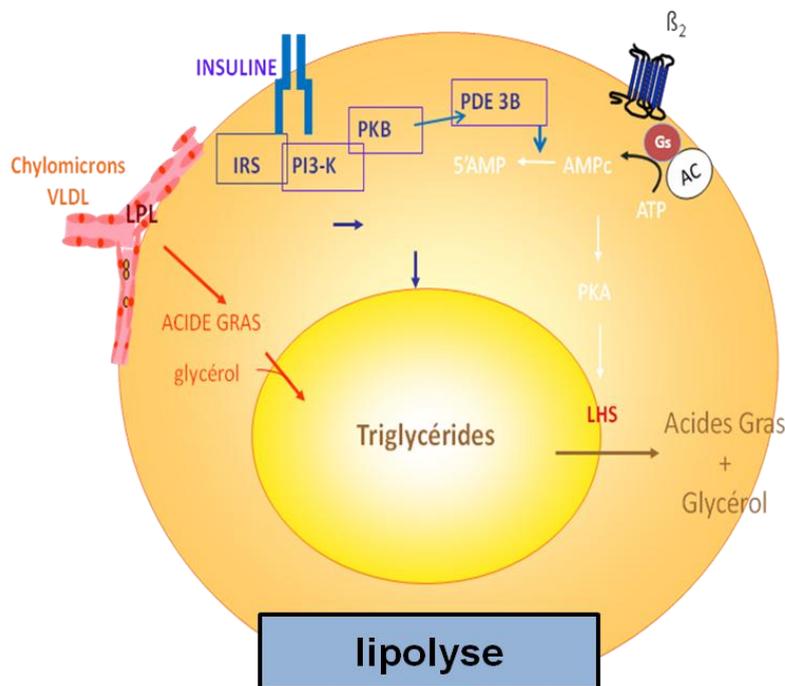


Figure 18 : L'insuline inhibe la lipolyse induite par les récepteurs B adrénergiques. Les récepteurs B adrénergiques activent l'adényl cyclase (AC) qui produit de l'AMPc à partir d'ATP afin d'activer la PKA. La PKA active alors la lipase hormonosensible (LHS). L'insuline, par la voie de la PI3K/PKB, active une phosphodiesterase (PDE3B) qui linéarise l'AMPc en 5'AMP ce qui court-circuite la voie induite par des récepteurs B adrénergiques.

ii. Dans le foie

Dans le foie, l'insuline agirait sur le métabolisme des lipides en inhibant la B-oxydation. En se fixant à son récepteur, l'insuline activerait l'IRS1 qui, à la suite d'une cascade de signalisation, activerait le facteur de transcription FOXO2 (voir A/II-2.iii.) (Figure 9). Ce dernier inhiberait alors l'expression des gènes codant pour des enzymes de la bêta oxydation (23).

b. Régulation du métabolisme des acides gras par le glucagon

Une étude réalisée par Longuet et coll. montre que par invalidation du récepteur au glucagon chez des souris, les taux circulants d'acides gras et de triglycérides circulants sont augmentés lors d'un jeun prolongé ce qui est associé à une augmentation de la sécrétion des triglycéride hépatique (68). En revanche une administration sous-cutanée de glucagon à des souris sauvages induit une diminution de la sécrétion hépatique des triglycérides et une augmentation de la B-oxydation.

L'inhibition de la synthèse des triglycérides par le glucagon serait dépendante de la voie des MAPKinase, alors que l'inhibition de la B-oxydation serait liée à l'activation de la transcription des gènes (68). Néanmoins, le glucagon pourrait aussi recruter des récepteurs aux lipides, les PPAR (peroxisome proliferator-activated receptor) pour oxyder les acides gras et inhiber la synthèse des triglycérides (68).

➔ Cette présentation globale de la régulation de la glycémie montre la nécessité d'une interrelation entre les acteurs nerveux, hormonaux et métaboliques impliqués dans les axes « intestin-cerveau » et « cerveau-périphérie ». Face à cette organisation complexe, une dérégulation de la glycémie semble donc difficile à rétablir. Pour tenter de parer à un vaste problème, je vais essayer de l'appréhender au plus proche de sa source ou du moins en amont de l' « arc réflexe métabolique ». En effet, l'axe « intestin-cerveau » semble émettre des signaux anticipateurs pour la régulation de la glycémie qui pourrait être un moyen de parer un éventuel désordre métabolique. J'essaierai donc de valoriser l'intérêt que représente l'intestin puis l'axe « intestin-cerveau » dans la régulation de l'homéostasie énergétique.

IV- L'intestin

1. Anatomie et histologie

a. Anatomie

L'intestin grêle est délimité par trois segments caractérisés par leur capacité à absorber les nutriments. Ainsi, dans le sens proximo-distal, on distingue le duodénum, le jéjunum et l'iléon qui forment l'intestin grêle.

b. Histologie

L'intestin est constitué d'un épithélium monostratifié reposant sur la *lamina propria*. Il est constitué de différents types cellulaires, décrits ci-après, formant des villosités et des cryptes ce qui augmente la surface d'échange avec le milieu extérieur. De plus, cette structure villositaire décrit un gradient de renouvellement cellulaire qui s'établit des cryptes où sont présentes les cellules « souches » jusqu'au sommet des villosités où meurent les cellules (69; 70). L'intégralité des cellules de l'intestin grêle serait renouvelée, chez la souris, en deux à trois jours (69). Le renouvellement cellulaire constant et rapide de l'intestin est en relation avec la fonction d'absorption des nutriments, qui nécessite une forte activité métabolique, ainsi qu'avec la fonction de défense contre les agressions extérieures (toxiques, microorganismes...). Différents types cellulaires sont donc nécessaires pour répondre aux différentes fonctions de l'intestin.

Ainsi, les entérocytes, cellules majoritaires de l'épithélium intestinal, sont des cellules caractérisées par une ultra-structure particulière située au pôle apical, la « bordure en brosse » (71). Celle-ci est composée de microvillosités mobiles qui permettent de détecter et d'absorber les aliments. Les entérocytes sont liés entre eux par les jonctions serrées qui forment une barrière aux antigènes. Néanmoins cette barrière entérocytaire n'est pas passive puisqu'elle peut endocyter des antigènes (71).

Les cellules endocrines (ou entéroendocrines) (72) sont moins nombreuses et disséminées dans l'épithélium. Elles sécrètent des hormones telles que la CCK, la ghréline, le GIP (gastric inhibitor peptide), GLP-1... Elles sont appelées cellules L, K... selon le type d'hormone

sécrétée. Ces hormones ont un rôle majeur dans la régulation des mécanismes de digestion, et dans la régulation de la glycémie que je développerai par la suite.

Les cellules caliciformes ou « Goblet Cell » sécrètent du mucus par exocytose pour favoriser la digestion des nutriments. Le mucus est aussi le premier obstacle aux pathogènes qui pénètrent dans la lumière intestinale (73).

Des cellules intestinales sont associées aux organes lymphoïdes secondaires pour lutter contre l'agression microbienne et bactérienne. Ainsi, les cellules de Paneth se différencient dans le fond des cryptes où elles résident pendant environ 20 jours pour ensuite se déplacer par mécanisme de phagocytose (74). Elles ont un rôle d'immuno-surveillance et de défense en sécrétant des enzymes spécifiques comme le lysozyme, qui aurait un rôle d'antibiotique.

D'autre part, sous l'épithélium intestinal se trouve des amas de cellules immunitaires qui forment des nœuds lymphoïdes appelés les plaques de Peyers qui communiquent avec le système lymphoïde (75; 76) (Figure 19). Ce dernier regroupe des cellules présentatrices d'antigènes telles que les cellules dendritiques, les macrophages, ainsi que les lymphocytes T et B qui interagissent entre eux. Dans l'épithélium qui recouvre les plaques de Peyers, sont disséminées les cellules M (microfold). Celles-ci sont dépourvues de microvillosités. Elles phagocytent les bactéries entières et quelques antigènes bactériens provenant de la lumière de l'intestin et, qui sont ensuite libérés dans la *lamina propria* pour être pris en charge par les cellules dendritiques. Ces dernières présentent alors l'antigène aux lymphocytes (Figure 20).

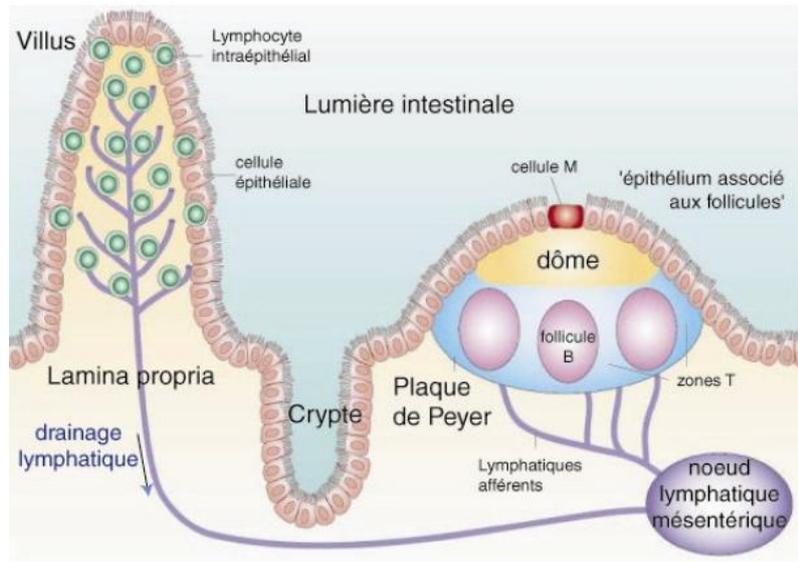


Figure 19 : Représentation de l'épithélium intestinal en interconnexion avec le système immunitaire, via les cellules M et les plaques de Peyer. Ces dernières rassemblent des lymphocytes B et T sous forme de follicule. Les plaques de Peyer sont liées au nœud lymphatique mésentérique qui draine le système immunitaire (extraite d'une présentation de cours mise sur internet)

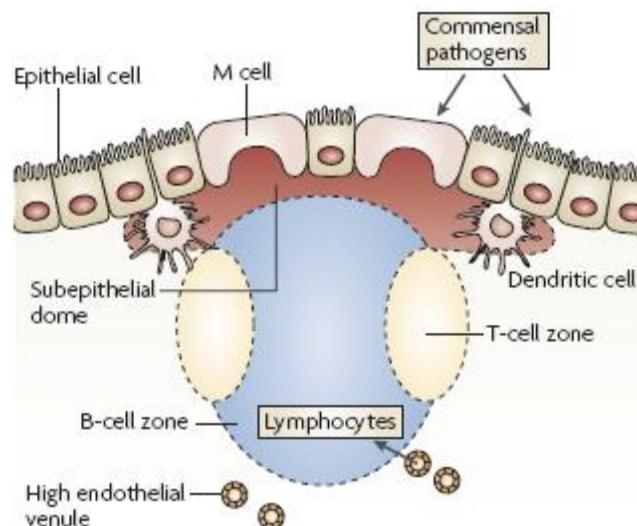


Figure 20 : Représentation d'une plaque de Peyer localisé sous l'épithélium intestinal composé de cellule M. La plaque de Peyer est composée de différents acteurs que sont les lymphocytes B et T regroupés en zones distinctes (75).

L'intestin regroupe donc environ 80% du système immunitaire dont les mécanismes d'action restent à définir. Néanmoins, la flore bactérienne intestinale présage la nécessité d'une activité immunitaire pour garder un équilibre entre « le soi » et le « non soi ».

L'intestin est aussi composé d'un système nerveux propre puisque lorsqu'il est isolé des connexions nerveuses de l'organisme, et qu'il repose dans une solution saline, il continue à se contracter. C'est le système nerveux entérique.

2. Le système nerveux entérique

a. Présentation

Le système nerveux entérique (SNE) comporte environ 200 millions de neurones (mille fois moins que le cerveau, mais autant que la moelle épinière) répartis en deux plexus, le plexus myentérique (MP) et submuqueux (SMP) (77) ([Figure 21](#)).

Le MP est situé entre les couches musculaires longitudinales et circulaires. Le SMP est situé entre la couche de muscles lisses longitudinaux et la couche sous muqueuse.

Ces deux plexi nerveux permettent la contraction des cellules musculaires lisses et participent à la régulation des sécrétions intestinales via les neuromédiateurs qu'ils libèrent au voisinage des cellules concernées (77).

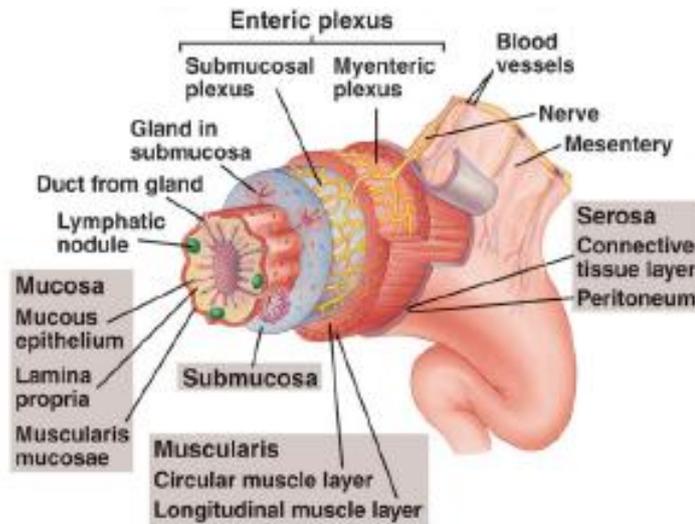


Figure 21 : Représentation de la composition tissulaire de l'intestin. De la lumière intestinale vers la séreuse (de gauche à droite), l'intestin est composé d'un épithélium qui repose sur une muqueuse et la lamina propria. Dans la sous muqueuse, se trouve le premier plexus du système nerveux entérique, le plexus submuqueux. Ce dernier est recouvert d'un tissu musculaire, lui-même recouvert du second plexus nerveux, le plexus myentérique. Ce plexus est recouvert d'une couche de muscles longitudinaux qui est recouverte de la séreuse. (extraite d'une présentation de cours mise sur internet)

b. Les différents types de neurones du SNE

Les neurones du SNE sont des neurones sensitifs (thermo, mécano ou chémorécepteur), effecteurs et des interneurons. Ces différents neurones ont des neurotransmetteurs variés. Ainsi, les neurones nitrogéniques qui sécrètent du monoxyde d'azote (NO) sont des neurones inhibiteurs qui innervent les cellules musculaires. Les neurones cholinergiques peuvent être des neurones intrinsèques sensitifs, des interneurons, ou des neurones moteurs excitateurs qui innervent les cellules musculaires (77).

Certains neurones du SNE peuvent répondre au glucose par une dépolarisation via l'activation des canaux K^+ sensibles à l'ATP. D'autres induisent une hyperpolarisation (78).

c. Les cellules gliales du SNE

Le SNE est aussi composé de cellules gliales (EGC, enteric glial cell), qui sont plus abondantes que les neurones. Comme les astrocytes et oligodendrocytes du cerveau, ces cellules ont une fonction nutritive pour les neurones. Elles sont aussi capables de libérer des neurotransmetteurs par la fermeture de canaux K^+ et, d'activer la glutamine synthase qui est une enzyme nécessaire à la synthèse des neurotransmetteurs à partir de la glutamine (79). Les EGC sont donc nécessaires à la survie et aux fonctions des neurones. Leur perte induirait une dégénération neuronale (80).

De plus, les EGC attireraient les cellules immunes, telles que les lymphocytes, ce qui favoriserait la communication entre le système immunitaire et nerveux notamment lors de maladie inflammatoire intestinale (79; 81) (Figure 22).

Ce vaste plexus nerveux entérique interagirait avec les terminaisons afférentes du nerf vague qui pénétreraient les différentes couches de l'intestin (77) (Figure 23).

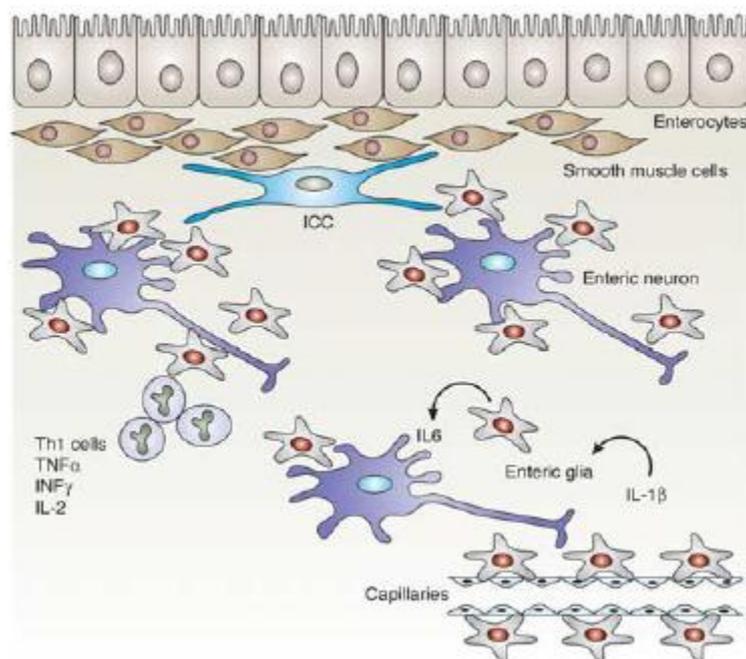


Figure 22 : représentation de l'interconnexion des cellules gliales (enteric glia) avec les neurones entériques et les cellules interstitielles de cajal (ICC). Les cellules gliales sont capable de produire des facteurs inflammatoires (IL6, IL-1B) (82).

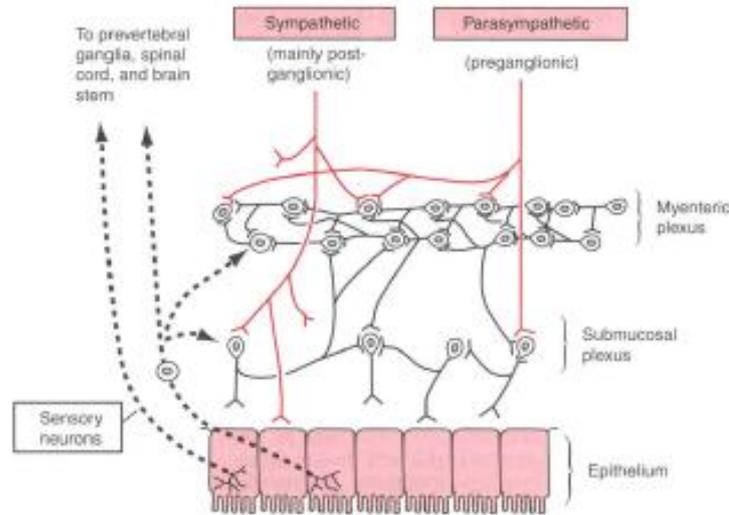


Figure 23: Représentation du système nerveux entérique (myenteric plexus et submucosal plexus) qui interagit avec les fibres du système nerveux autonome (sympathique et parasympathique) ainsi qu'avec les fibres sensibles afférentes. (extraite d'une présentation de cours mise sur internet)

3. Les fibres du nerf vague afférentes au cerveau

Dans les précédents chapitres, je vous ai décrit la fonction physiologique du nerf vague (A/I.2). Dans ce chapitre je vous présenterai son aspect structurel et son interconnexion avec l'intestin.

Les fibres du nerf vague sont difficiles à étudier et à mettre en évidence. L'équipe de Powley a pu visualiser la morphologie de ces fibres par un traceur neuronal fluorescent entérograde de type dextran-tetramethylrhodamine-biotine (83) (Figure 24). Les fibres du nerf vague, afférentes au cerveau, sont des fibres sensibles primaires qui sont en contact avec des ganglions des plexi MP et SMP. Elles se prolongent aussi dans la *lamina propria*, sous jacente à l'épithélium, et entre les cryptes où elles se terminent par une arborescence de neurites. Ces fibres s'acheminent jusqu'à leur corps cellulaire localisé dans le ganglion nodal, d'où partent des fibres neuronales qui se projettent vers la partie postérieure du tronc cérébral, dans la Médulla Oblongata (77; 83; 84). A cet endroit, sont logés les noyaux du complexe dorsal moteur du nerf vague et le noyau du tractus solitaire.

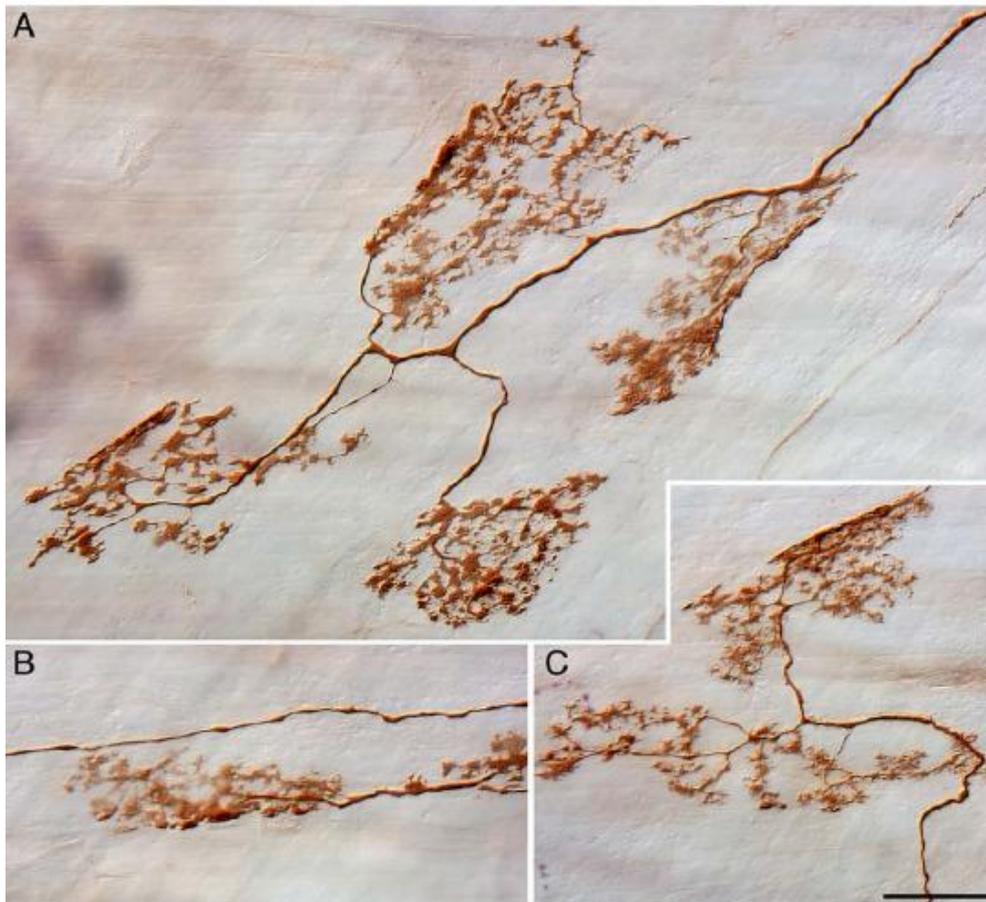


Figure 24: photos de l'arborescence de terminaisons nerveuses du nerf vague dans l'intestin d'un rat âgé de trois mois visualisée par une sonde neuronale, le dextran-tetramethylrhodamine-biotine (83).

4. L'intérêt de l'intestin dans « l'arc réflexe métabolique anticipateur »

a. Détection entérique de glucose, primordiale pour anticiper la régulation de la glycémie.

Deux études permettent d'appuyer le rôle primordial de l'intestin dans la détection et la régulation de la glycémie.

Au sein du laboratoire, un modèle de perfusion intragastrique de glucose, qui n'augmente pas la glycémie, a permis d'étudier l'effet de la détection intestinale de glucose sur la régulation de la glycémie. Par immuno-marquage d'une protéine neuronale, c-fos, Knauf et coll. (85) démontrent que l'activation des « glucose-sensors » entériques induit une

stimulation des neurones du tronc cérébral et de l'hypothalamus ce qui conforte de l'existence de l'axe « intestin-cerveau » et l'importance de l'intestin.

Une analyse médicale nous permet aussi de mettre en avant le rôle de la détection entérique de glucose. En effet, des sujets diabétiques présentant une hyperglycémie et qui ont subi une chirurgie bariatrique retrouvent une glycémie contrôlée (86). La chirurgie bariatrique consiste à retirer la partie proximale de l'intestin et à relier la partie distale de l'intestin à l'estomac. Ceci suggère donc que la partie proximale de l'intestin, à une place importante dans la régulation de la glycémie. Pour élucider la fonction de la partie proximale manquante, cette chirurgie a été adaptée au modèle souris, appelée « anastomose entéro-gastrique » (AEG) (Figure 25). Ces souris présentent une meilleure tolérance au glucose suite à une charge orale en glucose. Cependant, leur glycémie ne semble pas complètement régulée puisqu'à la fin du test le profil glycémique des souris tend à diminuer (87). Ceci montre bien que la partie proximale (manquante) de l'intestin serait donc un centre primordial de détection du glucose qui conditionnerait la régulation de la glycémie.

Ainsi, placé dans l'intégralité de l'arc réflexe, les **cellules intestinales détectrices de glucose du duodénum et jéjunum proximal**, seraient fonctionnellement connectées aux centres intégrateurs du cerveau, via le nerf vague, **pour préparer les organes effecteurs** à réguler l'homéostasie glucidique (88).

b. Capacité d'adaptation de l'intestin pour la régulation de la glycémie

Les auteurs montrent aussi que 10 jours après l'AEG, les souris nourries par un régime riche en calories, ont une augmentation de la G6Pase et de la PEPCK dans l'iléon qui ne se retrouve pas chez les souris témoins (87). En effet, après 24 à 48 heures de jeûne, le duodénum et le jéjunum activeraient la voie de la gluconéogenèse en augmentant l'expression génique et protéique de la PEPCK et de la G6Pase. L'intestin serait aussi capable de produire du glucose à partir d'un acide aminé, la glutamine (89; 90). La glutamine est métabolisée par la glutaminase en α -cétoglutarate, un intermédiaire du cycle de Krebs. Par réactions

successives, l' α -cétoglutarate est converti en acétyl coA qui est alors métabolisé dans le cycle de Krebs en CO₂. Lors de cette opération biochimique de nombreux co-enzymes réduits sont produits. Au cours du jeûne, l'intestin produirait jusqu'à 25% du glucose endogène circulant (91). Ainsi, l'augmentation de la PEPCK et G6Pase dans l'iléon de souris AEG montre que l'intestin a une capacité métabolique d'adaptation. La néoglucogenèse qui se déroule dans la partie proximale est alors développée par la partie distale de l'intestin. Ceci suggère que l'activité métabolique de l'intestin est une fonction primordiale pour l'équilibre glycémique.

Les fonctions d'anticipation à la régulation de la glycémie et de production de glucose par l'intestin montrent son importance dans la régulation de la glycémie. Sa **capacité d'adaptation** fonctionnelle des segments de l'intestin renforce la **position de premier pilier dans l'arc réflexe métabolique**. Ses informations nerveuses, hormonales sont donc respectivement transmises au nerf vague, constituant de l'axe « intestin-cerveau » et du système porte.

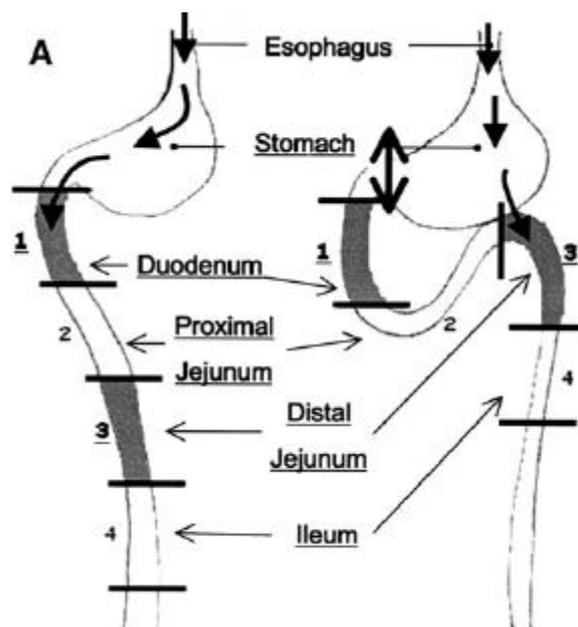


Figure 25 : schéma de la chirurgie AEG. La partie duodénale proximale (1) est obstruée par une ligature et, la partie jéjunale distale (3) est reliée au fundus de l'estomac par lequel le

chyme alimentaire passe. Le bol alimentaire ne passe donc pas par la partie proximale de l'intestin(87)

V- L'axe « intestin-cerveau »

La notion d' « axe intestin-cerveau » s'est développée après la découverte d'un premier système sensible au glucose, le système porte.

1. La communication entre le nerf vague et les centres intégrateurs du cerveau

En 1848, Claude Bernard montre qu'une impulsion électrique du plancher du quatrième ventricule (le tronc cérébral) augmente la glycémie des lapins par une production de glucose hépatique (92) ce qui suggère déjà le concept d'arc réflexe métabolique initié par les cellules nerveuses du cerveau. En 1955, Mayer et coll. proposent que la prise alimentaire puisse être augmentée en présence d'une glycémie basse (93) ce qui sous-entend que le cerveau puisse être sensible au glucose. Puis, Oomura et coll ont mis en évidence, à l'aide de microélectrodes positionnées à la surface de neurones hypothalamiques de rat, qu'il existe différents types de neurones sensibles au glucose (94). En effet, dans le noyau ventro-médian de l'hypothalamus (VMH), considéré comme un centre de satiété, le glucose augmente l'activité nerveuse des neurones, appelés neurones gluco-répondants (95) (Figure 26). Dans le noyau hypothalamique latéral (LH), centre oréxigénique, les neurones répondent par une augmentation de l'activité nerveuse mais aussi, pour une grande partie des neurones, par une inhibition de l'activité électrique via une hyperpolarisation de la membrane (52). Ces neurones sont appelés les neurones gluco-sensibles (Figure 27). La présence de l'ouabaine restaure une activité nerveuse de ces neurones ce qui suggère que ces neurones répondent au glucose par une activation des pompes Na^+/K^+ . En présence de glucose ces pompes participent donc à l'hyperpolarisation de la membrane. Pour d'autres types de neurones aucune variation de l'activité nerveuse n'a été observée en réponse au glucose.

D'autre part Shimizu et coll. montrent que par une injection de glucose dans la branche hépatique du nerf vague, les neurones sensibles au glucose du LH sont inhibés alors que des

neurones insensibles au glucose ne répondent pas (96). De la même manière, Adachi et coll. déterminent les terminaisons nerveuses vagues de la veine porte qui s'acheminent vers le tronc cérébral (97).

Ainsi, il existe un « **glucose sensor** » dans la veine porte qui communique avec les centres **intégrateurs du cerveau** que sont le tronc cérébral et l'hypothalamus, via le nerf vague, appelé le **système porte**.

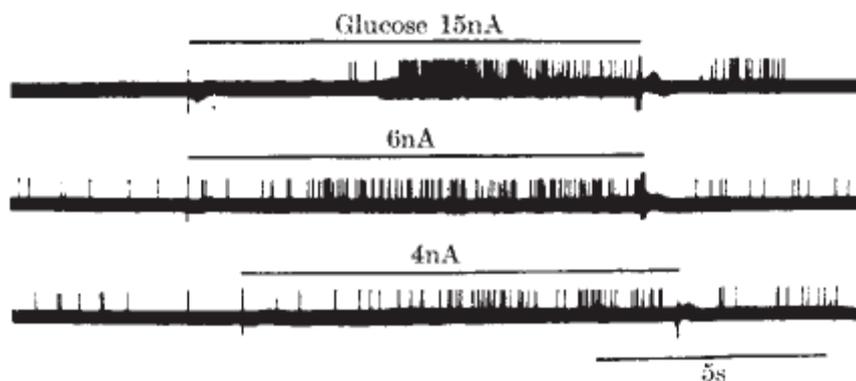


Figure 26: Enregistrements électriques des neurones du VMH après stimulation par différentes concentrations de glucose (15, 6, 4nA). Ce sont des neurones gluco-répondants (95).

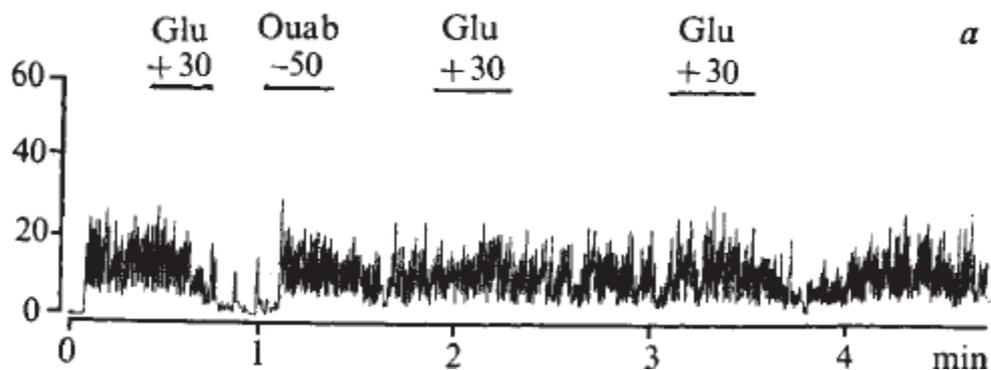


Figure 27 : Enregistrements électriques des neurones du LH après stimulation par du glucose (Glu). Ces neurones répondent par une hyperpolarisation, pour lesquels l'ouabaïne (Ouab) induit une dépolarisation. Ce sont des neurones gluco-sensibles (52).

2. Le système porte, communication entre les cellules sensibles au glucose de la veine porte et les centres intégrateurs du cerveau via le nerf vague.

A la suite des expériences de Shimizu et Adachi (96; 97), la localisation et les mécanismes moléculaires des cellules sensibles au glucose de la veine porte ont été recherchés.

a. Localisation des cellules sensibles au glucose du système porte

En 1997, Hevener et coll. cherchent à localiser le « sensor » hépatique de glucose. Ainsi, ils injectent du glucose dans la veine porte proche de l'hile du foie (surface inférieure du foie, qui reçoit l'artère et la veine hépatique et les autres canaux hépatiques), dans la partie adjacente du foie ou, dans la veine fémorale en guise de contrôle. Seule l'injection de glucose dans la veine porte proche de l'hile du foie inhibe l'activité sympathoadrénérique (98). Le glucose serait donc spécifiquement détecté dans la veine porte.

b. Caractéristiques des cellules du système porte

Sur des préparations de foie isolé, l'activité du nerf vague est inversement proportionnelle à la concentration de glucose injectée dans la veine porte. En effet, la fréquence des impulsions électriques du nerf vague diminue lorsque la dose de glucose augmente (99). L'injection d'un analogue du glucose, le 2 déoxy-glucose, ou d'autres métabolites tels que le D-mannose, le D-fructose, D-galactose ne ralentissent pas l'activité du nerf vague (99) ce qui permet d'affirmer que les cellules de la veine porte sont spécifiquement sensibles au glucose. Ce sont les cellules « glucose-sensor » hépatoportales.

Les « glucose-sensors » pancréatiques et hypothalamiques sont similaires entre eux par certains mécanismes et notamment la présence du transporteur de glucose, GLUT2 (100). Chez des souris invalidées pour le transporteur GLUT2 (KOGLUT2), la perfusion de glucose dans la veine porte n'augmente pas la clairance de glucose qui est observée chez les souris sauvages (6). Le sensor portal de glucose nécessite donc le transporteur GLUT2 et, est, par ce point, similaire aux autres « glucose sensor ». A la lumière des mécanismes du sensor pancréatique, Burcelin et coll. montrent que le système porte est dépendant de l'hormone

intestinale, le GLP-1 (101). En effet, la perfusion intraportale d'un antagoniste du récepteur au GLP-1, l'exendine 9, empêche l'augmentation de la clairance de glucose induite par l'activation des sensors hépato-portaux. Les souris mutées pour le récepteur au GLP-1 (KORGLP1) sont également insensibles à l'activation du « glucose-sensor » portal. Etant donné la faible concentration de GLP-1 circulant, le « glucose sensor » portal serait donc fortement sensible au GLP-1 sécrété par l'intestin, soulignant l'affinité de ce détecteur de glucose pour cette hormone.

c. Fonctions physiologiques du système porte

Afin de comprendre les fonctions physiologiques du système porte, Gardemann et coll. mettent au point un modèle de préparation de foie qui établit un gradient de glucose entre la veine porte et l'artère hépatique (102). Ainsi, pour respecter le gradient de glucose établi lors d'une condition nourrie, la concentration de glucose doit être plus importante dans la veine porte que dans l'artère hépatique. Dans cette condition, l'insuline favorise la capture hépatique de glucose par rapport à la production de glucose, ce qui n'est pas retrouvé lorsque le gradient de glucose est inversé (102).

Dans ce même modèle de gradient de glucose entre la veine porte et l'artère hépatique, la détection portale de glucose permet la capture du glucose par les tissus seulement dans les dix premières minutes pour ensuite laisser place à la capture de glucose par le foie (103).

De plus, chez la souris, lorsque le glucose est perfusé en faible débit uniquement dans la veine porte, la détection portale de glucose induit une hypoglycémie périphérique (104). Cette dernière serait indépendante de la sécrétion d'insuline et de glucagon mais corrélée à une augmentation de la clairance du glucose associée à l'augmentation de la synthèse de glycogène essentiellement dans le muscle, le tissu adipeux brun, et le cœur.

Le **gradient artériovoineux** renseignerait donc **sur l'origine endogène ou exogène du glucose** circulant, et serait donc un indice de **l'état énergétique** de l'organisme. La **détection portale de glucose** serait en étroite relation avec la sécrétion des hormones intestinales telles que le GLP-1 pour générer un **signal d'anticipation** pour la régulation de la glycémie. L'**intestin** semble donc **primordial pour pouvoir interagir avec le système porte**

afin de réguler la glycémie. Le **sensor hépatoportale de glucose** activerait le système nerveux autonome pour transmettre un message aux centres intégrateurs du cerveau afin de **préparer les organes périphériques** à une réponse métabolique adaptée pour la régulation de la glycémie, **indépendamment de l'insuline** (Figure 28).

Il est nécessaire de comprendre les mécanismes intestinaux de détection des nutriments, notamment du glucose et, les sécrétions intestinales qui en résultent.

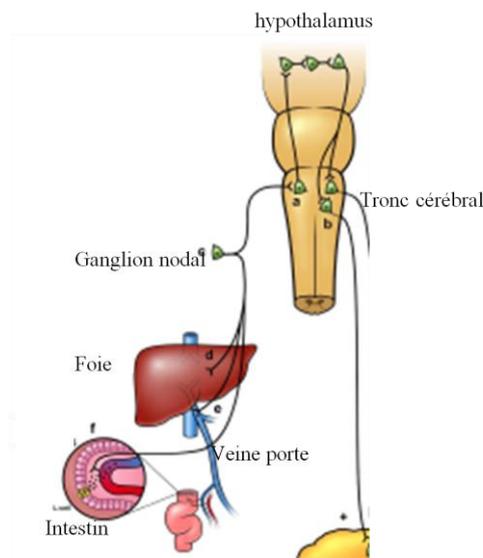


figure 28 : Représentation de l'information nerveuse transmise par le nerf vague. Les terminaisons nerveuses afférentes du nerf vague qui partent de l'intestin et de la veine porte s'acheminent vers dans les noyaux du tronc cérébral puis dans les noyaux de l'hypothalamus pour redistribuer un message nerveux efférent aux organes périphériques (105).

3. Les mécanismes de détection des nutriments par l'intestin

Le duodénum et le jéjunum sont les principales parties absorbatives de l'intestin. Les nutriments sont identifiés puis absorbés par des transporteurs présents sur la membrane apicale des entérocytes et des cellules entéroendocrines. Ils peuvent aussi être détectés par des récepteurs spécifiques localisés sur cette même membrane. La détection des nutriments induit

l'exocytose d'hormones, au pôle basal de la cellule intestinale, qui sont ensuite véhiculées vers la circulation mésentérique puis portale (5; 106) (Figure 29).

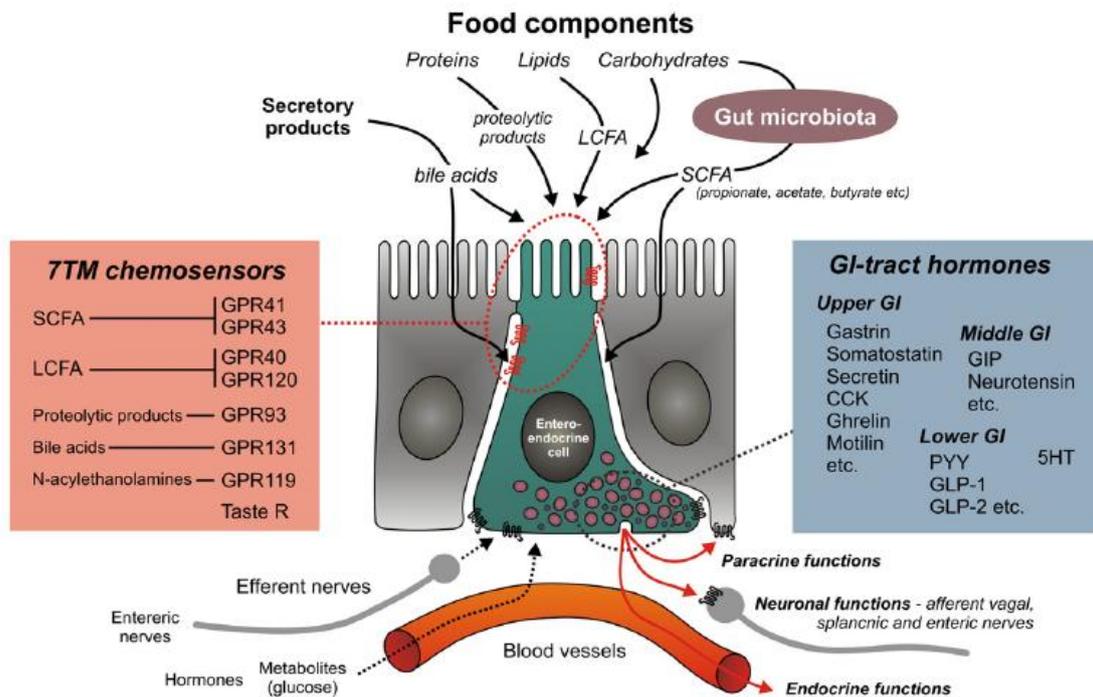


Figure 29 : Détection entérique des nutriments. Les nutriments (protéines, lipides, carbohydrates) sont détectés par différents types de récepteurs à 7 domaines transmembranaires (encadré rose) qui sont présents sur le pôle apical des cellules endocrines. L'activation de ces récepteurs induit l'exocytose d'hormones présentes dans les différentes parties de l'intestin (encadré bleu). Ces hormones sont déversées dans la circulation sanguine et/ou active du nerf vague (106).

a. Transport et détection du glucose

Le glucose pénètre dans les entérocytes et les cellules endocrines par les transporteurs spécifiques présents sur la membrane apicale, les SGLT1 (107). Ce sont des transporteurs de glucose dépendant du gradient électrochimique du sodium. Ainsi, l'inhibition de ce transporteur par la phlorizine diminue l'entrée de glucose dans la cellule (27; 108). Ce

transporteur est donc une étape déterminante et limitante pour les mécanismes cellulaires dépendant de la détection de glucose.

Dans la cellule endocrine, le glucose est métabolisé en ATP. L'augmentation du ratio ATP/ADP ferme les canaux K^+ sensibles à l'ATP ce qui déclenche une dépolarisation cellulaire et l'exocytose d'hormones. Ainsi, sur des cellules exprimant le proglucagon (cellules L), la détection de glucose par SGLT1 augmenterait la fréquence des potentiels d'action de la cellule via la fermeture des canaux K^+ et, induirait alors la sécrétion de GLP-1 (27). Ces mécanismes de détection intestinale de glucose s'assimilent donc aux mécanismes du sensing du glucose pancréatique pour la sécrétion d'insuline (voir A/II.2.a).

L'entérocyte, l'autre type cellulaire qui détecte le glucose, présente des transporteurs au glucose sur son pôle apical et basal, qui sont respectivement SGLT-1 et GLUT2. Les transporteurs au glucose GLUT sont connus pour être une étape clé dans la détection du glucose (4; 6). Pourtant Stumpel et coll. montrent que chez des souris mutées pour le transporteur GLUT2 (GLUT2^{-/-}) la diffusion entérique de glucose est identique à celle des souris sauvages (108). Ceci révélerait que le transport de glucose vers le pôle basal de l'entérocyte est indépendant du transporteur GLUT2 ou qu'il existerait une autre voie de diffusion du glucose. En effet, *in vitro*, ils montrent que le passage transépithélial du glucose nécessiterait la phosphorylation du glucose en glucose 6 phosphate (G6P). Le G6P serait alors transporté par la glucose 6 translocase (G6PT) vers le réticulum endoplasmique (RE). Dans le RE, le G6P est métabolisé en glucose. Ainsi le glucose peut franchir la membrane basale de l'entérocyte par diffusion simple ou par GLUT2 (Figure 30).

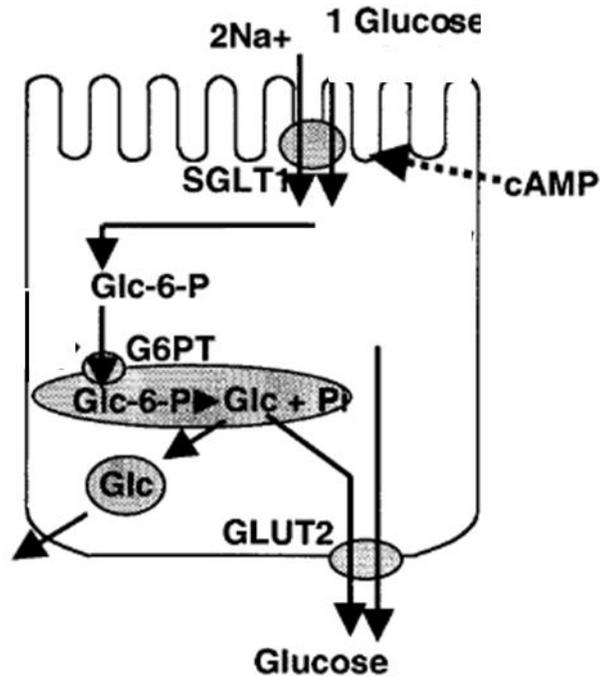


Figure 30: transport et passage transépithélial du glucose dans l'entérocyte. Le glucose entre dans l'entérocyte par le transporteur SGLT1 pour être métabolisé en glucose 6 phosphate (Glc-6-P). Le Glc-6-P est alors véhiculé vers le RE pour être déphosphorylé. Le glucose passe ensuite par le pôle basal de la cellule par le transporteur GLUT2 ou par diffusion simple (modifié d'après (108)).

b. Détection des nutriments par les récepteurs au goût

Les nutriments sont aussi des ligands de récepteurs à sept domaines transmembranaires (7TM), induisant la sécrétion d'hormones (109-111).

Les récepteurs à 7TM sont notamment des récepteurs au goût. Ces derniers sont mis en évidence sur les bourgeons du goût, sur la langue, mais aussi sur toute la longueur de l'intestin. Il existe des récepteurs au goût sucré, les T1R2/3, et au goût amer, les T2R (110). Ces récepteurs sont couplés à des protéines G telles que l' α -gustducin, α -transducin qui activent la sécrétion de Ca^{2+} intracellulaire pour permettre la sécrétion d'hormones (109) (Figure 31). Chez des souris déficientes pour la sous-unité α -gustducin, la sécrétion de GLP-1 en réponse à l'ingestion de glucose ou de lipides serait altérée ce qui suggère leur importance pour la sécrétion des hormones intestinales (112; 113).

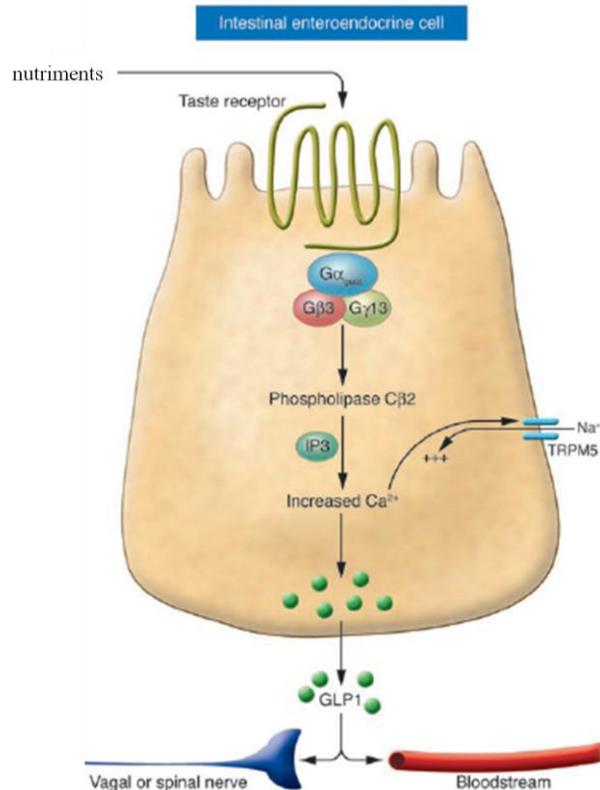


Figure 31 : Les récepteurs au goût dans l'intestin. Les nutriments activent les récepteurs au goût présents sur la membrane apicale des cellules endocrines de l'intestin. Ces récepteurs sont couplés à une protéine G qui active la phospholipase C. Celle-ci permet la production d'IP $_3$. L'IP $_3$ et les canaux Na $^+$ TRPM5 favorisent l'augmentation cytosolique Ca $^{2+}$. Le Ca $^{2+}$ permet alors l'exocytose des vésicules qui contiennent du GLP-1. Le GLP-1 active alors le nerf vague et/ou est déversé dans la circulation sanguine (114).

c. Détection des acides gras

Les acides gras peuvent pénétrer les entérocytes par des transporteurs (voir A/III-1.) mais ils sont aussi le substrat de récepteurs spécifiques qui induiront la sécrétion d'hormones.

Les récepteurs aux acides gras sont des récepteurs qui appartiennent à la famille des récepteurs orphelins, les GRP (115; 116). Ainsi, les principaux récepteurs aux acides gras sont le GRP40, 41, 43 et 119. Ce sont des récepteurs à sept domaines transmembranaires, couplés à une protéine G, localisés dans de nombreux tissus.

Le GRP40 a pour ligand les acides gras saturés et les acides gras à longue chaîne insaturée (117). Il est susceptible d'induire la sécrétion de GIP et de GLP-1 (118).

Le récepteur GRP119 est le plus répandu dans l'intestin. Son ligand l'oléothanolamide (OEA) activerait la sécrétion de GLP-1 via une augmentation d'AMPc intracellulaire (119).

Les mécanismes cellulaires de détection des nutriments restent peu décrits. Et, les mécanismes d'action par lesquels la détection des nutriments, notamment du glucose, est transmise aux fibres afférents du nerf vague restent à élucider. La compréhension de la détection des nutriments reste donc à développer étant donné l'importance de l'intestin dans la régulation de la glycémie.

4. Les hormones intestinales

En plus d'une transmission nerveuse, les hormones intestinales sont un relais d'informations vers le cerveau et le système porte.

a. L'origine de leur découverte

Les hormones intestinales ont été étudiées au début du 20^{ème} siècle et suscitaient déjà un grand intérêt quant à leur rôle sur les fonctions endocrine et exocrine du pancréas (120). D'après la revue « the mechanism of pancreatic secretion », Pawlow et coll. montrent une interrelation entre la sécrétion exocrine du pancréas (suc pancréatique) et l'acidité duodénale (121). En effet, ils constatent que la composition d'un repas influe sur la composition du suc pancréatique, qui modifie alors l'acidité duodénale. Ils suggèrent que les nutriments activeraient différentes terminaisons nerveuses intestinales qui conditionneraient la sécrétion pancréatique.

A l'inverse du raisonnement de Pawlow et coll., Popielski, Wertheimer et Lepage s'interrogent sur l'effet de l'acidité duodénale sur la fonction exocrine du pancréas (121). Sur des chiens, à l'aide d'une canule placée dans le canal pancréatique, ils mesurent le flux qui en

découle. L'injection d'acide chlorhydrique (20c.c à 0,4%) dans le duodénum induit une sécrétion pancréatique. Cependant, en sectionnant le nerf vague et splanchnique de l'intestin, la sécrétion pancréatique est identique à celles des chiens contrôles. De plus, ils remarquent que l'acide n'a pas d'effet propre en systémique. Ces deux observations introduisent le concept de substance véhiculée par la circulation sanguine qui agit sur un organe effecteur, c'est-à-dire de système hormonal. Pour les substances sécrétées par l'intestin, on parle de sécrétine.

L'effet des sécrétines a été caractérisé en injectant le contenu de l'intestin dans la circulation sanguine, pour regarder l'effet sur la sécrétion pancréatique. Les auteurs constatent que l'action du contenu intestinal est dépendante du gradient proximo-distal de l'intestin. A plus long terme, ces hormones ont été découvertes pour leur effet sur la prise alimentaire et la régulation de la glycémie (114; 122; 123).

b. Les différentes hormones

La ghréline est l'hormone sécrétée par les cellules D de l'estomac mais aussi dans le noyau arqué de l'hypothalamus (124). C'est la seule hormone gastro-intestinale oréxigénique. Ses récepteurs sont localisés dans l'estomac et l'hypothalamus. Le taux plasmatique de cette hormone augmente avant un repas, diminue progressivement après celui-ci pour augmenter jusqu'au prochain repas (125).

La cholécystokinine (CCK) est sécrétée par les cellules I du duodénum et jéjunum (122; 123). Les nutriments, spécialement les lipides et les protéines, stimulent la sécrétion de cette hormone. Les deux types de récepteurs CCK1 et CCK2 sont présents sur les terminaisons du nerf vague, dans le tronc cérébral et l'hypothalamus.

L'activation du récepteur CCK1 de l'antrum induit une inhibition du remplissage gastrique. Chez l'homme et différentes espèces animales, la CCK inhibe la prise alimentaire en diminuant la taille des repas sans affecter la prise hydrique.

Le GIP (glucose dependent insulintropic polypeptide) est sécrété par les cellules K. C'est un peptide de 43 acides aminés provenant du clivage d'un prépeptide de 153 acides aminés (126-128). Sa sécrétion est stimulée par les nutriments, notamment le glucose, et les lipides. Le GIP est connu originellement pour inhiber la sécrétion de suc pancréatique et la motilité gastrique. Cependant il est aussi reconnu pour son action insulintropique. En effet, sur les cellules B du pancréas, le GIP en se fixant sur son récepteur, induit l'augmentation de l'AMPc et participerait à l'augmentation de Ca²⁺ intracellulaire pour favoriser la sécrétion d'insuline (126; 129). Il favoriserait aussi la prolifération des cellules B (130) et stimulerait la synthèse des triglycérides dans les adipocytes en activant la lipoprotéine lipase et de la FAS . Le cerveau, le cœur et, les os seraient aussi des cibles du GIP (126).

Ce peptide est dégradé sur sa partie N-terminale par une enzyme la dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV) qui scinde le peptide en un peptide de 41 acides aminés et un dipeptide « Tyrosine-Alanine ». Le GIP serait moins sensible à la DPPIV que le GLP-1(131).

Les cellules L sécrètent différents peptides issus d'un clivage différentiel d'un prépropeptide, le proglucagon. Ces différents peptides sont l'oxyntomoduline, le GLP-2, le GLP-1, ainsi que le PPY (pancreatic polypeptide Y) ([Figure 32](#)).

Le PPY appartient à la famille des peptides pancréatiques tels que le neuropeptide Y (NPY) et le peptide PP.

L'oxyntomoduline est une hormone peu étudiée. Elle pourrait être une nouvelle voie thérapeutique pour le traitement de l'obésité.

Le GLP-2 est un peptide de 32 acides aminés dont le récepteur est principalement situé dans l'intestin (132). Sa principale fonction reconnue est d'inhiber le remplissage gastrique, en modulant la croissance de la muqueuse et la prolifération cellulaire. Le GLP-2 aurait un effet direct et indirect sur le métabolisme puisqu'il est susceptible d'augmenter l'absorption des lipides et la production des chylomicrons (133) et d'accroître la perméabilité intestinale en favorisant le changement de flore bactérienne (134).

Le GLP-1 est une hormone de 30 acides aminés qui inhibe la sécrétion d'acide gastrique, le remplissage gastrique, et la motilité intestinale. Le GLP-1 est surtout reconnu par sa capacité à faire sécréter l'insuline en réponse à l'hyperglycémie, notamment chez des diabétiques de

type II (105; 126; 128; 135; 136) où l'action insulinothrompique du GIP n'est plus efficace. C'est pourquoi son étude est primordiale pour la régulation de la glycémie par rapport au GIP.

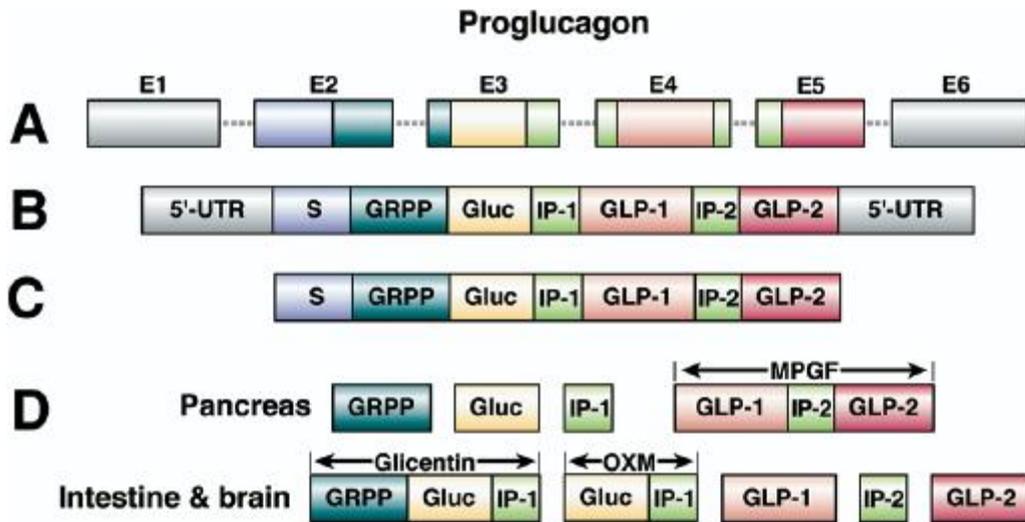


Figure 32 : Le proglucagon. Le gène du proglucagon (A) est composé de 6 exons (E1 à E6) dont le transcrit (B et C) est clivé de manière différentielle selon les tissus. Dans le pancréas la traduction de l'ARNm codant pour le proglucagon génère 4 peptides : le GRPP (Glicentin-related polypeptide), le glucagon (Gluc), l'IP-1 (intervening peptide-1) et le MPGF (major proglucagon fragment). Dans l'intestin et le cerveau, les protéines produites sont la glicentine, l'oxymoduline (OXM), le glucagon like peptide 1 et 2 (GLP-1, GLP-2) et, l'IP2 (126).

VI- Le Glucagon Like Peptide -1, GLP-1

1. Introduction du concept incrétine

Suite à la découverte des sécrétines (voir A/III-4.a.), Best et Basting découvrent l'insuline en 1921 (137). En 1930, une sécrétine qui diminue la glycémie est purifiée. D'après La Barre, cette diminution de la glycémie serait due à la sécrétion d'insuline. En 1932, il introduit donc le nom d' « incrétine » pour une substance prélevée de la partie haute de l'intestin qui induit une hypoglycémie et, qui ne stimule pas la sécrétion exocrine du pancréas (137).

En 1969, Chisholm et coll. montrent que les « sécrétines » et l'insuline augmentent respectivement 5 et 30 minutes après la charge orale en glucose (138; 139). De plus, Michael J. Perley et coll. montrent que, chez des sujets sains, l'administration orale en glucose induit une sécrétion d'insuline plus importante que celle administrée par voie intraveineuse (140). En effet, le taux plasmatique d'insuline est de 70 μ U/ml 30 minutes après l'administration de glucose par voie orale contre 10 μ U/ml lorsque le glucose est administré par voie veineuse. C'est l'effet incrétine (Figure 33). Ce résultat est confirmé par les travaux de Nauck. et coll. qui, lors de clamps isoglycémiques (qui ont pour but d'obtenir une concentration de glucose similaire entre les groupes) , montrent que le taux de peptide C de l'insuline des sujets dont le glucose est administré par voie orale est plus important que celui des sujets dont le glucose est administré par voie veineuse (141). 50 à 70% de l'insuline sécrétée est due à l'effet incrétine.

Le développement des techniques de biologie moléculaire a permis d'identifier des molécules intestinales qui augmentent la sécrétion d'insuline. Ainsi, le GIP et le GLP-1 sont les deux incrétones mises en évidence par leur détermination dans l'extrait d'intestin puis par leur administration intraveineuse qui augmente l'insulinémie en présence de glucose.

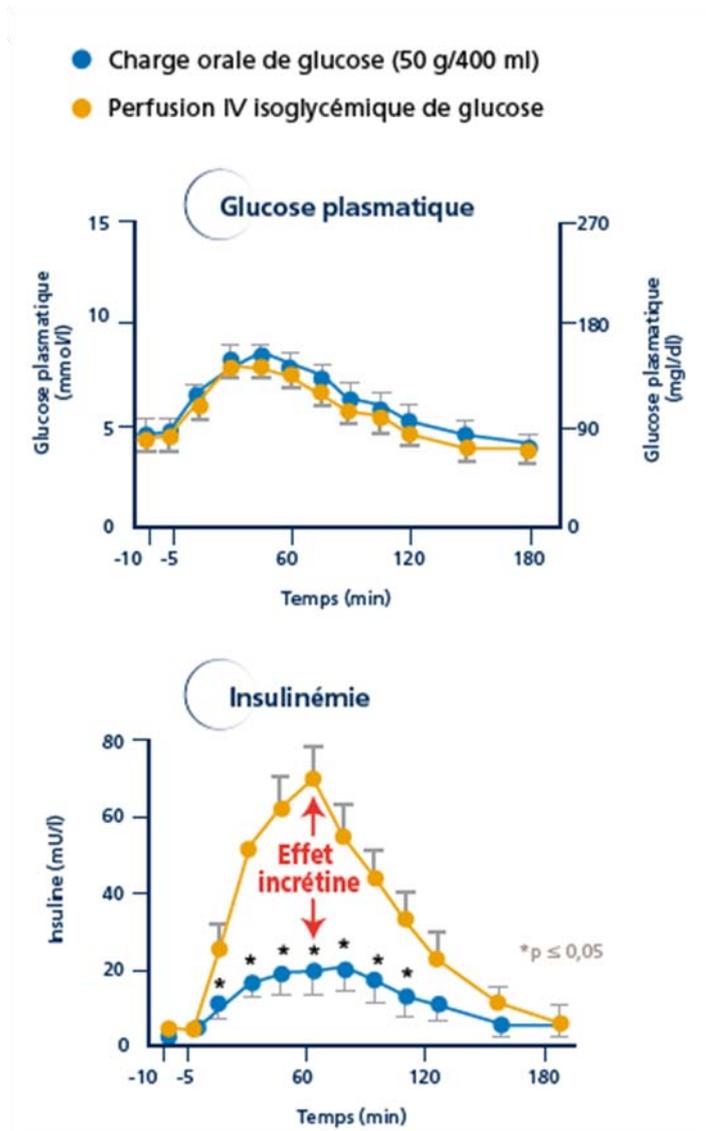


Figure 33 : L'effet incrétine. Pour des glycémies identiques obtenues lors de clamps isoglycémiques (en haut), une charge oral en glucose (jaune) induit une sécrétion d'insuline (en bas) plus importante que administration intraveineuse de glucose (bleu) (142).

2. Identification des cellules sécrétrices de GLP-1

En 1948, Sutherland et De Duve veulent localiser les cellules intestinales qui induisent la sécrétion d'insuline. Ils suggèrent que les extraits intestinaux pourraient contenir du glucagon puisque le glucagon stimule la sécrétion d'insuline (143). Par immunoréactivité pour l'antigène du glucagon, des cellules intestinales distales sont détectées après une prise

orale de glucose. Néanmoins, celles-ci présentent des granules de sécrétions différentes des cellules A du pancréas. C'est pourquoi elles sont appelées les cellules « glucagon Like immunoreactivity », ou cellule L.

La distribution des cellules L varie en fonction des espèces (105). Chez l'homme, elles sont essentiellement distales (iléon, colon proximal) alors que chez la souris elles sont plus proximales et distribuées dans le jéjunum et l'iléon.

3. Synthèse et sécrétion

a. Synthèse

Le GLP-1 est issu du gène codant pour l'expression du proglucagon présent dans les cellules du pancréas, de l'intestin et des neurones (105; 126; 128; 135; 136). Selon les tissus considérés, les proconvertases (PC2 dans le pancréas (144), PC1/3 dans l'intestin) clivent le proglucagon en différents peptides (145) (**Figure 32**). Dans l'intestin, le clivage protéolytique libère le GLP-1, le GLP-2, l'oxyntomoduline et la glicentine.

Le GLP-1 est dans un premier temps un peptide immature de 37 acides aminés. Il est ensuite clivé en une forme active de 30 acides aminés, le GLP-1 (7-37). Ce dernier est en partie tronqué en position 37, composée d'une glycine, pour donner le peptide 7-36. Un groupement amide, par la peptidylglycine α -amidase monooxygénase, est ajouté sur le résidu arginine en position 36 formant alors le GLP-1(7-36)NH₂ (105; 126; 128; 136). Cette maturation augmente la demi-vie du peptide et représente la majorité du GLP-1 circulant (146; 147) (147). Chez l'homme sain et le rat, ces deux formes (7-36) et (7-37) sont biologiquement actives (148) et équipotentes sur leur capacité à induire une sécrétion d'insuline (147). Nous parlerons plus généralement de la forme (7-37).

b. Sécrétion cérébrale de GLP-1

L'ARN messager du proglucagon est transcrit et traduit dans le tronc cérébral (149). Le GLP-1 serait alors sécrété par les terminaisons nerveuses qui se projettent sur les neurones de l'hypothalamus. Ainsi par hybridation in situ, et par co-localisation avec GLUT2, le récepteur

au GLP-1 est localisé spécifiquement dans certains noyaux de l'hypothalamus qui sont les noyaux supraoptique, paraventriculaire, ventromédian et le noyau arqué (150; 151). Cependant le récepteur est aussi situé dans d'autres régions du cerveau telles que le thalamus, le cortex olfactif, le plexus choroïde (152).

La sécrétion du GLP-1 cérébral n'est pas étudiée car il est difficile d'obtenir suffisamment de liquide céphalorachidien nécessaire à son dosage.

c. Sécrétion intestinale du GLP-1

Les nutriments, essentiellement le glucose et les acides gras (153), ainsi que de la taille du repas (154; 155) stimulent la sécrétion de GLP-1.

i. Sécrétion anticipée de GLP-1 par les cellules iléales en réponse à une détection des nutriments dans la partie proximale de l'intestin

In vivo, la sécrétion de GLP-1 est initiée dès les premières minutes d'absorption duodénale et jéjunale des nutriments, alors que les cellules L se trouvent principalement dans la partie distale de l'intestin. Pour expliquer ce phénomène une hypothèse se dessine (156) : il existerait un relais nerveux de la partie proximale de l'intestin vers la partie distale pour stimuler la sécrétion de GLP-1 (157).

Ainsi, sur des cellules d'iléon, ou sur des lignées cellulaires intestinales humaines, une impulsion électrique activerait la sécrétion de GLP-1, via des récepteurs muscariniques M1 et M2, qui sont activés par l'acétylcholine, neurotransmetteur du système nerveux parasympathique (158). Cependant ces résultats ne se retrouveraient pas chez le cochon (159).

D'autre part, chez des rats, l'ablation du nerf vague empêcherait l'activation de la sécrétion de GLP-1 stimulée par une perfusion intraduodénale de lipides (160). En réponse au GIP, la sécrétion de GLP-1 via le nerf vague serait altérée lors de vagotomie. Néanmoins, dans le système porte, le GIP serait inefficace (161). Ainsi, la littérature suggère par les travaux d'une seule équipe que dans le duodénum, la perfusion de lipides induirait une sécrétion de GIP qui activerait donc le nerf vague pour stimuler la sécrétion iléale de GLP-1 (Figure 34).

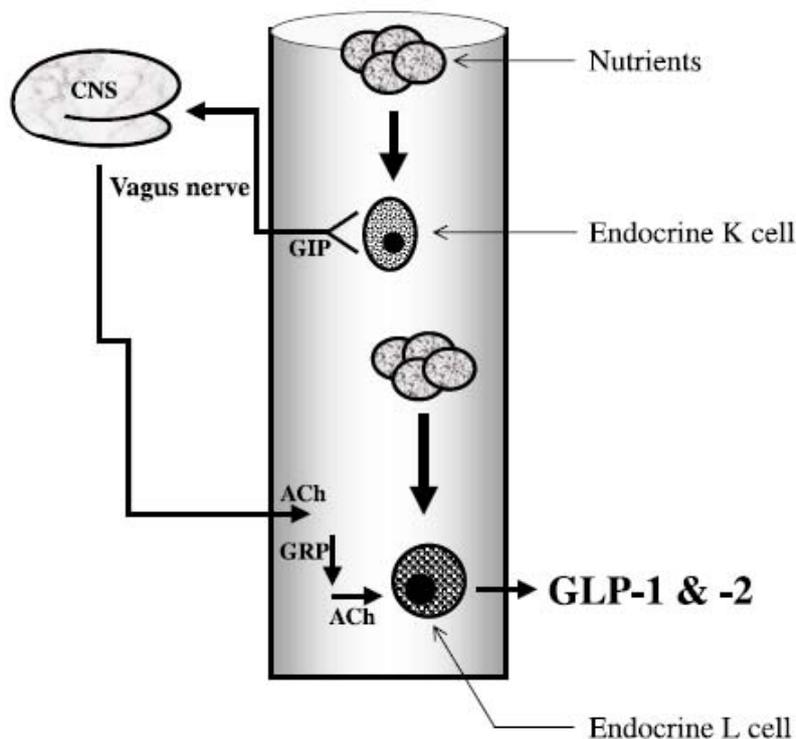


Figure 34 : Mécanisme d'induction de la sécrétion intestinale de GLP-1. L'hypothèse plausible décrite pour la sécrétion de GLP-1 serait que les nutriments détectés dans la partie proximale de l'intestin déclenchent la sécrétion de GIP qui activerait alors le nerf vague. L'information nerveuse serait transmise au cerveau. Le cerveau modulerait un message nerveux aux cellules distales de l'intestin via le nerf vague, qui induirait la sécrétion de GLP-1 (156).

ii. Mécanismes cellulaires d'activation et de contrôle de la sécrétion de GLP-1.

Les études *in vitro* supposent une activation directe de la sécrétion de GLP-1 par le substrat nutritif. Elle est étudiée sur différents types cellulaires que sont les cellules STC-1 (cellule murine), NCI-H716 (cellule humaine) et surtout les GLUTag (162-164). Les lignées cellulaires GLUTag et STC-1 répondraient au glucose par une augmentation cytosolique de Ca^{2+} qui activerait alors la sécrétion de GLP-1.

Sur les cellules GLUTag la sécrétion de cette hormone serait aussi dépendante des canaux K^+ sensibles à l'ATP (153), mais cette idée reste contestée *in vivo* (165). D'autre part, sur ces

cellules le blocage du transporteur de glucose SGLT1, par la phlorizine, inhibe la sécrétion de GLP1. Ceci conforte l'idée que la sécrétion de GLP-1 est dépendante de la présence de glucose (166). De faibles doses de glucose et de fructose détectées par les transporteurs SGLT1 induiraient une fermeture des canaux K^+ sensibles à l'ATP provoquant alors une dépolarisation membranaire nécessaire à la sécrétion du GLP-1 (27; 166).

Un autre mécanisme impliquerait les récepteurs au goût pour favoriser la sécrétion de GLP-1. Ainsi, des cellules dépourvues de la gustucine n'ont pas induit de sécrétion de GLP-1 (112; 167; 168). Cependant ce mécanisme n'est pas retrouvé sur des cellules primaires murines (169).

D'autre part, *in vivo*, en présence de glucose, la sécrétion de GLP-1 est diminuée chez des souris mutées pour le récepteur au GLP-1 (GLP-1R^{-/-}) (170) ce qui suggère une auto-stimulation ou une boucle de régulation de sa sécrétion. De plus, des souris invalidées pour le récepteur au GIP (GIPR^{-/-}) ont une sécrétion de GLP-1 diminuée. Cette expérience étaye l'hypothèse d'un relai nerveux induit par le GIP pour favoriser la sécrétion iléale de GLP-1 (160) (Figure 34,35). Chez le rat, Le GIP pourrait donc avoir une action paracrine et une fonction de neurotransmetteur dans la sécrétion du GLP-1. Néanmoins, chez l'homme et le cochon aucun peptide sécrété par l'intestin n'est connu pour activer la sécrétion de GLP-1, pas même le GIP (159).

A plus long terme, sur des souris mutées pour GLUT2 (GLUT2^{-/-}), le contenu intestinal en GLP-1 est diminué ce qui suggère que le glucose agirait sur la transcription du gène codant pour le proglucagon dans les cellules L (170) .

→La sécrétion de GLP1 pourrait donc se faire **directement** par le glucose sur les cellules L **et indirectement par la détection de glucose** dans le duodénum via la stimulation du nerf vague ce qui relèverait de deux dynamiques, « l'offensive » et « l'anticipation ».

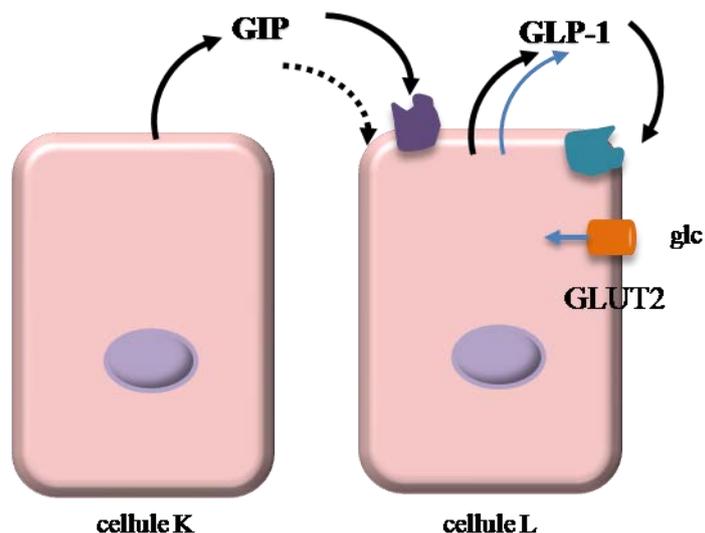


Figure 35 : La sécrétion de GLP-1 est sous le contrôle de différents acteurs moléculaires. Le GIP agit directement via son récepteur (trait plein) ou indirectement (trait haché) sur la cellule L sécrétrice de GLP-1. Le GLP-1 stimulerait sa propre sécrétion. Sur le plus long terme, son transport de glucose (GLUT2) conditionne le contenu cellulaire du GLP-1 (modifié d'après (170)).

4. Le GLP-1 circulant

Chez le rat, le GLP-1 actif, (7-37), serait rapidement sécrété et sa sécrétion plasmatique atteindrait 25 à 50pM. Il serait aussitôt dégradé dans la circulation sanguine dès 2 minutes en GLP-1 (9-37) et (9-36) (131), dont la demie vie de ces peptides serait de 20 minutes. Ces derniers seraient essentiellement éliminés par la clairance rénale (171). Chez l'homme, la sécrétion de GLP-1 serait faite d'oscillations rapides (172) et lors de deux phases : la première 10-15 minutes après la stimulation par le glucose et, la seconde à 40 minutes (126).

Moins de 25% du GLP-1 sécrété dans les vaisseaux mésentériques atteindrait la veine porte et le foie sous une forme intacte. Dans le foie, environ 40 à 50% du GLP-1 serait dégradé (173). Il est donc estimé que seul 10-15% du GLP-1 actif atteindrait la circulation systémique et les organes. Par conséquent, il existe un **gradient en GLP-1 actif** entre la veine hépato-portale et mésentérique dont la nécessité n'est pas démontrée. Ce constat attire

l'attention sur le **rôle de l'enzyme de dégradation du GLP-1 actif, la dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV)**.

5. Dégradation du GLP-1 actif par la DPP-IV et les métabolites générés

La DPP-IV est une glycoprotéine ubiquiste, composée de deux sous unités de 120kDa. La DPP-IV est une serine protéase, connue pour être un marqueur des lymphocytes T, portant alors la dénomination CD26. Elle est retrouvée sur la bordure en brosse des cellules intestinales et rénales, sur les cellules endothéliales et, sous forme libre dans le plasma (174).

La DPP-IV clive les polypeptides contenant un résidu alanine en position antépénultième dans la partie NH₂ du peptide. Ainsi, les formes actives du GLP-1, le GLP-1 (7-37) ou (7-36) intestinal, sont rapidement métabolisées en produit inactifs, le GLP-1(9-37) ou le GLP-1(9-36) et, en un dipeptide, l'Histidine-Alanine (His-Ala) aux fonctions non déterminées (171; 175) (Figure 36).

Gallwith et coll. montrent que le GLP-1 (7-36) est la seule forme affine pour le récepteur au GLP 1 dont le Km est de 10⁻⁹M (148). Seule la partie N-terminale serait nécessaire pour que le substrat soit efficace pour l'augmentation de l'AMPc (148). La dégradation du GLP-1 par sa partie N-terminale génère donc des métabolites inactifs.

En effet, les métabolites GLP-1(9-37) et GLP-1(9-36)NH₂ n'auraient pas d'effet sur la sécrétion d'insuline et de glucagon (176; 177). Néanmoins, des études sur le cochon démontrent que le métabolite (9-36) aurait un effet antagoniste au GLP-1 (7-36) sur le remplissage gastrique (178) mais à des concentrations 100 fois plus élevées et donc pharmacologiques. Il serait aussi capable de diminuer la glycémie par un mécanisme indépendant de l'insuline (179). Il est à noter que le GLP-1 est aussi connu pour avoir d'autres effets qui peuvent influencer le métabolisme à savoir des effets cardio-protecteurs (180; 181).

Ainsi, la dégradation du GLP-1 intestinal par la DPP-IV, servirait seulement à diminuer l'activité de cette hormone puisque les métabolites générés ne semblent pas avoir d'actions périphériques. **L'efficacité du GLP-1 serait-elle dépendante d'un gradient de GLP-1 actif généré par l'activité de la DPP-IV ?**

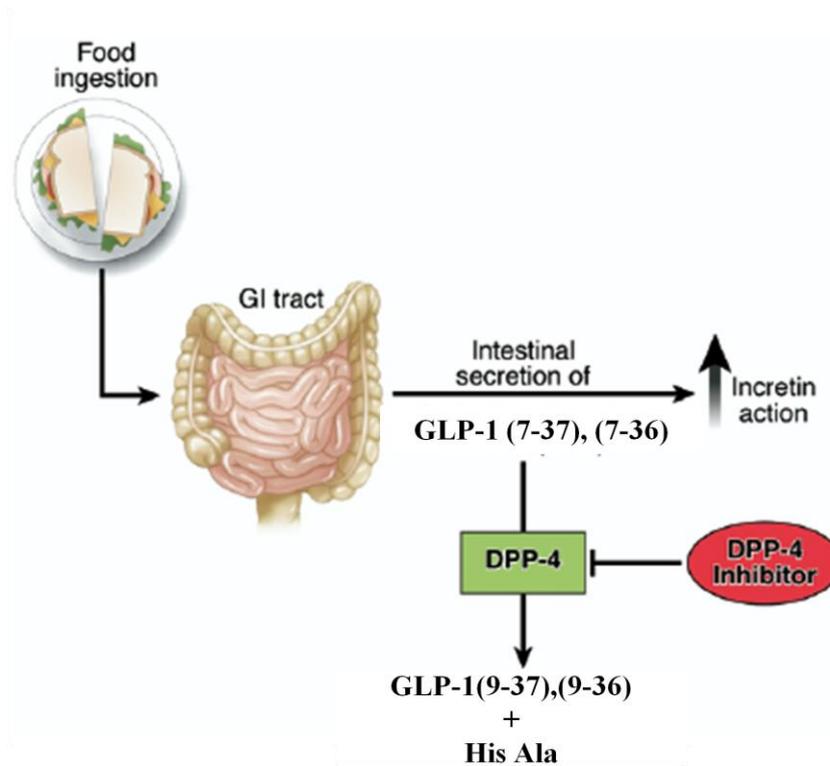


Figure 36: Dégradation du GLP-1 (7-37). La DPP-IV dégrade les formes actives du GLP-1, (7-37) et (7-36), en deux métabolites, le GLP-1(9-37) ou (9-36) et, un dipeptide l'His Ala (histidine- alanine) (modifié d'après (126)).

6. Le récepteur au GLP-1

Le récepteur au GLP-1 est un récepteur à sept domaines transmembranaires, couplé à une protéine G (182; 183). Il a été cloné par Thorens B. et coll., à partir d'îlots de pancréas (184; 185). La structure murine du récepteur est identique à 90% avec la structure en acide aminé du récepteur humain.

Des études d'hybridation *in situ* de l'ARNm ou de binding utilisant le GLP-1 radiomarqué (I^{125} GLP-1), ont permis de localiser le récepteur dans plusieurs tissus dont le pancréas (184; 185), le cœur (186), l'estomac (186), le cerveau (152) et, les fibres afférentes du nerf vague du tube digestif (187). La localisation du récepteur dans le tissu adipeux (187), le foie (188) et les muscles (189) est contestée.

7. Les effets biologiques du GLP-1

Les effets du GLP-1 sont multiples et résumés dans la figure 37. Néanmoins sont-ils tous justifiés étant donné la demi-vie courte du GLP-1 ? Impliquent-ils un effet direct ou indirect du GLP-1 ?

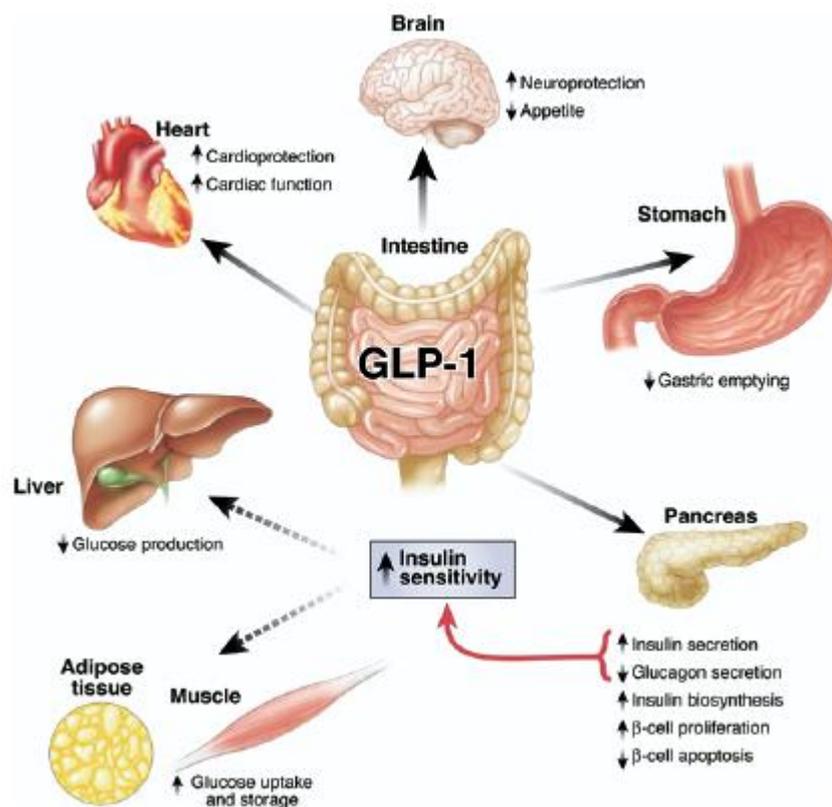


Figure 37: Effets du GLP-1 décrits à partir d'études *in vitro* et/ ou *in vivo* (126).

a. Effets directs du GLP-1 sur différents tissus

Le GLP-1 agirait par effet direct sur certains organes. Sur l'intestin, le GLP-1 réduirait le flux lymphatique, l'absorption des triglycérides et la production des lipoprotéines (190). *In vitro*, sur une lignée cellulaire d'adipocytes (3T3) (191) et de myocytes (192), le GLP-1 stimulerait le métabolisme glucidique induit par l'insuline. Sur les hépatocytes isolés, le GLP-1 activerait le stockage de glucose en activant la glycogène synthase (193) et la néoglucogenèse (194). *In vivo*, sur des chiens, l'infusion de GLP-1 dans la veine porte ou périphérique induit une augmentation de la capture de glucose et de la synthèse de glycogène dans le foie indépendamment de l'insuline (195).

La plupart de ces effets directs du GLP-1, cités ci-dessus, sont donc des études *in vitro* qui devraient être validées par des études *in vivo*. L'effet direct du GLP-1 le plus reconnu est son effet insulinothrompique sur la cellule B du pancréas.

b. Effets direct du GLP-1 sur les îlots du pancréas.

i. Effet sur la sécrétion d'insuline

Le GLP-1 est connu essentiellement pour sa fonction insulinothrompique intégrée dans le concept incrétine (voir A/ IV- 1). En condition d'hyperglycémie obtenue lors d'un clamp, une injection intraveineuse d'un analogue du GLP-1, l'exendine 4, augmente l'insulinémie (196; 197) dont l'effet est contrecarré par un antagoniste du GLP-1, l'exendine 9 (198).

Son effet se définit selon au moins deux critères : dépendant de la concentration de glucose puisque l'effet insulinothrompique du GLP-1 est amplifié pour des charges intraveineuses croissantes de glucose (141) et ; pulsatile décrit sur des îlots pancréatiques de rat perfusés et chez l'homme (199).

Le GLP-1 agirait directement sur la cellule B du pancréas en se fixant à son récepteur pour activer l'adényl cyclase (200). Ainsi, il agirait en augmentant la sensibilité au glucose de la cellule B. Le GLP-1 favoriserait la sensibilité au glucose pour stimuler la fermeture des canaux K⁺ sensibles à l'ATP. Il permettrait alors l'entrée des ions Ca²⁺ dans la cellule et,

agirait sur la sécrétion de Ca^{2+} provenant du réticulum endoplasmique via la phosphorylation de la PKA (105) (Figure 38). Le GLP-1 activerait aussi la transcription du gène codant pour l'insuline (200; 201).

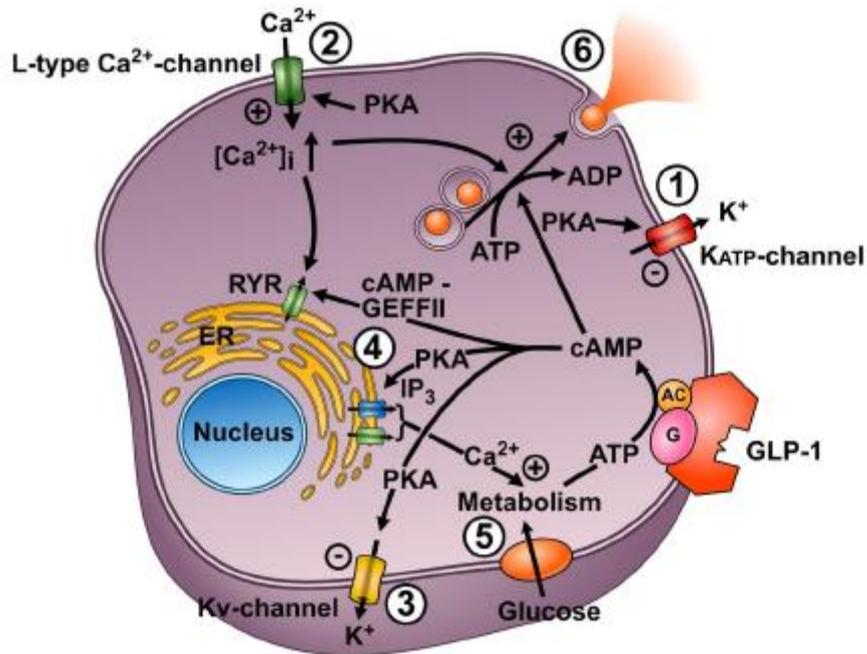


Figure 38: Voie de signalisation induite par le GLP-1 sur la sécrétion d'insuline. La fixation du GLP-1 sur son récepteur, présent sur la cellule B du pancréas, active l'adénylate cyclase (AC) qui induit une cascade moléculaire dont les principaux évènements sont la fermeture des canaux K_{ATP} (1), l'activation des canaux Ca^{2+} (2), la fermeture des canaux K^+ (voltage dépendant) (3), et la libération de Ca^{2+} du ER (réticulum endoplasmique) (4). Conjointement à l'effet du GLP-1, et de manière indissociable, le glucose est métabolisé (5) pour permettre la sécrétion de l'insuline (6) (105).

ii. Effet sur la sécrétion de glucagon

Le GLP-1 inhibe la sécrétion de glucagon en condition nourrie ou de clamp hyperglycémique (202).

La présence du récepteur au GLP-1 sur les cellules A du pancréas n'a pas été clairement démontrée. Il serait exprimé sur 20% de cellules du pancréas dispersés dans les

îlots (203; 204) mais induisant des effets controversés. *In vitro*, le GLP-1 induirait donc une augmentation du Ca^{2+} intracellulaire nécessaire à la sécrétion du glucagon (203). D'un autre côté, sur des îlots isolés de pancréas de rat, le GLP-1 inhiberait la sécrétion de glucagon via l'activation du récepteur à la somatostatine (205).

In vivo, l'inhibition de la sécrétion du glucagon par le GLP-1 est étudié essentiellement chez les sujets atteints d'un diabète de type I qui présentent une hyperglycémie (24). Chez ces sujets, dépourvus de cellules B fonctionnelles, un traitement au GLP-1 induit une diminution la glycémie à jeun en inhibant la sécrétion de glucagon (206) ainsi qu'une diminution de la sécrétion de glucagon en condition nourrie (207). Le GLP-1 agirait donc indirectement, par activation du nerf vague et donc de l'« arc réflexe métabolique » (24). En effet, la présence du récepteur au GLP-1 sur le système porte et le nerf vague ainsi qu'à sa courte demi-vie assoient cette hypothèse. .

iii. Effet protecteur du GLP-1 sur les cellules pancréatiques

En plus d'amplifier l'expression de gènes codant pour des intermédiaires de la signalisation de l'insuline, tels que l'IRS, le GLP-1 et ses analogues peuvent améliorer la prolifération. Ils transactiveraient le récepteur à l'EGF (epidermal growth factor) (Figure 39). Ce dernier activerait alors une PI3K qui permettrait par cascade moléculaire d'activer des facteurs pancréatiques favorable à la prolifération à la survie de la cellule B ainsi qu'à l'amélioration de la signalisation de l'insuline (208). Ainsi pdx-1 (duodenal homeobox gene-1) est un facteur de prolifération activé par le récepteur à l'EGF, stimulé par le GLP-1. Cet effet est retrouvé *ex vivo* sur des cellules progénitrices situées dans le canal pancréatique (209; 210).

Ces effets protecteurs du GLP-1 ont été aussi reportés par application de ses analogues. Ils inhiberaient aussi l'activation de facteurs de transcription pro-apoptotiques tels que FOXO1 (208). De la même manière les inhibiteurs de la DPP-IV retarderaient la mort cellulaire du pancréas et favoriseraient la prolifération et la sécrétion d'insuline (208; 211).

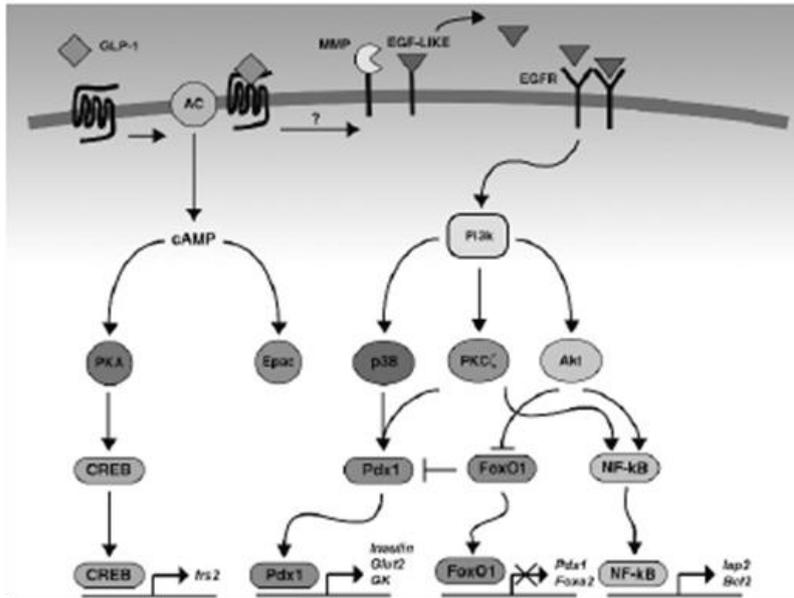


Figure 39 : Le récepteur au GLP-1 sur la cellule B du pancréas active l'adényl cyclase (AC) qui active alors une PKA ou la voie de l'Epac. L'activation de la PKA conduit à l'activation du facteur de transcription CREB. Le récepteur au GLP-1 transactive aussi le récepteur à l'EGF. Ce dernier active alors une PI3K qui active différents facteurs de transcription tels que Pdx1, NF-kB et, inhibe FoxO1.

c. Effet du GLP-1 cérébral sur les neurones de l'hypothalamus

De faibles doses de GLP-1, injectées dans le cerveau, diminuent l'appétit et la prise alimentaire (212; 213) alors que l'effet de satiété du GLP-1 sécrété par l'intestin reste flou (105). Les mécanismes par lesquels le GLP-1 cérébral conditionne la satiété ne sont pas largement explicités mais des travaux du laboratoire ont mis en évidence le rôle du GLP-1 cérébral dans la régulation de la glycémie.

Ainsi, un agoniste du GLP-1, l'exendine 4, injecté dans le troisième ventricule, augmente la sécrétion d'insuline en condition de clamp hyperglycémique, pour lequel la glycémie est stabilisée à 20mM (214). Je noterai que l'effet du GLP-1 cérébral s'assimilerait donc à l'effet du GLP-1 sécrété par l'intestin qui est insulinosécrétagogue (140). Seuls les neurones du noyau arqué de l'hypothalamus, qui regrouperait 68% des récepteurs au GLP-1, pourrait réguler la sécrétion d'insuline et la glycémie (215).

Lors d'un clamp hyperglycémique hyperinsulinémique avec du glucose radiomarqué, la perfusion intracérébroventriculaire d'exendine 4 augmenterait la synthèse de glycogène dans le foie au dépend des muscles (214). L'action du GLP-1 est relayée par un message nerveux puisque cet effet ne se retrouve plus lorsque les muscles sont dénervés. Comme le foie est un organe de stockage de l'énergie, ce mécanisme d'action induit par le GLP-1 cérébral peut être interprété comme une préparation de l'organisme à une réserve d'énergie jusqu'au prochain repas.

Dans un second temps, Knauf et coll. mettent en lien la détection de glucose entérique et l'effet du GLP-1 cérébral (85). En effet, des souris qui reçoivent une solution de glucose dans l'estomac et, qui sont perfusées dans les ventricules latéraux par l'antagoniste du GLP-1, l'exendine 9, présentent une diminution la synthèse de glycogène hépatique aux dépends des muscles par rapport à des souris témoins. La détection intestinale de glucose qui émet un message aux centres intégrateurs du cerveau, serait donc dépendante du récepteur au GLP-1 situés sur les noyaux de l'hypothalamus pour favoriser l'utilisation du glucose par les tissus périphériques (85).

8. Une demi-vie courte du GLP-1 et des effets pléthoriques ?

Le GLP-1 a donc de nombreuses fonctions métaboliques pour le contrôle de la glycémie. Néanmoins, dès les premières minutes de détection intestinale des nutriments, il est sécrété dans la circulation mésentérique et très rapidement dégradé. Comment le GLP-1 peut-il avoir ces effets pléthoriques en ayant à priori un champ d'action restreint à l'intestin et la veine porte?

L'explication la plus plausible serait que le GLP-1 agirait par effet paracrine sur l'intestin et la veine porte pour recruter l'axe « intestin cerveau ».

a. Effet indirect du GLP-1 sur la sphère gastro-intestinale

Dans la sphère entéro-gastrique, le GLP-1 inhiberait indirectement la motilité gastrique, la vidange et les sécrétions gastriques ce qui concourent à augmenter le volume de l'estomac. Les mécanismes d'action du GLP-1 sur l'estomac sont peu connus. Le GLP-1 activerait les

récepteurs α_2 adrénergiques du nerf vague. Cette activation nerveuse nécessiterait un relais cérébral (216; 217).

b. Effet indirect du GLP-1 sur le pancréas

En plus d'un effet supposé direct sur les cellules B du pancréas, l'effet insulinothrompique du GLP-1 serait aussi induit par une activation du nerf vague. Ainsi, sur des rats, lorsque l'activité du nerf vague est inhibé par un agent pharmacologique, la chlorisondamine, le GLP-1 injecté dans la veine porte n'induit plus une augmentation de la sécrétion d'insuline (218).

Ainsi, il est donc suggéré que le GLP-1, sécrété dans la *lamina propria* de l'intestin agit via « l'arc réflexe métabolique » (105).

9. Comment le GLP-1 endogène peut-il être étudié?

Les études présentées jusqu'ici sont réalisées grâce à l'utilisation du GLP-1 natif ou d'un agoniste du récepteur, l'exendine 4. Ces outils biochimiques contrecarrent le problème de la dégradation du GLP-1 mais biaisent l'étude de son activité endogène.

L'utilisation de l'antagoniste du récepteur au GLP-1, l'exendine 9, est donc un outil pour déterminer l'effet du GLP-1 endogène. Je soulignerai qu'*in vitro* il est défini comme un agoniste inverse puisqu'il induit un effet propre, à savoir une diminution de l'AMPc (219).

Les inhibiteurs de DPP-IV sont des nouveaux outils pharmacologiques qui peuvent nous aider à mieux comprendre le mode d'action du GLP-1 endogène. En effet, ils augmentent la demi-vie du GLP-1 endogène activé par une charge orale de glucose ce qui induit une augmentation de sa concentration active au moins dans la veine porte. Ceci permet d'étudier les fonctions paracrine et endocrine du GLP-1, respectivement dans la sphère entéro-portale et le sang systémique dans un contexte qui se rapproche de la physiologie.

VII- Le GLP-1 endogène étudié grâce aux inhibiteurs de la DPP-IV

1. Les substrats de la DPP-IV

En 1993, il est démontré que les principales incrétines (GIP et GLP-1) sont clivées par la DPP-IV (174). Cependant la DPP-IV a de nombreux substrats qui se classent en deux groupes. Certains substrats sont impliqués dans le métabolisme comme le GLP-1, le GIP, NPY... D'autres sont des substrats qui ont des fonctions immunitaires telles que l'aprotinine, IL1-B, IGF-1.... (220; 221) (Figure 40).

La DPP-IV (ou CD26) serait aussi nécessaire pour le recrutement des cellules progénitrices et des cellules souches hématopoïétiques chémoattractantes en agissant sur un facteur, le CXCL12 (222).

Peptides à effets métaboliques	Peptides sans effets métaboliques
GLP-1	GRP
GLP-2	Bradykinine
GIP	IL-2
Glucagon	IL-1β
GRH	IGF-I
NPY	Prolactine
PYY	Trypsinogène
Substance P	HCG
RANTES	Aprotinine
PACAP	

Figure 40 : Les substrats de la DPP-IV sont des peptides avec (jaune) ou sans (blanc) effets métaboliques (modifié d'après (220)).

La dégradation des substrats de la DPP-IV induit une perte de fonction pour certains substrats tels que le GLP-1, le GIP. En revanche, la scission du neuropeptide Y (NPY) par la DPP-IV induit un métabolite actif, le polypeptide Y (PPY). (220).

2. Les différents inhibiteurs pharmacologiques de la DPP-IV

De nombreux inhibiteurs de la DPP-IV ont été développés comme la valine pyrrolidine, la sitagliptine, la vildagliptine (223) (Figure 41). Ces molécules agissent par inhibition compétitive avec 80 à 90% d'efficacité (223; 224).

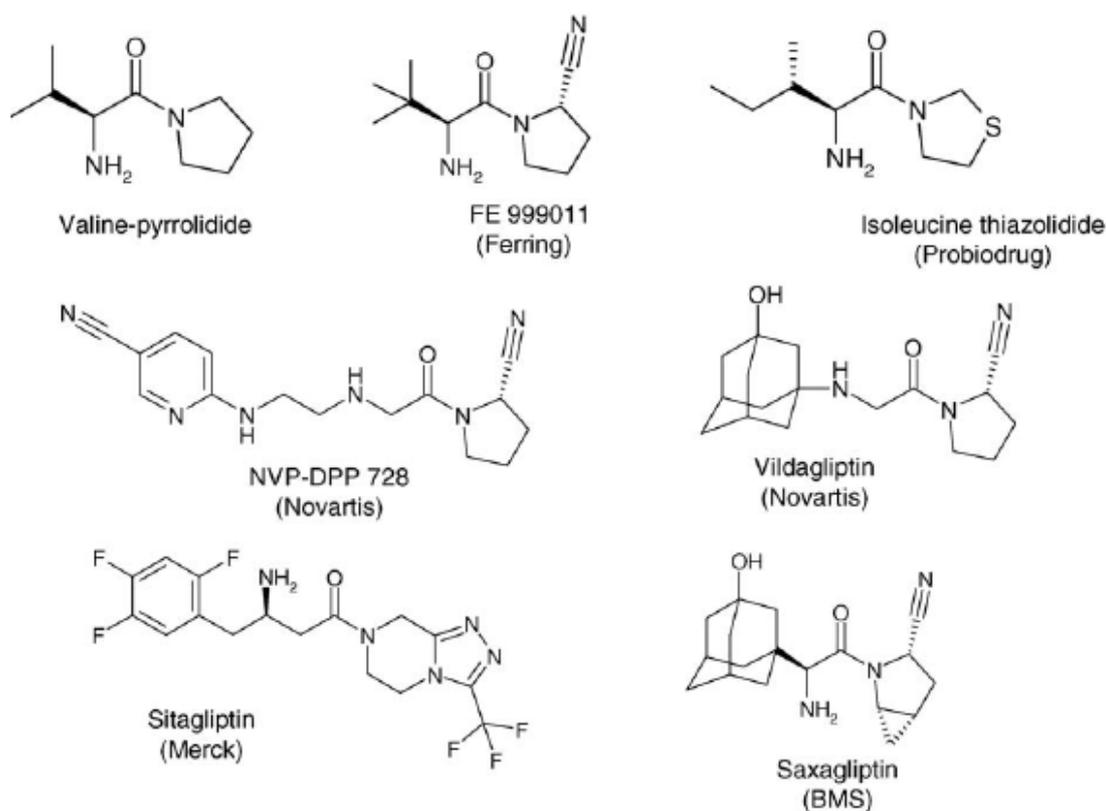


Figure 41 : Présentation des différents inhibiteurs de DPP-IV (223).

3. Les effets du GLP-1 actif endogène mis en évidence par les inhibiteurs de la DPP-IV

Lors d'un repas test, l'administration par voie orale d'un inhibiteur de la DPP-IV augmente la concentration plasmatique du GLP-1 actif dans une proportion physiologique de 2 à 4 fois la valeur témoin. L'effet endogène du GLP-1 sur la régulation de la glycémie peut donc être étudié. Ainsi chez des souris femelles, nourries pendant 3 à 4 mois par un régime standard, l'injection par voie orale de valine pyrrolidine augmente la sécrétion d'insuline lors des 30 premières minutes et de manière concomitante à l'augmentation de GLP-1 plasmatique (225) (Figure 42). Cette augmentation de l'insuline plasmatique expliquerait l'amélioration de la tolérance au glucose ce qui conforte le concept incrétine. Cet effet insulinothéropotentialisé par l'inhibiteur de DPP-IV est retrouvé chez les cochons anesthésiés (226).

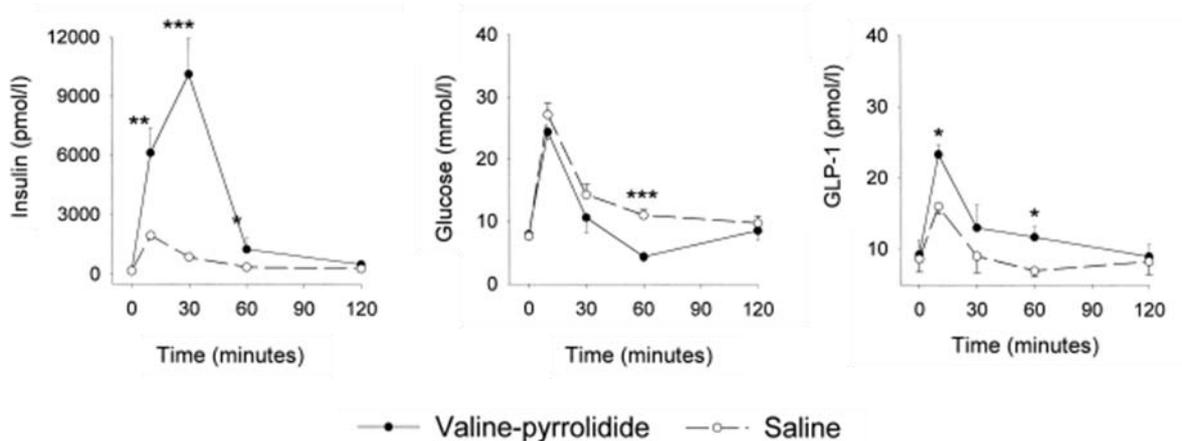


Figure 42 : Sur des souris femelles, effet de l'inhibiteur de DPP-IV, valine pyrrolidide, sur l'insulinémie, la glycémie et la concentration de GLP-1 plasmatique suite à une charge orale en glucose (225).

De la même manière, la tolérance au glucose est améliorée chez des souris femelles mutées pour CD26 (CD26^{-/-}) et elles présentent aussi une augmentation de la concentration de GLP-1 et de l'insuline plasmatique (227) (Figure 43).

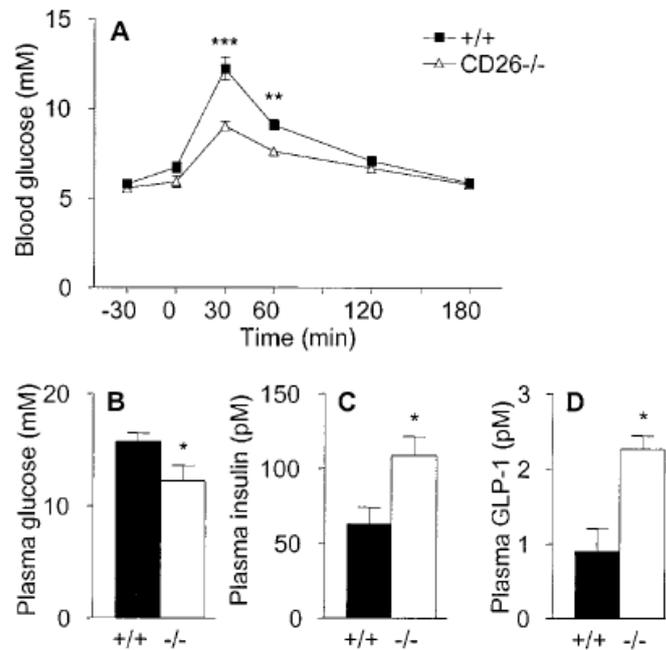


Figure 43 : Sur des souris CD26^{-/-}, une charge orale en glucose diminue la glycémie, augmente l'insulinémie et le GLP-1 plasmatique (227).

Je noterai que Drucker et coll. mettent en évidence que, sur des souris mâles âgés de 6 semaines, lors d'un clamp hyperinsulinémique hyperglycémique réalisé par voie intraveineuse, l'injection de sitagliptine, administrée par voie veineuse, augmente l'inhibition de la PEG à l'inverse de l'exendine 4 (228) (Figure 44). Ce résultat suggère que la sécrétion de GLP-1 dans la veine hépato-portale (ce qui n'est pas restaurée par l'agoniste) est nécessaire au contrôle de la production endogène de glucose. Cet effet pourrait être du au contrôle de la sécrétion de glucagon.

Ce résultat montre aussi la différence d'effet entre les agonistes du GLP-1 et l'effet du GLP-1 endogène sous forme active. Je relèverai que la sécrétion de GLP-1 intestinal est dépendante d'une stimulation entérique par le glucose. Ce résultat suggère donc que la sitagliptine régulerait la glycémie indépendamment d'une sécrétion de GLP-1 intestinale. Une autre hypothèse serait que lors du clamp réalisé pendant trois heures, qui n'est pas la condition

expérimentale qui se rapproche le plus de la physiologie, le glucose qui a atteint les veines mésentériques a pu stimuler une sécrétion entérique de GLP-1.

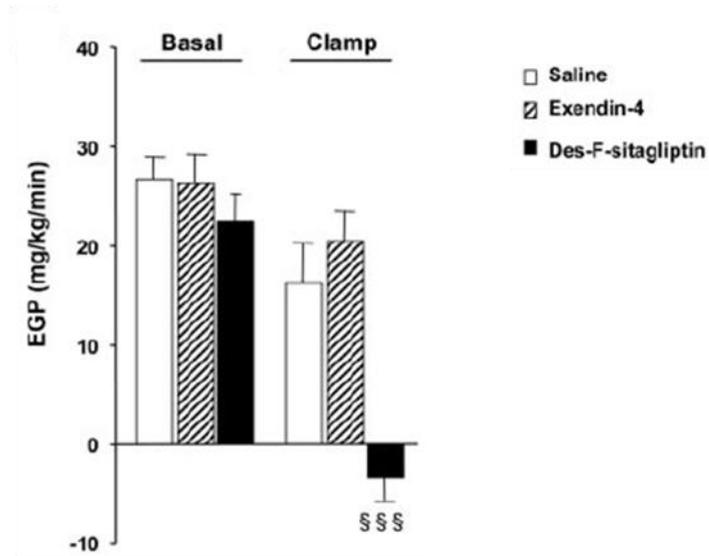


Figure 44: sur des souris males C57/Bl6, lors d'un clamp hyperglycémique hyperinsulinémique, l'exendine 4 n'augmente pas la production hépatique de glucose (EGP) à la différence de la des-F-sitagliptin qui la diminue de 100% (228).

→ Ainsi, le GLP-1 endogène aurait bien les effets décrits par ses analogues et cautionne bien l'utilisation des inhibiteurs de DPP-IV à des fins thérapeutiques notamment pour le traitement du diabète de type II.

B/ Physiopathologie : le diabète de type II

Le diabète de type II a été caractérisé par l'OMS comme étant une pandémie mondiale. En effet, de 1958 à 1998, il est estimé que le nombre de sujets présentant un diabète de type II est passé de 1,5 million (1% de la population) à 10,5 millions. En France, en 1998,

entre 1,2 et 1,5 millions de personnes ont un diabète de type II. Les spécialistes estiment que dans les années 2000 -2025, 150 à 300 millions de personnes seraient atteintes de ce désordre métabolique (229). Cette prévalence alarmante serait en partie liée à l'allongement de la durée de vie et à l'augmentation de la population vieillissante (60% des diabétiques ont entre 55 et 75 ans).

I- Définition et caractéristiques du diabète

1. Définition

Le diabète de type II est selon l'OMS une maladie chronique qui apparaît lorsque le pancréas ne produit pas suffisamment d'insuline ou que l'organisme n'utilise pas correctement l'insuline qu'il produit.

2. Diagnostique et complications

Le diagnostic du diabète de type II est établi lorsque la glycémie à jeun est, à deux reprises consécutives, supérieure à 1,26 g/L ou, lorsqu'une **hyperglycémie** est maintenue suite à un repas standardisé. Cette hyperglycémie est due à une association, en combinaison variable, d'un défaut de l'action et de la sécrétion d'insuline. Une insulino-résistance et une insulino-sécrétion inappropriée à l'hyperglycémie sont les caractéristiques principales du diabète.

A long terme, le diabète de type II se caractérise par la présence de glucose dans les urines, dit « diabète sucré ». Ce symptôme suggère que l'hyperglycémie est constante et présage d'une atteinte possible d'autres organes pour lesquels des complications telles que la rétinopathie (perte de la vue), la neuropathie périphérique et centrale, la néphropathie, la micro et macroangiopathie et les maladies cardiovasculaires (l'hypertension, l'athérosclérose) peuvent se développer. D'autre part, le diabète de type II est souvent associé à une prise de poids excessive caractérisant alors une obésité sans que l'on ne sache lequel des deux facteurs (diabète ou obésité) en est la cause ou la conséquence.

3. Origines de la pathologie

a. Génétique

Des facteurs génétiques seraient susceptibles d'induire un diabète de type II. Des gènes tels que la séquence codante pour le récepteur à l'insuline, la leptine, ou des enzymes de la glycolyse (glucokinase), ainsi que des facteurs de transcription (HNF), seraient à l'origine du développement du diabète de type II (230; 231). Il est estimé que dans l'ensemble du génome 10% des gènes pourraient être impliqués dans le développement de cette maladie (232).

Par exemple, la glucokinase (GK) dans le pancréas et le foie est une enzyme clé régulatrice de la glycolyse (233). Une mutation de ce gène peut être détectée dès la naissance. Lorsqu'une hétérozygotie de ce gène est exprimée, l'enzyme GK est inactive et, l'individu présente alors une hyperglycémie ou une hypoglycémie (234). Une mutation homozygote peut entraîner un phénotype plus sévère. Les mutations du gène de la GK sont réparties aléatoirement sur l'ensemble du gène et, sont non communes entre individus ce qui peut rendre difficile le diagnostic de ce gène.

Associées aux causes génétiques le rôle de l'environnement est non seulement important mais devient capital compte tenu du changement d'habitudes alimentaires.

b. Environnementales

i. La flore bactérienne

Présentation

Une des nouvelles causes environnementales actuellement mise en exergue est l'impact de la flore bactérienne sur la modulation de l'équilibre glucidique.

La flore bactérienne intestinale s'acquière dès les premiers mois et jusqu'aux deux premières années qui suivent la naissance. A l'âge adulte la diversité de la flore intestinale est stable et

unique pour chaque individu. Celle-ci est cependant sujette à de nombreuses influences telles que l'antibiothérapie, et bien sur l'alimentation.

Les expériences clés qui ont mis en évidence le rôle de la flore dans le contrôle de l'homéostasie énergétique sont celles développées par l'équipe de JI Gordon. Ils démontrent que des souris dépourvues de flore intestinale, dites axéniques, ont une meilleure tolérance au glucose avec une consommation énergétique supérieure (235). Des souris axéniques qui ont été recolonisées par une flore intestinale de souris nourries par un régime standard, ont une augmentation de 60% de leur tissu adipeux (236). Ainsi, la flore bactérienne serait un des premiers gestionnaires de l'énergie ingérée qui conditionnerait alors la glycémie.

Ces études me permettent de soulever quelques questions : chez des souris axéniques, l'intestin doit subir un remodelage structurel (jonction, nombre de cellules...) et fonctionnel (transport, endocytose, exocytose..) de ses différentes populations cellulaires (les cellules épithéliales, immunitaires ou nerveuses) qui doit avoir un effet propre sur la modulation de la glycémie. La recolonisation d'un intestin par une flore bactérienne retrouve-t-il les mêmes fonctions métaboliques qu'un intestin témoin ? Ce qui revient à déterminer quelle est l'acteur le plus conséquent sur la régulation de la glycémie : la modulation de la flore ou de l'intestin ?

Mécanisme

Un des modes d'action des bactéries sur l'organisme serait la sécrétion dans le sang de facteurs hautement inflammatoires, les lipopolysaccharides (LPS). Par fixation à leur récepteur CD14/TLR4 sur les cellules immunitaires telles que les macrophages, les LPS induisent la sécrétion de cytokines inflammatoires et favorisent l'insulinorésistance (237) (238) (Figure 45).

Traitement

Un des moyens de moduler la flore bactérienne est l'utilisation des prébiotiques et des probiotiques. Ainsi, l'utilisation de prébiotiques composés d'oligofructoses améliorent la tolérance au glucose et à l'insuline (239). Ils induisent aussi une augmentation de l'expression

et de la sécrétion de GLP-1. En présence de l'antagoniste du récepteur au GLP-1, l'exendine 9, les oligofructans ne diminuent plus la glycémie chez des souris diabétiques (239-241). Il existerait donc une étroite relation entre le GLP-1 et les sécrétions d'origine bactérienne.

La composition de l'alimentation peut aussi modifier la composition de la flore. En effet, des sujets obèses ont une flore bactérienne différente de celles de sujets minces (242). La flore bactérienne des sujets obèses soumis à un régime hypocalorique s'assimile au cours du temps à celles des sujets minces. A l'inverse, au cours des dernières décennies notre changement de régime alimentaire, qui à la base était constituée de fibres (non énergétique) et qui a progressivement été remplacé par des graisses d'origine animale, a conditionné un changement de flore qui peut être associé au développement simultané de la recrudescence du nombre de diabétiques et de sujets en excès de poids ou obèses. Le régime alimentaire serait donc décisif de notre population bactérienne.

→ Une des causes premières de la modulation de la flore intestinale et donc de l'installation du diabète de type II, semble donc bien être le régime alimentaire.

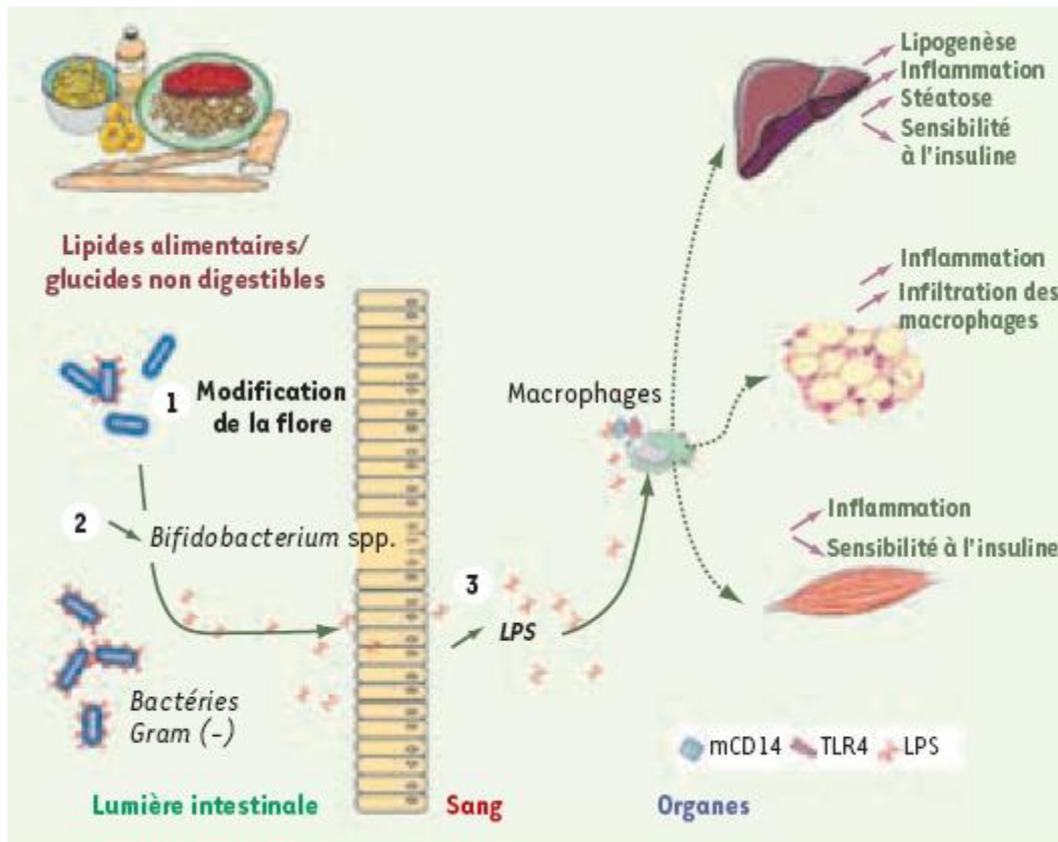


Figure 45: Rôle de la flore bactérienne sur la régulation de la glycémie. La modification de la composition de la flore intestinale par les nutriments, notamment les lipides, favorise la sécrétion dans le sang circulant de facteurs inflammatoires, les LPS. Par leur fixation sur les macrophages, les LPS agissent sur le foie le tissu adipeux et, les muscles et induisent une insulino-résistance périphérique (238).

ii. La surcharge énergétique : régime alimentaire et sédentarité

Le deuxième facteur environnemental incriminé et, largement considéré, est donc le régime alimentaire, précisément la surcharge énergétique. Des sujets dont la dépense énergétique est inférieure à l'apport énergétique développent une obésité souvent associée à un diabète de type II. Un régime alimentaire riche en calories tel qu'un **régime riche en graisse (lipides = 9kcal/g)** associé à une **sédentarité**, induit donc une surcharge énergétique et le développement des maladies métaboliques.

II- L'insulinorésistance et le défaut de sécrétion de l'insuline

1. Caractéristiques

Le diabète de type II est caractérisé par différents paramètres qui sont une hyperglycémie, une hyperlipidémie et, une insulinorésistance étroitement interconnectées.

En clinique la mise en évidence de l'insulinorésistance est souvent confondue par le défaut de sécrétion d'insuline, qui en combinaison variable avec l'insulinorésistance des tissus, favorise des glycémies élevées, une intolérance au glucose puis le diabète de type II.

2. Théorie de l'évolution de l'insulinorésistance

Un défaut progressif de l'action de l'insuline sur les tissus cibles que sont principalement les muscles, le tissu adipeux, et le foie, caractérise l'insulinorésistance (15). Une insulinorésistance précède le diabète de type II. Ainsi, lors des phases initiales, la glycémie est maintenue à sa norme au détriment d'une hypersécrétion d'insuline (Figure 46). Le pancréas adapte sa sécrétion d'insuline en fonction de la glycémie à réguler, qui doit rester dans une zone physiologique afin d'assurer le fonctionnement des mécanismes enzymatiques des cellules et de leur transport du glucose. L'adaptation du pancréas à l'insulinorésistance dépendrait de sa capacité à augmenter le nombre de cellules B à partir de précurseurs (15). Ceci a été montré chez l'animal mais reste à définir chez l'Homme. Lors de l'évolution de la maladie, la sécrétion de l'insuline devient insuffisante. Dès lors la glycémie à jeun augmente ; il s'agit alors de l'état diabétique. Dans l'ensemble, l'association en combinaison variable de l'insulinosensibilité et d'un défaut de sécrétion d'insuline définit le développement du diabète. Les facteurs de risques qui définissent l'insulinorésistance et le défaut de sécrétion d'insuline sont multiples.

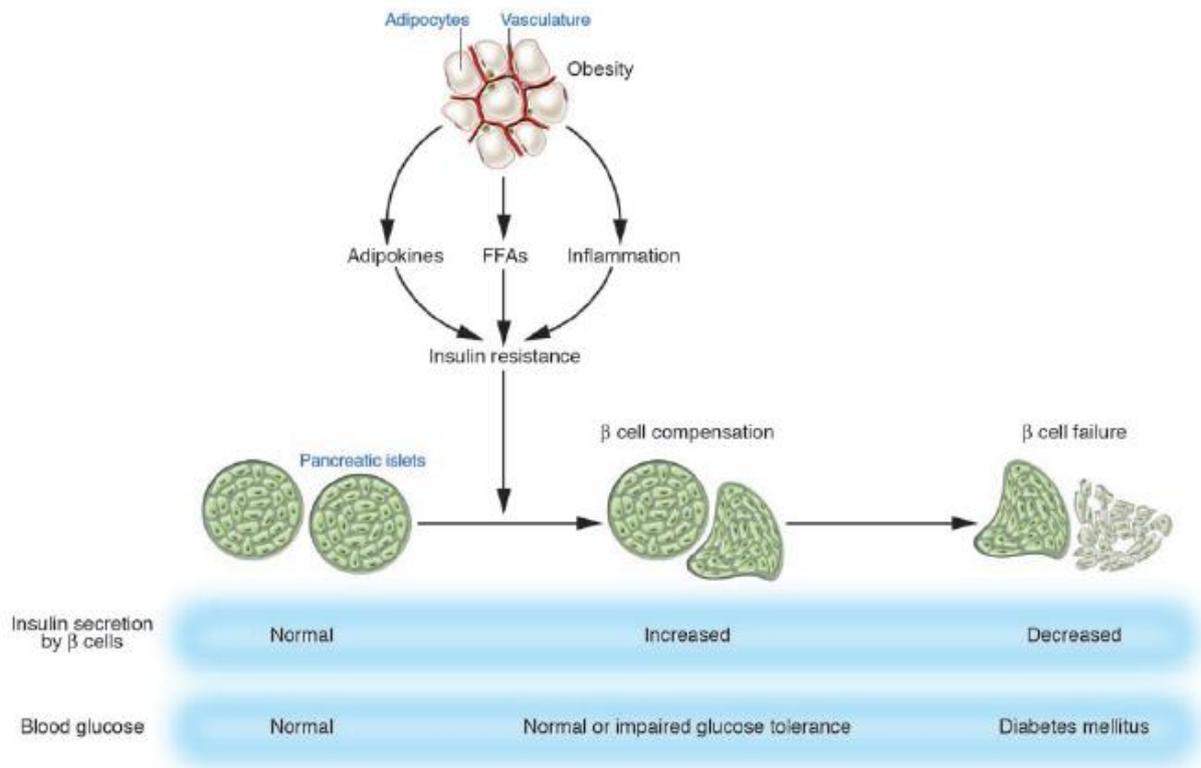


Figure 46: Corrélation entre les îlots pancréatiques capable de sécréter l'insuline et la glycémie au cours de l'installation de l'insulinorésistance et du diabète de type II. Le tissu adipeux produirait des facteurs inducteurs d'insulinorésistance (adipokines, acides gras, inflammation) qui altèrent les cellules B du pancréas (15).

a. L'insulinorésistance, perte d'action de l'insuline sur les tissus cibles

Comme nous l'avons vu, l'insuline est une hormone clé dans la régulation de la glycémie par ses effets anaboliques dans le foie, les muscles et le tissu adipeux. Des altérations dans la voie de signalisation de l'insuline (Figure 5 et 6), du récepteur aux effecteurs moléculaires, participent donc à la perte de sensibilité à cette hormone dans ces organes cibles.

Ainsi, chez des souris, la délétion du récepteur à l'insuline spécifiquement dans le foie par système Cre_lox induit une perte de la phosphorylation des IRS1 et IRS2 ce qui empêche

le stockage du glycogène hépatique et l'inhibition de la production hépatique de glucose par l'insuline (243). En effet, la mutation des différents IRS induit aussi une insulino-résistance et une intolérance au glucose (244). De la même manière, des souris exprimant une protéine à effet dominant négatif de l'activité la PI3K spécifique du foie présentent une intolérance au glucose et une hyperinsulinémie (245). Les effets bloqués de l'insuline sur le foie favorisent alors l'installation d'une hyperglycémie et d'une hyperlipidémie.

La délétion du récepteur à l'insuline spécifiquement dans le muscle n'induit pas d'intolérance au glucose de l'organisme bien qu'il soit observé une augmentation de la sécrétion d'insuline et une hyperlipidémie (246). Les muscles ne semblent donc pas être les premiers organes sensibles à l'insulino-résistance.

Le tissu adipeux est le tissu qui permet de stocker l'excès d'énergie par hypertrophie et hyperphagie des adipocytes. Ainsi, il serait un tissu tampon à l'installation de l'insulino-résistance puisque l'excès d'acides gras et de glucose peut y être stocké. Il peut être aussi considéré comme un tissu inducteur de désordre métabolique. Ainsi, des souris invalidées pour l'expression du récepteur à l'insuline dans le tissu adipeux sont maigres et ont une meilleure tolérance au glucose que des souris saines, ce qui est corrélé à une diminution des facteurs de transcription impliqués dans le stockage des graisses tels que SREBP (247). La meilleure tolérance au glucose de ces souris peut s'expliquer par la diminution de la production de facteurs inflammatoires qui induisent l'insulino-résistance. Ainsi, au cours du stockage des graisses, les macrophages s'infiltrent dans le tissu, et augmentent la production de cytokines et de facteurs inflammatoires tels que IL6 (interleukine 6), TNF α (tumor necrosis factor α), ce qui crée un état inflammatoire faible, dit état d'inflammation métabolique (45; 248) (Figure 46). Cette inflammation initiée semble participer au déclenchement de l'insulino-résistance puisque chez des rats obèses la neutralisation du TNF α produit par le tissu adipeux améliore la sensibilité à l'insuline et la capture de glucose par les tissus (249).

Face à cette perte progressive de sensibilité à l'insuline par les tissus cibles, les cellules B du pancréas compenseraient par une hypersécrétion d'insuline via une augmentation du nombre de cellule B, ce qui permettrait de maintenir la glycémie à une valeur physiologique.

b. Compensation de la cellule B du pancréas : augmentation de la sécrétion d'insuline

Les mécanismes par lesquels la prolifération des cellules B et l'augmentation de la sécrétion d'insuline qui permettent une compensation à la perte d'efficacité de l'insuline sur les tissus cibles sont d'origine nerveuse, endocrinienne et, métaboliques.

i. Stimulus nerveux

Le système nerveux parasympathique qui innerve le pancréas participerait à l'augmentation de sécrétion d'insuline. En effet, la vagotomie chez des souris ob/ob réduit l'hyperinsulinémie (250). L'information nerveuse partant du VMH transmise au nerf vague serait impliquée, et nécessiteraient les récepteurs cholinergiques de ce dernier (251).

ii. Stimulus endocrinien

Des chiens nourris avec une complémentation nutritionnelle en lipides, deviennent au fur et à mesure insulino-résistants. Un des mécanismes de compensation serait la sécrétion de GLP-1 qui est corrélée à l'augmentation de la sécrétion d'insuline (252). Dans l' « arc réflexe métabolique », les stimuli intestinaux, auraient donc un rôle anticipateur mais aussi protecteur face à l'insulino-résistance en favorisant la sécrétion d'incrétines. Comme nous l'avons vu, le GLP-1 est aussi connu pour avoir un effet prolifératif sur la cellule B notamment en activant le gène inducteur de prolifération cellulaire, PDX1 (253; 254).

iii. Stimulus métabolique : glucose, acides gras

L'effet des acides gras sur la cellule B est dépendant de leur durée d'exposition. En effet, des rats exposés pendant 3 heures à une solution riche en lipides (intralipid, IL) ont une augmentation de 86% de la sécrétion d'insuline par rapport aux témoins (255). Par contre, des rat perfusés pendant 48h à une solution d'IL ont une sécrétion d'insuline diminuée de 40% (255). Ainsi une exposition longue (de plusieurs heures) aux lipides diminue la sécrétion

d'insuline et devient toxique pour la cellule B. La synergie de l'effet délétère du glucose et des lipides sur la cellule B du pancréas s'appelle la glucolipotoxicité.

c. Glucolipotoxicité et apoptose de la cellule B.

Lorsque les flux d'acides gras et de glucose augmentent dans le sang, la cellule B augmente la métabolisation du glucose et des acides gras. En effet, une partie des acides gras qui pénètrent dans la cellule B, sont métabolisés en acyl coA puis transportés dans la mitochondrie par la CPT-1 (56; 256) (Figure 16). Les acyls CoA sont alors oxydés pour produire de l'énergie à la cellule. Et, le glucose est métabolisé en pyruvate puis en acétyl coA pour être oxydé dans le cycle de Krebs. Or, lorsque la consommation de glucose augmente, une partie de l'acétyl coA produit, est métabolisé en malonyl coA (Figure 47). Une concentration élevée de malonyl coA (257) inhibe donc la CPT-1 ce qui empêche l'oxydation des acyl coA. Les acyls coA peuvent alors devenir toxiques pour la cellule. En effet, l'oxydation excessive des acyls coA associée à un ralentissement de l'accepteur d'électrons génère des espèces réactives de l'oxygène (les ROS). Celles-ci sont des molécules radicalaires susceptibles d'altérer l'ADN de la cellule (258; 259). Le taux élevé de malonyl coA peut aussi générer des complexes lipidiques, notamment des céramides, et des inducteurs d'apoptose par l'activation de la iNOS (inductible nitric oxyde synthase) (260).

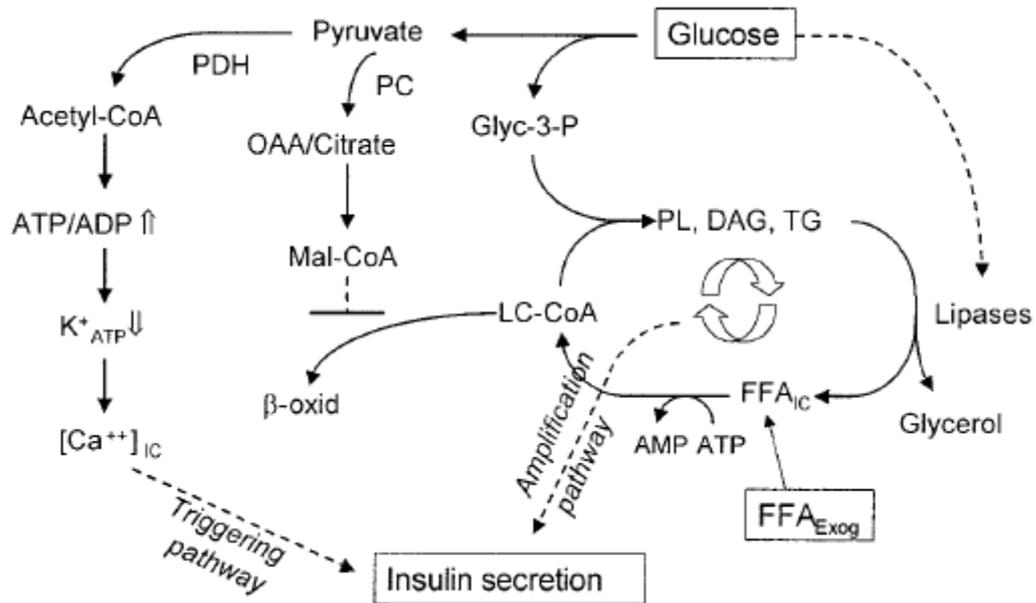


Figure 47: schématisation de la glycolyse (à droite) et de l'oxydation des acides gras (FFA) (à gauche) reliées à la sécrétion de l'insuline. Lors d'excès d'énergie le glucose est métabolisé en malonyl coA (Mal-CoA) pour inhiber la B-oxydation (au centre) (56).

En conclusion, la glucolipotoxicité est possible seulement en condition d'augmentation des flux de glucose et d'acides gras. D'où provient cette augmentation des flux de ces deux substrats énergétiques en sachant que la perte d'efficacité des effets anabolisants de l'insuline sur les tissus périphériques n'est pas principalement d'origine génétique ? **L'insulinorésistance proviendrait donc d'une cause environnementale, un régime nutritionnel riche en lipides.** Dans des conditions d'hyperlipidémie chroniques, les lipides d'origine nutritionnelle agiraient donc sur les tissus périphériques et perturberaient alors de la voie de l'insuline et altéreraient sa sécrétion (Figure 48). Quels sont donc précisément les effets physiopathologiques des lipides ?

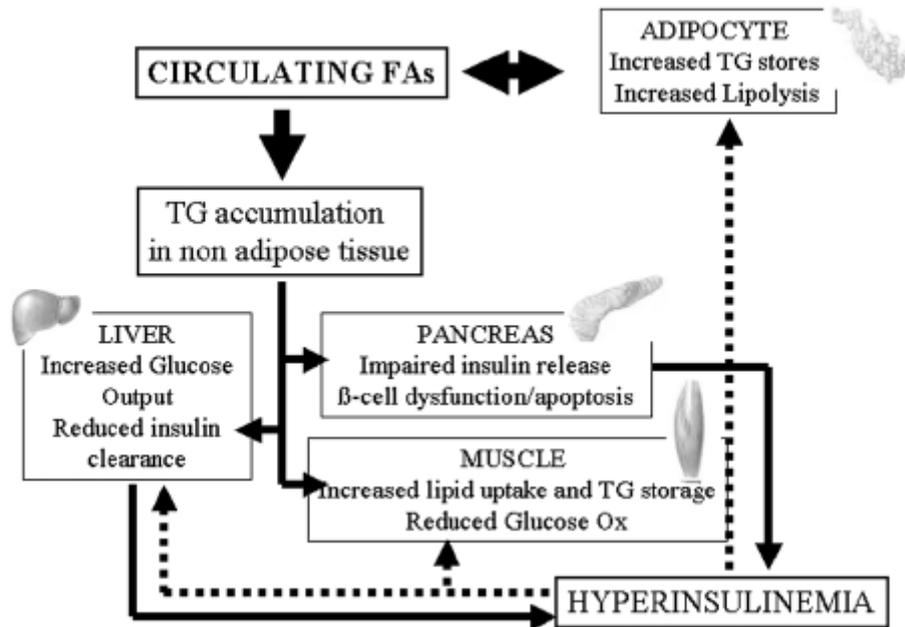


Figure 48: Les acides gras circulants agissent sur différents tissus (foie, pancréas, tissu adipeux, muscles) et induisent une hyperinsulinémie propice à l'insulinorésistance (261).

III- Les lipides

1. Les lipides qui rendent diabétiques

Parmi la famille des acides gras, il est distingué les oméga 3 et les oméga 6 qui sont de acides gras polyinsaturés respectivement à partir du carbone 3 et 6 (262; 263). Ils sont essentiels car ils ne sont pas produits par l'organisme. Ils proviennent d'huiles végétales comme l'huile de colza, de soja, et dans les poissons gras comme le saumon, la sardine.

Leur structure faite de double liaison réduit leur mobilité, néanmoins elle leur permet de s'incorporer aux membranes cellulaires. Ils participent aussi à la régulation de la reproduction, la coagulation et ont un rôle anti-inflammation. Ils auraient un rôle protecteur sur les cellules nerveuses, cardiaques, les vaisseaux et, la peau ce qui éviterait la neurodégénération, les problèmes cardiovasculaires, le vieillissement de la peau et les cancers. Ils agiraient via des récepteurs nucléaires, les PPAR (264).

Les « mauvais » lipides sont les acides gras saturés qui proviennent de l'absorption de graisses animales (lait, fromage, viande), des huiles hydrogénées cuites comme l'huile de tournesol. Ils sont répertoriés en fonction leur nombre de carbones. On distinguera donc par exemple l'acide palmitique (n=16), l'acide stéarique (n=18) ou, arachidique (n=20).

A forte concentration dans le sang, ils deviennent des facteurs de risques puisqu'ils sont susceptibles d'induire la lipotoxicité des organes en créant un stress oxydant, et orientant la cellule vers l'apoptose (265). Ils sont donc des précurseurs du développement de maladies telles que l'athérosclérose et le diabète de type II (265).

2. Effet physiopathologique des lipides et des dérivés lipidiques

Les effets physiologiques et physiopathologiques des lipides sont difficilement dissociables car expérimentalement ils sont fonction du temps de perfusion des lipides, du modèle animal et du protocole expérimental. Les effets physiologiques des lipides que je vous ai présentés ci avant (inhibition de la PEG, augmentation de la sécrétion d'insuline) peuvent être interprétés dans un premier temps comme des mécanismes d'adaptation contre l'insulinorésistance notamment par le sensing hypothalamique. Néanmoins, à plus long terme ils s'inscrivent dans un contexte physiopathologique en ayant des effets insulinorésistants. Je choisis donc quelques exemples pour vous le démontrer.

Une consommation excessive de nourriture riche en lipides induit une balance énergétique positive qui se traduit par un stockage ectopique de lipides dans les tissus induisant une insulinorésistance. A l'inverse, chez l'homme et les rongeurs, une restriction calorique restaure la sensibilité à l'insuline (266).

a. Effet sur la voie de signalisation de l'insuline

Les dérivés lipidiques générés lors d'un excès d'énergie, peuvent perturber la voie de signalisation de l'insuline et favoriser l'insulinorésistance en agissant sur différents acteurs moléculaires. Ainsi, les céramides sont connus pour inhiber la PI3K qui altère alors le transport de glucose induit par l'insuline (267). Ils peuvent aussi empêcher le recrutement du

complexe protéique PKB/Akt (268) et diminuer les effets de l'insuline. Une inhibition pharmacologique de la production des céramides restaure partiellement la sensibilité à l'insuline (45). Le diacylglycérol (DAG) et les céramides, activent aussi différents isoformes de la protéine kinase C (PKC) (269). Cette dernière inhibe alors l'activité tyrosine kinase du récepteur à l'insuline ou inhibe les IRS par déphosphorylation (270; 271).

b. Effet sur le muscle et le foie

Les dérivés lipidiques dans le muscle altèreraient la capture de glucose et la synthèse de glycogène stimulée par l'insuline (272). Néanmoins les preuves restent insuffisantes. Et, les muscles des athlètes hautement entraînés contiennent des réserves de lipides qui semblent favorables à la dépense énergétique de leur muscle (272).

D'après les travaux de Lam et coll. (273), après vingt quatre heures de jeûne, des rats sont perfusés par voie intraveineuse avec une solution de lipides (Intralipid) pendant deux ou sept heures. Les effets s'observent surtout après sept heures de perfusions. A la fin de la perfusion de lipides, la PEG est augmentée par rapport à celle des rats perfusés avec une solution saline. Les effets des lipides sur le contrôle de la glycémie seraient liés au sensing hypothalamique des lipides. Les auteurs bloquent donc les canaux K^+ sensibles à l'ATP dans le cerveau pour analyser l'effet des lipides sur la PEG au cours d'un clamp hyperinsulinémique euglycémique. Dans ces conditions, les lipides ont induit une diminution de PEG ce qui valide leur hypothèse. D'autre part, les lipides qui agissent sur l'hypothalamus induiraient une inhibition de l'activité de la glucokinase hépatique stimulée par l'insuline ainsi qu'une augmentation de l'activité de la glucose 6 phosphatase (273; 274).

3. Dommage oxydatif par les lipides

L'oxydation des lipides induit des espèces réactives de l'oxygène (ROS). L'augmentation de l'oxydation des acyls coA suscite une augmentation du fonctionnement de la chaîne respiratoire corrélée à une diminution de la consommation d'oxygène. Le gradient d'électrons n'est donc pas suffisamment tamponné. Ils peuvent alors se fixer à l'oxygène qui

s'oxyde en ion super oxyde ($O_2^{\cdot-}$) ; Ce dernier engendre des réactions en chaînes d'espèces radicalaires, ce sont les espèces réactives à l'oxygène (ROS). Ainsi, les lipides par leur chaînes insaturées peuvent être peroxydés, notamment dans le muscle (271) (Figure 49). Les ROS et les lipides peroxydés sont des molécules extrêmement réactives qui peuvent alors modifier les conformations stériques des molécules voisines telles que les enzymes et les acides nucléiques. Ainsi, nucléotides et protéines peuvent perdre ou acquérir des fonctions différentes au risque de déréguler leur fonction primaire et les fonctions de la cellule (275).

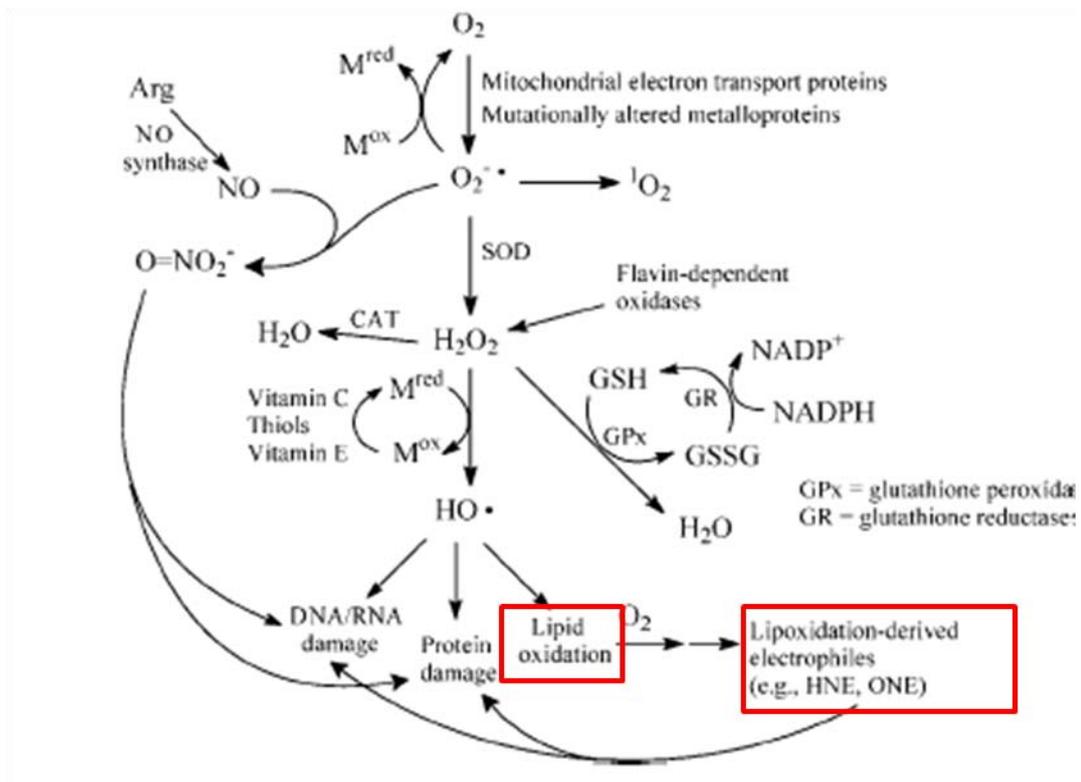


Figure 49: Cascade de réactions radicalaires à partir de l' $O_2^{\cdot-}$. qui peuvent aboutir à la peroxydation des lipides (50).

La consommation excessive de lipides favorise donc le développement de l'insulinorésistance et du diabète de type II. Les incrétines sont des hormones hautement impliquées dans la sécrétion de l'insuline, dont les effets ne semblent pas abolis dans le diabète de type II. C'est pourquoi cette maladie métabolique peut être envisagée, en partie,

comme une absence ou une perte d'effet du GLP-1 (276). Ainsi, différentes stratégies thérapeutiques décrites ci-avant se sont développées pour restaurer l'effet du GLP-1. Je vous exposerai donc les effets des inhibiteurs de DPP-IV dans le traitement du diabète de type II.

IV- Le diabète de type II et les inhibiteurs de DPP-IV

1. Pourquoi choisir les inhibiteurs de DPP-IV en thérapeutique ?

Etant donné la dégradation rapide du GLP-1, les effets d'une injection aiguë de GLP-1 natif, par voie intraveineuse ou sous cutanée, sont de courte durée (deux heures). L'injection continue de cette molécule n'est pas une solution à envisager en thérapeutique (277).

Les analogues du GLP-1, tels que la liraglutide, et d'agonistes, tels que l'exendine, possèdent des acides aminés qui sont sensibles à la DPP-IV, notamment l'alanine en position 8, qui ont été remplacés pour augmenter la demi-vie du peptide. Malgré un effet bénéfique sur la tolérance au glucose chez les patients de type II, ils induisent des effets secondaires comme la nausée, les vomissements et les diarrhées (277).

Le dernier outil thérapeutique développé a donc été les inhibiteurs de DPP-IV. La posologie est de 100-200mg en une ou deux prises orales puisque leur durée d'action est d'environ vingt quatre heures (278). Ils peuvent néanmoins induire des hypoglycémies et, n'induisent pas de perte de poids comme les analogues du GLP-1. Les principaux agents utilisés sont la sitagliptine et la vildagliptine car ce serait les plus efficaces.

2. Effets thérapeutiques des inhibiteurs de DPP-IV

a. Effets pharmacologiques

Les inhibiteurs de DPP-IV augmenteraient de deux à trois fois la concentration circulante sanguine de GLP-1 sous forme active (224; 278) ce qui suggère que chez le sujet diabétique, l'absence de GLP-1 est due à un excès d'expression et/ou d'activité de la DPP-IV ou proviendrait d'un défaut de sa sécrétion. En effet, des rats diabétiques ont une augmentation de l'activité de la DPP-IV dans l'intestin, le foie et le rein (279). De même des

souris diabétiques db/db présentent une augmentation de l'activité de la DPP-IV dans le sang (280).

Les agents pharmacologiques sont éliminés par les reins et le foie.

b. Effets métaboliques

L'utilisation des inhibiteurs de la DPP-IV en traitement thérapeutique chronique chez les rongeurs (281; 282) et les patients diabétiques (283-286), diminue la glycémie à jeun et post prandiale, l'intolérance au glucose, la sécrétion de glucagon, et inversement augmente la sécrétion d'insuline. A long terme, l'effet de ces agents thérapeutiques augmenterait le nombre d'îlots B du pancréas, tout au moins chez l'animal, ce qui favoriserait donc le maintien du contrôle de la glycémie. Cependant, bien que des évidences existent chez l'animal aucune donnée claire n'est publiée chez l'Homme à ce jour (208). Cet effet est donc encore à étudier.

Les inhibiteurs de DPP-IV n'agiraient pas sur la satiété et la vidange gastrique (287). D'un point de vue physiologique, le contrôle de la satiété par le GLP-1 serait essentiellement dû au GLP-1 sécrété dans le cerveau. Or, la DPP-IV n'est pas exprimé dans le cerveau (288). Ces données suggèrent donc que l'action des inhibiteurs de la DPP-IV serait dépendante de l'« arc réflexe » pour lequel la régulation serait fonction d'un rapport entre la concentration plasmatique de GLP-1 et de la concentration du GLP-1 cérébral.

D'autre part, un article relève que 100mg de vildagliptine donnés à des patients diabétiques augmenteraient la sécrétion d'insuline et diminueraient la sécrétion de glucagon ce qui induirait l'inhibition constatée de la PEG (289).

c. Traitement recommandé

Les inhibiteurs de la DPP-IV sont donc des agents thérapeutiques qui agissent essentiellement sur les fonctions endocrines du pancréas. Or, le diabète est la résultante en combinaison variable, d'un défaut de l'action et de la sécrétion d'insuline. Le traitement du diabète de type II doit donc être la combinaison d'un inhibiteur de la DPP-IV et d'une

molécule qui augmente la sensibilité à l'insuline comme la metformine (290; 291). En effet, la metformine inhibe la PEG et, améliore la sensibilité hépatique et musculaire de l'insuline.

Objectifs

PREMIERE PARTIE

Dans l'arc reflexe métabolique, la détection des nutriments par l'intestin induit l'émission de signaux hormonaux, tels que le GLP-1, et nerveux, tels que l'activation du nerf vague, qui sont transmis au cerveau (1,2). Les centres intégrateurs du cerveau modulent alors un nouveau message qui est distribué aux organes périphériques. Les messages intestinaux semblent donc être les premiers à préparer les organes périphériques à la régulation de la glycémie (85). Ce concept est ainsi appelé « arc réflexe anticipateur ». Le système porte est alors considéré comme un système précoce de régulation de la glycémie dépendant du glucose (6) mais aussi d'une hormone sécrétée par l'intestin, le GLP-1 (101). Ainsi, le GLP-1 semble être un signal entérique clé dans la régulation anticipée de la glycémie. Sa dégradation rapide par la DPP-IV dès son arrivée dans la veine porte laisse supposer un rôle clé de cette enzyme dans le contrôle de cette hormone.

En effet, le GLP-1 est largement étudié, *in vitro* (105; (200) et *in vivo* (196; 197), pour son effet insulinothé. En présence de glucose, l'injection intraveineuse d'un agoniste du GLP-1, l'exendine 4, induit une sécrétion de l'insuline. Néanmoins, ce protocole expérimental ne reflète pas les effets liés à la sécrétion physiologique du GLP-1. D'après l'importance physiologique du GLP-1 dans la régulation de la glycémie, il est essentiel d'éclaircir son mode d'action qui reste jusqu'à aujourd'hui hypothétique. En effet sa dégradation rapide par la DPP-IV dans la sphère entéro-portale semble paradoxale aux vastes effets du GLP-1 sur les organes périphériques et notamment le pancréas.

La DPP-IV, est présente dès la bordure en brosse des entérocytes, et les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins. Localisée alors très tôt sur la route de sécrétion du GLP-1, elle permet la dégradation rapide du GLP-1(7-37) endogène en peptide métaboliquement inactif. Ainsi, l'un des moyens d'étude du GLP-1 endogène est l'utilisation des souris mutées pour la DPP-IV (CD26^{-/-}) (227) mais surtout par l'utilisation des inhibiteurs de cette enzyme (225) tels que la sitagliptine. La pharmacologie des inhibiteurs de la DPP-IV conditionne donc la concentration de la forme active du GLP-1 et les effets qu'il induit. Ainsi, par l'étude de différentes doses de sitagliptine, qui conditionne la concentration du GLP-1 endogène dans la sphère entéro-gastrique, nous pouvons analyser les différentes modalités de régulation de la glycémie par cette hormone. Ces données dénoteraient alors une étape importante de la

régulation de l'axe « intestin-cerveau » via le signal du « GLP-1 entérique ». Par analogie la dégradation contrôlée du GLP-1 mettra en évidence le rôle de la DPP-IV dans la fonctionnalité de cette hormone. La DPP-IV serait alors une enzyme clé pour le maintien de l'homéostasie glucidique.

Notre **premier objectif** a été de déterminer la dose orale minimale active de sitagliptine qui inhibe l'activité de la DPP-IV dans la sphère entéro-portale et dont l'effet du GLP-1 endogène régule la glycémie. Ainsi, nous pouvons déduire l'importance de la DPP-IV dans le contrôle du GLP-1 intestinal pour le contrôle de la glycémie.

Notre **second objectif** a été de déterminer chez des souris saines, l'effet d'une forte dose de sitagliptine (40mg) qui permettait un blocage quasi-total de l'ensemble des activités DPP-IV et ainsi d'étudier les conséquences de cette inhibition majeure sur la glycémie et l'insulinémie suite à l'augmentation de la concentration du GLP-1 (7-36) endogène dans le système porte.

DEUXIEME PARTIE

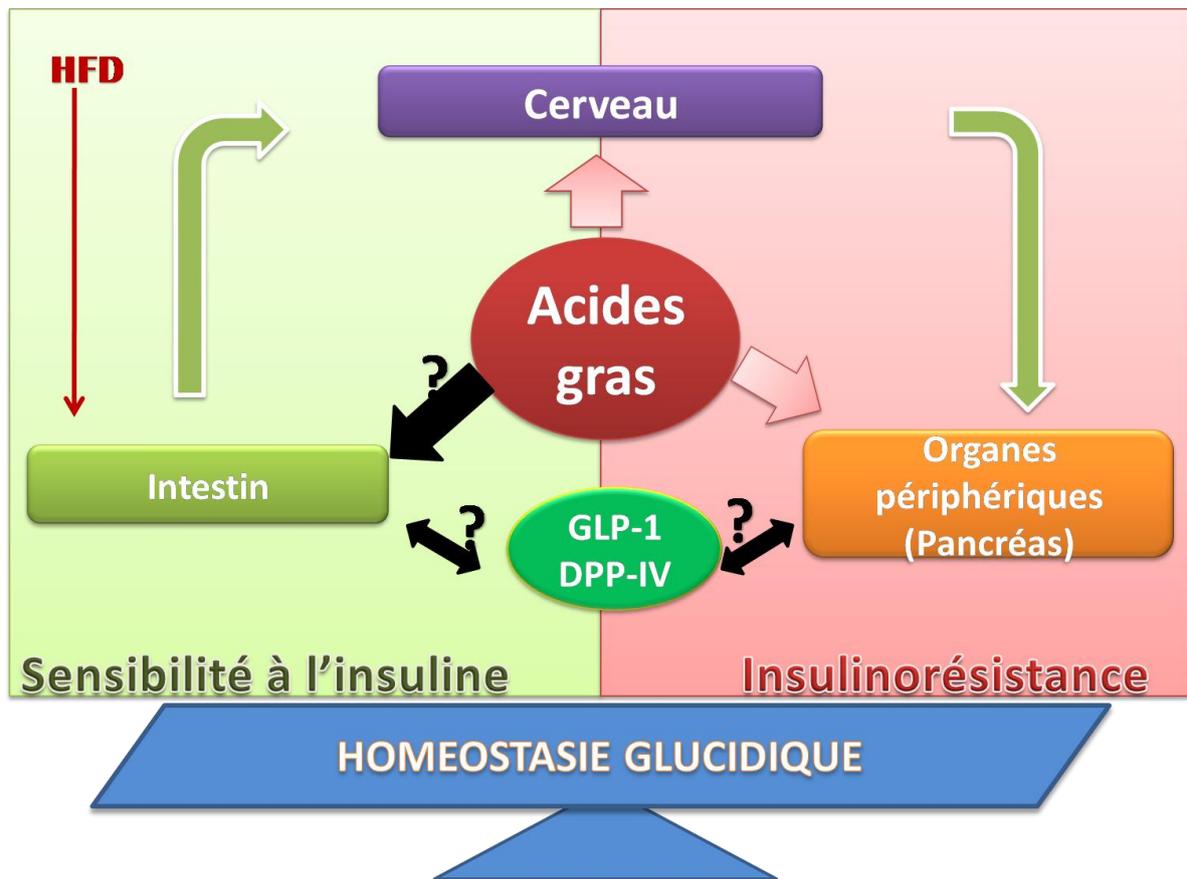
Notre premier axe de recherche a été d'élucider un des mécanismes de l'axe « intestin-cerveau » impliqué dans la régulation de la glycémie. Notre seconde approche a consisté à déterminer un facteur qui altérerait l'intestin et d'analyser les conséquences sur la régulation de la glycémie.

Un régime alimentaire riche en lipides est une des causes environnementales qui induit l'insulinorésistance (262-267) et qui conduit au développement du diabète de type II. Ainsi, l'étude des lipides sur les tissus cibles tels que les muscles, le foie et le tissu adipeux, montrent qu'ils perturbent la voie de signalisation de l'insuline et, qu'ils favoriseraient la sécrétion d'insuline avant de devenir toxique pour les cellule B du pancréas. Certes, les lipides circulants qui atteignent l'hypothalamus auraient pour rôle d'informer les organes périphériques de l'état énergétique de l'organisme. En effet, les acyls coA et leur oxydation sont des « thermostats » de l'utilisation de l'énergie qui conditionneraient alors la régulation de la glycémie (58-64). Mais sur une longue période, d'au moins 24 heures, cette information préventive transmise par les noyaux de l'hypothalamus devient insuffisante et provoque à son

tour un état d'insulinorésistance. Il semble donc nécessaire d'aborder le problème de l'insulinorésistance plus en amont dans l' « arc réflexe métabolique » ce qui revient à étudier l'effet des lipides nutritionnels dans l'intestin.

Notre **troisième objectif** a donc été de comparer les conséquences des lipides sur la régulation de la glycémie dans des conditions où seul l'intestin ou le cerveau est en présence d'une charge en lipide qui équivaut à la prise d'un régime riche en graisse sur 24 heures. A la fin des perfusions, un test de tolérance au glucose par voie orale est réalisé pour déterminer l'impact du sensing entérique au glucose en fonction de la détection intestinale ou cérébrale de lipides. Ainsi, selon « l'arc reflexe métabolique », nous avons déduit l'importance du message transmis au cerveau à partir sensing entérique au glucose.

Notre **quatrième objectif** a été de déterminer des mécanismes moléculaires qui sont associés à l'effet des lipides sur l'intestin et qui perturbent la régulation de la glycémie. Nous y avons intégré une analyse d'électrophysiologie par la mesure de l'activité du nerf vague sur des souris perfusées par voie intragastrique.



Représentation de la régulation de l'homéostasie glucidique par « l'arc réflexe métabolique anticipateur ». Ce dernier est schématisé par l'intestin, le cerveau et les organes périphériques ainsi que les flèches qui les relient. Le marquage en vert indique ce qu'il se passe en condition physiologique et donc de sensibilité à l'insuline. Le marquage en rouge représente la physiopathologie induite par un régime riche en lipides (HFD) et donc d'insulinorésistance. Entre en jeu deux acteurs dans le contrôle de l'homéostasie glucidique: le GLP-1 en relation avec la DPP-IV (vert) et les acides gras (rouge) dont leurs influence sur différents organes de l'arc réflexe modulera la régulation de la glycémie. Les flèches noires annotées de point d'interrogation indiquent les liens que mes questions de thèse mettront en avant.

Résultats

PREMIERE PARTIE

La détection des nutriments par les cellules intestinales déclenche la sécrétion d'hormones qui sont déversées dans les capillaires mésentériques puis la veine porte. Elles peuvent alors participer à l'activation du système porte qui émet un message nerveux vers les centres régulateurs du cerveau. En effet, elles activent les fibres nerveuses afférentes du nerf vague qui s'acheminent vers le tronc cérébral. Ces messages nerveux et hormonaux permettent de préparer à la régulation de la glycémie. Ainsi, une altération d'un des mécanismes entéro-portaux, telles que la sécrétion et/ou l'effet de GLP-1 perturbe cet équilibre glycémique (101; 292; 293).

Le GLP-1 est connu pour avoir de nombreux effets sur les organes périphériques puisque son récepteur est exprimé sur différents organes (152 ; 184-187). Cependant sa dégradation rapide de laquelle résulte une concentration circulante faible ne présage pas un mode d'action direct sur les organes cibles. C'est pourquoi ses effets systémiques ont été étayés via l'utilisation d'agonistes administrés par voie intraveineuse. Ces protocoles expérimentaux ne prennent donc pas en considération la sécrétion endogène du GLP-1 et son action sur l'axe « intestin-cerveau ». Ainsi, nous avons étudié l'effet de différentes concentrations de GLP-1 (7-37) sur la glycémie. A cet effet nous avons utilisé un agent pharmacologique, un inhibiteur de la DPP-IV, la sitagliptine. L'étude de différentes concentrations plasmatiques de GLP-1 (7-37) endogène dans la veine porte permet de mettre aussi en évidence le rôle de la DPP-IV dans la régulation de la glycémie. Ainsi, le contrôle de la dégradation du GLP-1 par cette enzyme pourrait être un modulateur des effets de cette hormone.

A- Etude du contrôle de la glycémie par une concentration faible de sitagliptine (4µg) qui induit une concentration faible de GLP-1 (7-37) dans la sphère entéro-portale.

1. Détermination de la dose orale minimale active de la sitagliptine qui régule la glycémie.

Pour étudier l'effet de la forme active du GLP-1 endogène sur la sphère entéro-portale et l' « arc réflexe métabolique anticipateur », nous avons déterminé la dose minimale de sitagliptine qui permet l'amélioration de la tolérance au glucose.

Dans ces conditions, nous avons vérifié que la concentration portale de GLP-1(7-37) n'était pas augmentée. Il a été cependant impossible de démontrer que la concentration du GLP-1 actif dans les capillaires mésentérique était augmentée.

A cet effet, des souris saines C57Bl/6J, males, âgées de 11 semaines, ont été gavées avec 0,4; 4 ; 40 ou 400µg de sitagliptine 30 minutes avant l'administration orale de glucose. Ainsi, nous avons déterminé la dose la plus faible pour laquelle la glycémie est diminuée par rapport aux souris témoins traitées avec de l'eau. La concentration plasmatique portale de GLP-1 et, l'activité de la DPP-IV dans les différents segments de l'intestin, dans le sang portal et circulant ont été déterminées 15 minutes après la stimulation par le glucose. L'insulinémie a aussi été mesurée à ce même moment par prélèvement de sang à la veine caudale.

La dose orale de sitagliptine de 4µg/ souris induit une diminution significative de la glycémie tout en conservant un pic glycémique à 300dg/ml (16,6mM), identique aux souris témoins (figure 1A). A cette dose, l'activité de la DPP-IV n'a pas été inhibée dans le sang portal et systémique (figure 1B, C) ce qui se corrèle à l'absence d'augmentation de la concentration plasmatique de GLP-1 dans le sang portal (figure 1D). Néanmoins, cet effet est associé à une inhibition de 5% de l'activité de la DPP-IV dans le jéjunum ainsi qu'une tendance dans l'iléon (figure 1E). L'efficacité entérique de la sitagliptine est renforcée par l'utilisation d'une dose orale de 40µg de sitagliptine. En effet, la diminution de la glycémie est alors accentuée et associée à une inhibition entérique (20%) et portale (5%) de la DPP-IV. Cette inhibition de la DPP-IV n'a pourtant pas été suffisante pour augmenter la concentration portale de GLP-1. L'augmentation de la dose de sitagliptine s'assimile à une augmentation de l'insulinémie dès 40µg de sitagliptine (figure 1F).

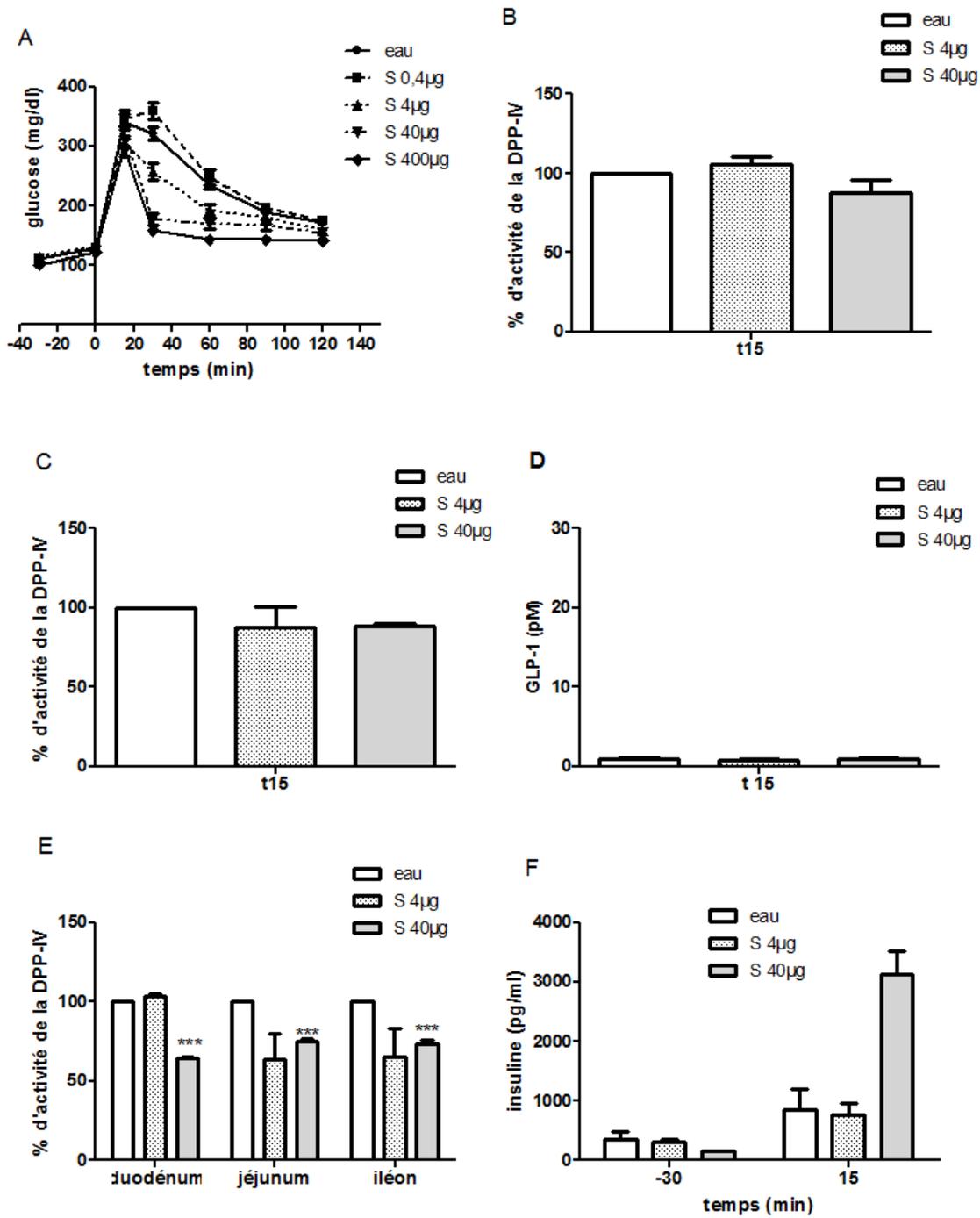


Figure 1 : A) Test de tolérance au glucose par voie orale sur des souris gavées à la sitagliptine (0,4 ; 4 ; 40 ; 400µg/200µl) ou avec de l'eau pour déterminer la dose minimale active. Chez des souris gavées avec de l'eau (barre blanche) ou avec de la sitagliptine à 4µg (barre tachetée de points gris) ou 40µg (barre grise) B,C) % d'activité de la DPP-IV par rapport à la condition eau dans le sang systémique (B) et la veine porte (C), D) concentration plasmatique du GLP-1 (pM), E) % d'activité de la DPP-IV par rapport à la condition eau dans

différents segments de l'intestin, **F**) insulïnémie (pg/ml) mesurés 15 minutes après la charge orale en glucose.

Conclusion

La dose de 4µg de sitagliptine, qui inhibe la DPP-IV entérique sans inhiber la DPP-IV portale, est la dose minimale active qui régule de la glycémie. Cette inhibition de la DPP-IV entérique n'augmente pas la concentration du GLP-1 actif dans la veine porte ce qui s'assimilerait à un effet « hypoglycémiant » du GLP-1 (7-37) dont la forme serait uniquement stable et active dans l'intestin. Cette conclusion est appuyée par l'effet hypoglycémiant induit par la sitagliptine à 40µg où l'inhibition entérique de la DPP-IV et portale sont augmentées sans augmenter la concentration portale de GLP-1. D'autre part, l'effet incrétine du GLP-1 est amélioré à partir de la dose 40µg de sitagliptine. La régulation de la glycémie serait donc dépendante de l'activité de la DPP-IV entérique qui permet la dégradation du GLP-1. Il est donc nécessaire de s'assurer qu'à cette faible dose de sitagliptine, seule l'inhibition de la DPP-IV entérique induit un effet sur la glycémie.

2. Est-ce que seule l'inhibition de la DPP-IV entérique par la sitagliptine à 4µg induit une régulation de la glycémie? Comparaison avec une administration intraveineuse de cet agent.

Une solution de 4 ou 40µg de sitagliptine est administrée par voie intraveineuse 30 minutes avant une charge orale en glucose. La glycémie est alors suivie au cours du temps.

L'activité de la DPP-IV dans sang systémique et la concentration portale de GLP-1 ont été déterminées pour la dose relevante.

Pour être plus précis nous avons réalisé le même protocole pour une administration de sitagliptine dans la veine splénique, qui est une veine adjacente à la veine porte.

Le profil glycémique des souris traitées par la sitagliptine 4µg par voie intraveineuse est identique à celui des souris témoins (figure 2A). La dose 40µg de sitagliptine induit une diminution de la glycémie par rapport aux contrôles qui est tout de même moindre que lors

d'une administration orale de sitagliptine (figure 1A). La dose 4 μ g de sitagliptine est donc la dose de sitagliptine pour laquelle l'effet sur la glycémie est dépendant de l'inhibition de la DPP-IV entérique. Pour cette dose de sitagliptine, la concentration plasmatique de GLP-1 et l'activité systémique de la DPP-IV ont donc été déterminées. L'activité systémique de la DPP-IV n'a pas été inhibée (figure 2B) et n'augmente pas la concentration portale de GLP-1 (figure 2C).

Une administration de 4 μ g de sitagliptine par la veine splénique n'a pas modifié le profil glycémique par rapport aux souris traitées avec une solution saline (figure 2D).

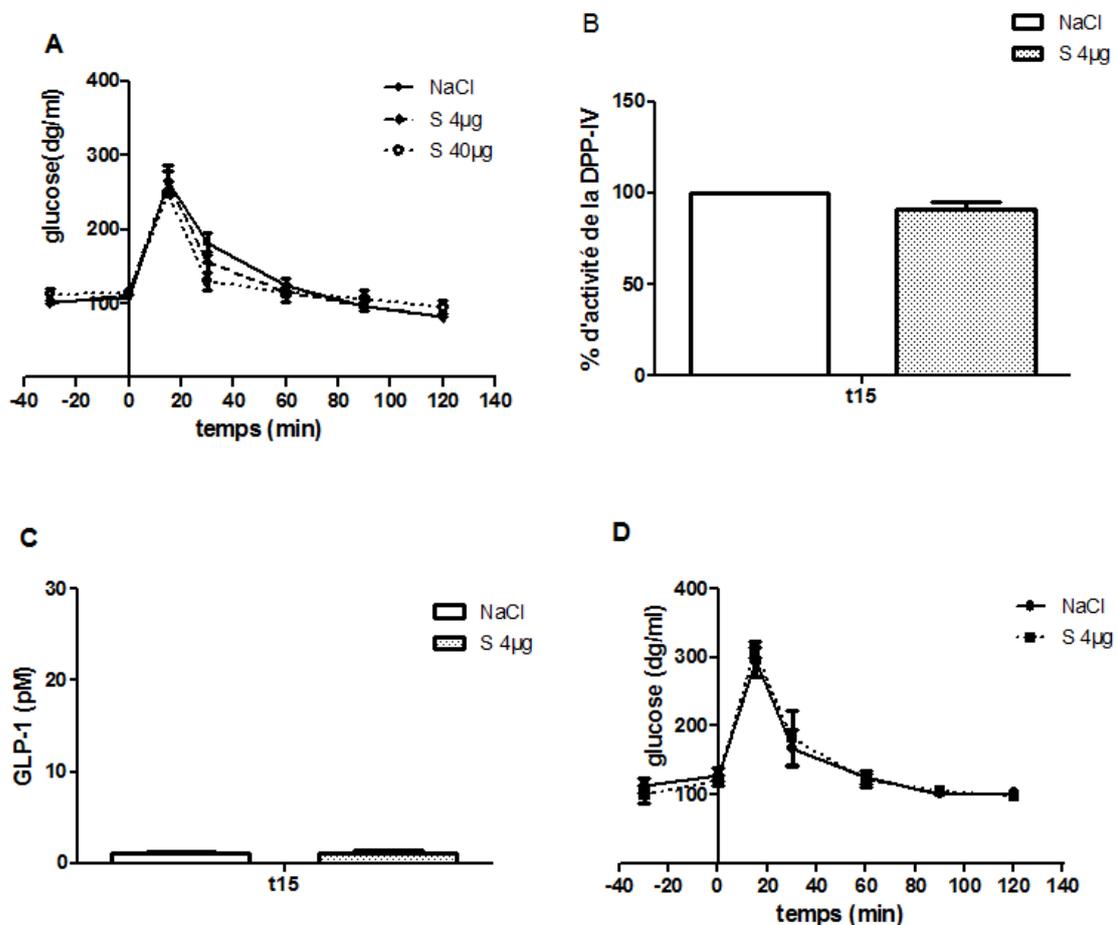


Figure 2: administration intraveineuse (A) ou splénique (D) de sitagliptine à 4 μ g ou 40 μ g. A, D) Effet sur la glycémie, B) % d'activité de la DPP-IV, C) de la concentration plasmatique du GLP-1 dans la veine porte 15 minutes après la charge orale en glucose.

Conclusion

Lorsque la sitagliptine à 4 μ g est administrée par voie intraveineuse ou par la veine adjacente à la veine porte, avant une charge orale en glucose, elle n'induit pas d'effet sur la glycémie. Seule une administration orale de la sitagliptine à 4 μ g permet de réguler la glycémie. Ceci suggère donc que l'activité entérique de la DPP-IV est suffisante pour induire l'effet hypoglycémiant du GLP-1 actif (7-37).

Pour confirmer cette hypothèse, nous avons donc cherché à démontrer l'implication du GLP-1 entérique dans la régulation de la glycémie.

3. Implication du GLP-1 entérique (7-37) dans la régulation de la glycémie.

Des souris sont perfusées par une solution d'exendine 9 ou saline à 0,1nmol/kg/min par voie intraveineuse 45 minutes avant une charge orale en glucose et durant les deux heures qui ont suivi la charge orale en glucose. La sitagliptine à 4 μ g a été administrée par voie orale 30 minutes avant la charge orale de glucose.

En présence de l'antagoniste au récepteur au GLP-1, l'exendine 9, l'effet de la sitagliptine a été reversé ; la glycémie est augmentée 30 minutes après à la charge orale en glucose (figure 3).

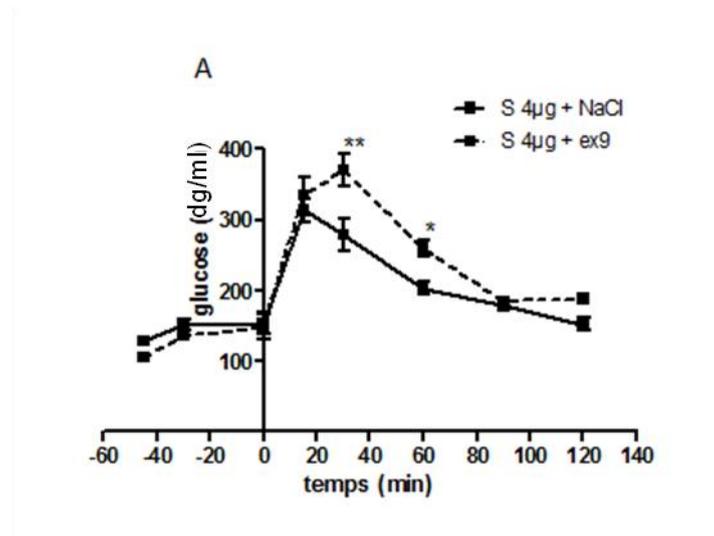


Figure 3 : sur des souris gavées à la sitagliptine à 4µg, effet sur la glycémie d'une perfusion intraveineuse d'exendine 9.

Conclusion

L'effet sur la glycémie induit par la sitagliptine à 4µg est dû, au moins en partie, au GLP-1. Puisque la sitagliptine à 4µg n'inhibe que la DPP-IV entérique, seul le GLP-1 présent dans l'intestin serait impliqué. Physiologiquement, le GLP-1 aurait donc un effet paracrine.

A cette dose de sitagliptine, qui avoisine une condition physiologique, la charge orale en glucose induit un pic de glycémie dans les 15 minutes qui suivent. Cette hyperglycémie permet-elle le recrutement du GLP-1 cérébral ?

4. Le GLP-1 cérébral est-il recruté lorsque la DPP-IV est inhibée seulement dans la sphère entérique ?

Selon le même protocole que ci-avant, l'exendine 9 ou la solution contrôle est administrée dans les ventricules latéraux à une concentration de 0,5pmol/kg/min.

Les souris traitées à l'exendine 9 présente une glycémie plus élevée dès 30 minutes après la charge orale en glucose (figure 4).

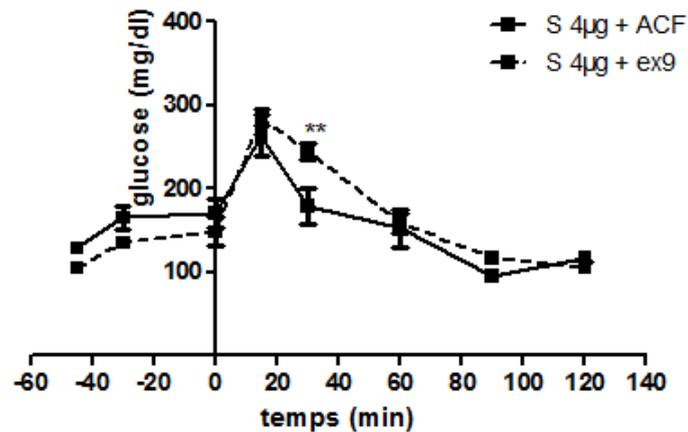


Figure 4: sur des souris gavées à la sitagliptine à 4µg, effet sur la glycémie d'une perfusion intraveineuse d'exendine 9.

Conclusion

Lorsque la sitagliptine inhibe seulement la DPP-IV entérique, qui permet une régulation modérée du pic de glycémie induit par la charge orale en glucose, le GLP-1 cérébral est recruté. Ceci suggère que les effets hypoglycémiant de l'inhibiteur de DPP-IV seraient dus à une action combinée du GLP1 entérique et cérébral.

Moléculairement, lorsque la DPP-IV dégrade le GLP-1 (7-37), elle induit une forme métaboliquement inactive du GLP-1, le GLP-1(9-37) et un dipeptide, l'Histidine-Alanine (His-Ala). La génération de ce dipeptide serait-elle aussi impliquée dans la régulation de la glycémie ?

5. L'His-Ala : La face cachée du contrôle de la dégradation du GLP-1 par la DPP-IV.

Des souris sont gavées avec de la sitagliptine à 40µg 30 minutes avant une charge orale en glucose. Trois minutes avant la stimulation orale par le glucose, 100µl d'une solution d'His-Ala à 100nmol ou d'une solution saline sont injectés par voie intraveineuse. La glycémie est suivie au cours du temps. Les concentrations plasmatiques d'insuline et de glucagon sont déterminées 15 minutes après la charge orale en glucose.

Les souris traitées avec l'His-Ala ont un pic glycémique plus élevé que les souris témoins (figure 5A). Leur profil glycémique s'assimile donc à celui des souris gavées seulement avec de l'eau (figure 1A). L'effet insulinothèque induit par la dose 40µg de sitagliptine est inhibé en présence d'His-Ala (figure 5B). En revanche, l'His-Ala augmente la concentration plasmatique de glucagon (figure 5C).

Conclusion

Le dipeptide His-Ala généré par la dégradation du GLP-1 (7-37) contrôle donc la glycémie en diminuant l'insulinémie et en augmentant la glucagonémie. Il serait donc un frein à l'effet insulinothèque du GLP-1 (7-37).

Physiologiquement, la DPP-IV serait donc primordiale dans le contrôle de la glycémie. En effet, dans un premier temps, elle contrôle l'effet paracrine du GLP-1 (7-37) sécrété par l'intestin qui régule la glycémie. Dans un second temps, en dégradant le GLP-1, la DPP-IV libère un dipeptide, l'His Ala, qui modulerait, par rétrocontrôle, l'effet insulinothèque du GLP-1(7-37) intestinal et/ou cérébral en diminuant la sécrétion d'insuline et en augmentant celle du glucagon.

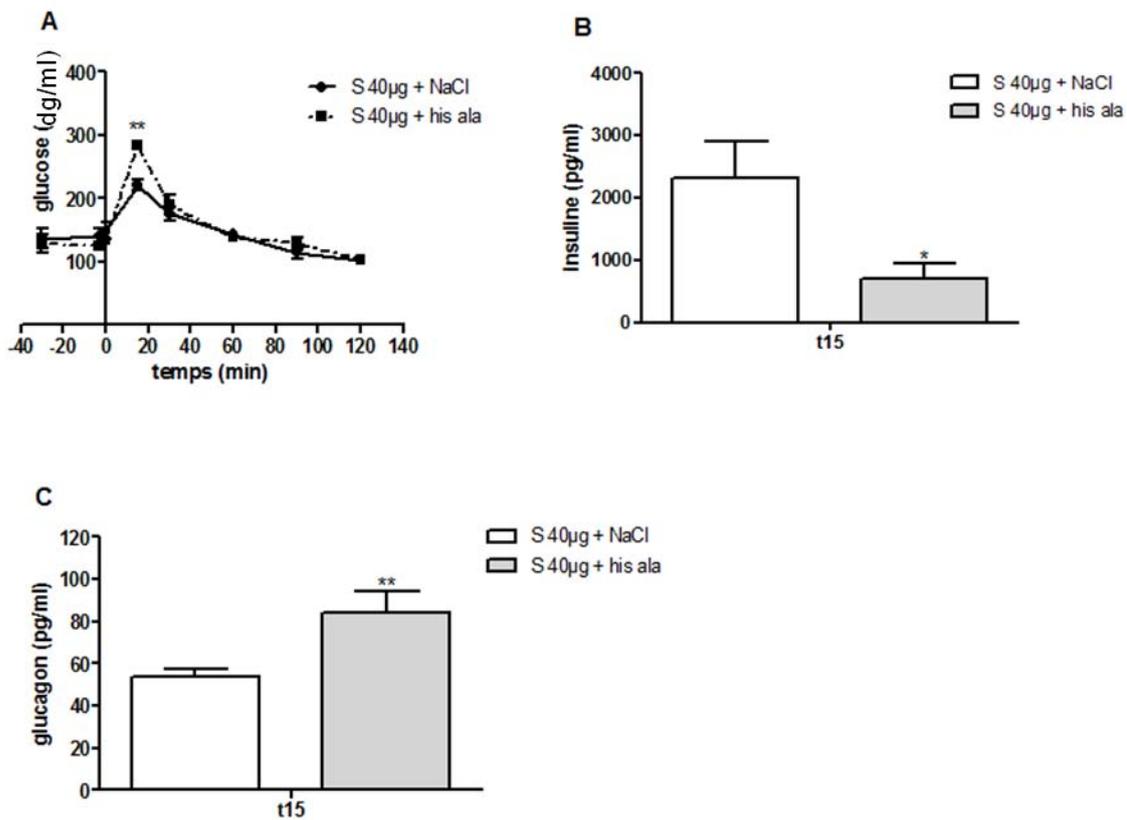


Figure 5: sur des souris gavées à la sitagliptine 40µg, effet du dipeptide His Ala injectée par voie intraveineuse. **A)** glycémie (mg/dl), **B)** insulinémie (pg/ml), **C)** glucagonémie (pg/ml).

6. Vérification de l'effet de l'His Ala sur des îlots de pancréas murins et humains

Des îlots de pancréas murins ou humains sont incubés avec une concentration de glucose à 5.5mM ou 16.7mM qui représente respectivement une condition basale ou stimulée en glucose. Différentes concentrations d'His-Ala (1, 10 et 100nM) sont ajoutées au milieu pour mesurer après 30 minutes d'incubation la sécrétion d'insuline et de glucagon.

Sur les cellules humaines et murines, la stimulation par le glucose induit une augmentation de la sécrétion d'insuline (figure 6A, C) sans modifier la sécrétion de glucagon (figure 6B, D). En présence d'His-Ala, la sécrétion d'insuline est diminuée dès 1nM sur les deux types d'îlots (figure 6A, C). En condition stimulée, sur les îlots de souris, la sécrétion de glucagon est augmentée à partir de 10nM et est encore amplifiée à 100nM (figure 6B). Sur les

îlots humains, la sécrétion de glucagon est augmentée seulement à 100nM d'His Ala (figure 6D).

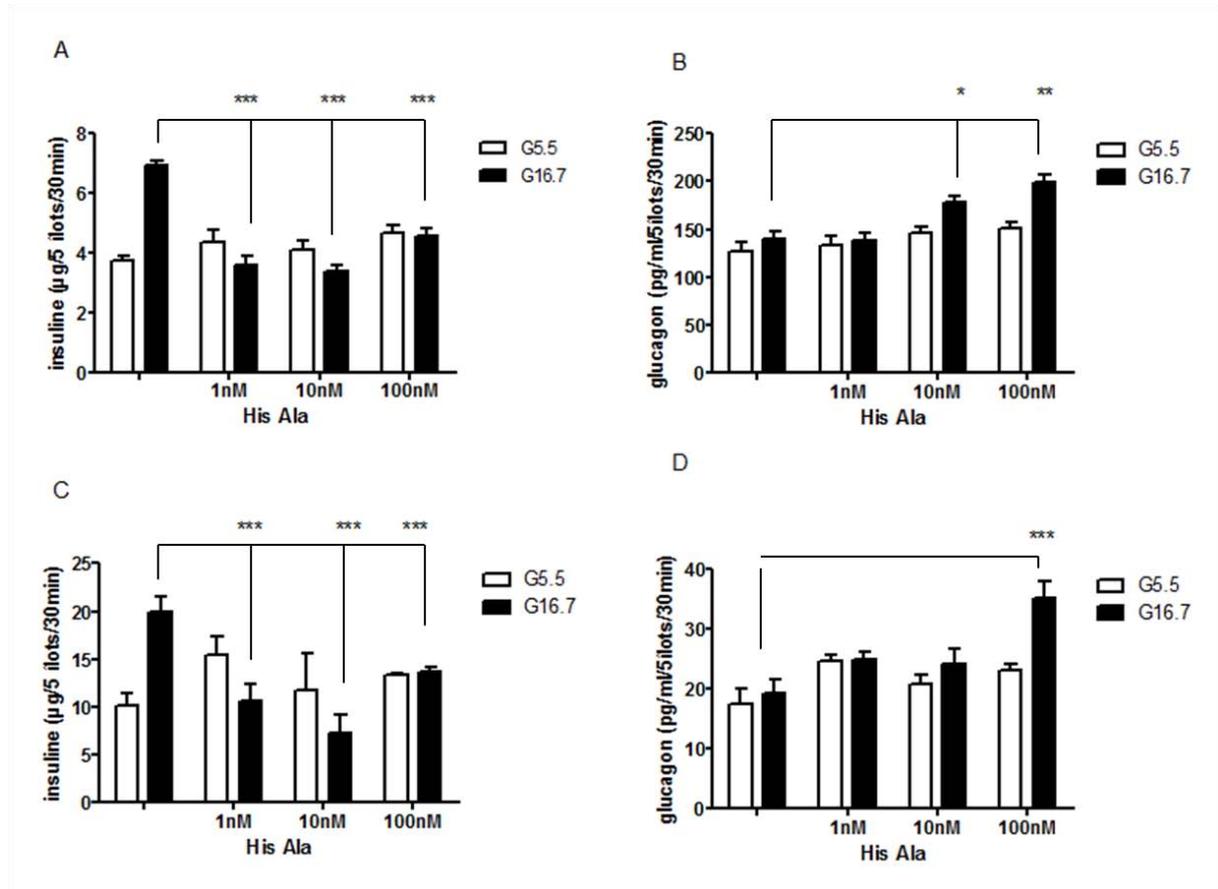


Figure 6 : sur des îlots murins (A,B) et humains (C,D) **A,C)** sécrétion d'insuline ($\mu\text{g}/5\text{îlots}/30\text{min}$), **B,D)** sécrétion de glucagon en condition basale (G5.5mM) ou stimulée (G16.5mM) par le glucose.

Conclusion

Sur les îlots murins et humains, l'His-Ala induit une diminution de la sécrétion d'insuline et une augmentation de la sécrétion de glucagon en présence de glucose.

Ces résultats sont donc similaires à nos données *in vivo*.

B/ Etude du contrôle de la glycémie par une concentration élevée de sitagliptine (40mg) qui induit une concentration élevée de GLP-1 (7-37) dans la sphère entéro-portale

1. Effet de la sitagliptine sur la régulation de la glycémie et de l'insulinémie.

a. Effet d'une administration orale d'une forte dose de sitagliptine sur la glycémie

Des souris saines, âgées de 11 semaines, sont gavées avec 200µl de sitagliptine à 40mg ou de l'eau, 30 minutes avant une charge orale en glucose (2g/kg ; 30%). Après vérification de l'effet de la sitagliptine sur la concentration du GLP-1 dans la veine porte et l'inhibition de l'activité de la DPP-IV, nous avons déterminé la glycémie et l'insulinémie au cours du temps.

Dès les premières minutes qui suivent la charge orale en glucose, la sitagliptine a induit une augmentation de la concentration du GLP-1(7-37) dans le sang portal qui est 5 fois supérieure à celle des souris témoins (figure 7A). Cette augmentation est conservée au cours du temps. L'activité de la DPP-IV dans le sang circulant, la veine porte et les différents segments de l'intestin est inhibée de 50%, 15 minutes après la charge orale en glucose (figure 7B, C).

Après une charge orale en glucose, la sitagliptine contrôle très efficacement la glycémie (figure 7D). En effet, les valeurs de glycémie oscillent autour de 200dg/ml (11,1mM) alors que les souris témoins présentent un pic de glycémie à 300dg/ml (16,6 mM) 15 minutes après la charge orale en glucose.

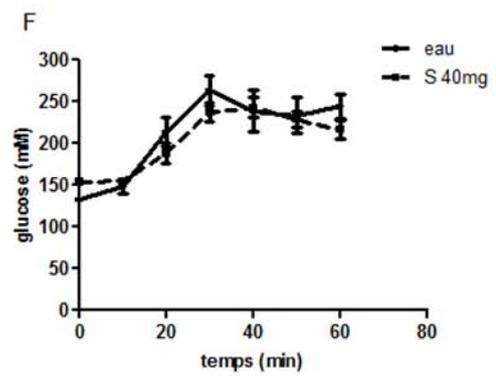
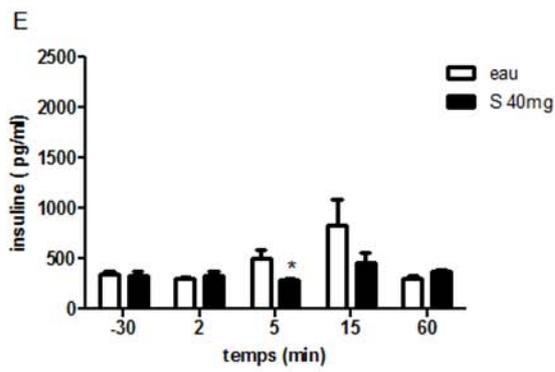
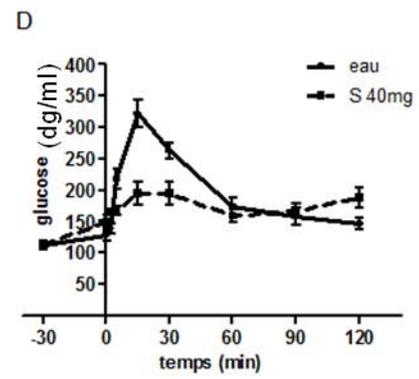
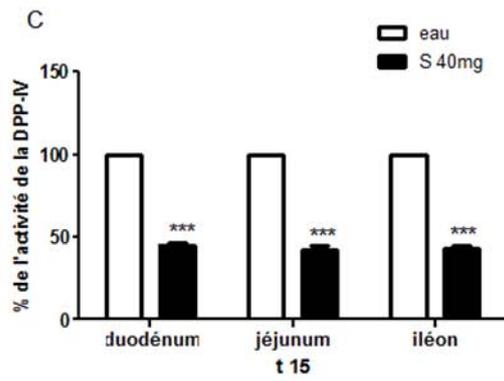
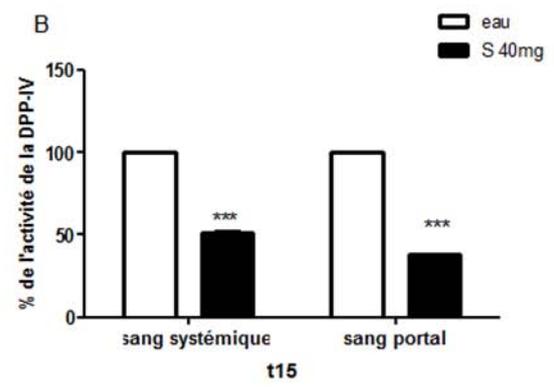
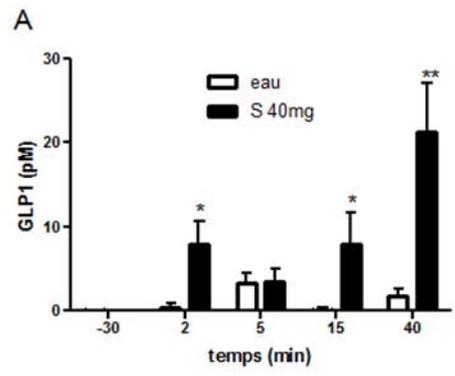
Lors de ce test de tolérance au glucose, l'insulinémie des souris traitées à la sitagliptine n'augmente pas au cours du temps et est diminué au temps t5 (figure 7E).

Conclusion

Avec une dose de 40mg de sitagliptine, l'activité de la DPP-IV est inhibée de 50%. Par discussion avec des pharmacologues de Merck, le dosage de l'activité de la DPP-IV aurait 40-50% de non spécifique. Notre dose de sitagliptine peut donc être considérée comme

optimale pour maximiser l'inhibition de la DPP-IV. Cette inhibition de la DPP-IV a favorisé l'augmentation de la forme active du GLP-1 dans le sang portal ce qui a induit un effet non hyperglycémiant. Cette glycémie faible au cours du temps n'est donc pas accompagnée d'une augmentation de l'insulinémie.

Néanmoins le GLP-1 est connu pour être une hormone insulino trope. Donc dans des conditions d'hyperglycémie, la sitagliptine à 40mg peut-elle induire une augmentation de la sécrétion d'insuline ?



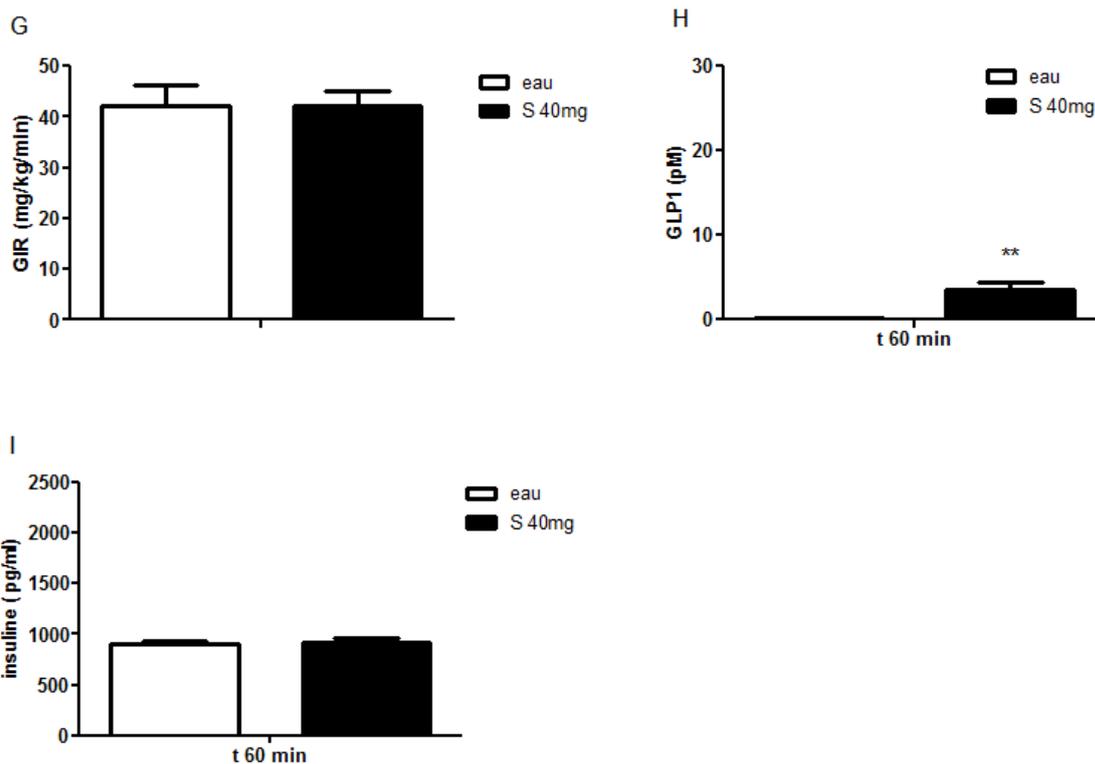


Figure 7 : sur des souris gavées à l'eau (trait plein, barre blanche) ou avec de la sitagliptine (S40mg, trait haché, barre noire) **A**) concentration plasmatique de GLP-1 (pM), **B**, **C**) % d'activité de la DPP-IV dans le sang portal (B) et différents segments de l'intestin (C), **D**) glycémie (mg/dl), **E**) insulïnémie (pg/ml) après une charge orale en glucose. **F,G,H,I**) Au cours d'un clamp hyperglycémique réalisé par voie orale **F**) glycémie, **G**) débit de glucose perfusé (GIR; mg/kg/min), **H**) concentration plasmatique de GLP-1, **I**) insulïnémie.

b. Effet de la sitagliptine (40mg) sur l'insulïnémie dans des conditions d'hyperglycémie.

Des souris sont gavées 30 minutes avant le début du clamp hyperglycémique avec de la sitagliptine (40mg) ou de l'eau. Un clamp hyperglycémique à 250mg/dl (14mM) pour lequel le glucose est administré par voie orale est réalisé pendant une heure afin de pouvoir comparer pour une même glycémie, l'insulïnémie des deux groupes. La condition d'hyperglycémie permet d'analyser la sécrétion endogène d'insuline et de favoriser la sécrétion entérique de GLP-1 (214). Au terme de ce clamp, le sang est prélevé à la veine

caudale pour mesurer l'insulinémie et, à la veine porte pour estimer la concentration de GLP-1.

Après une heure de clamp hyperglycémique (figure 7F), pour des débits de perfusion de glucose (GIR) identiques dans les deux groupes (figure 7G), l'augmentation de GLP-1 (figure 7H) induite par la sitagliptine n'est pas corrélée à une augmentation de l'insulinémie (figure 7I).

Conclusion

Les résultats suggèrent qu'à forte concentration, le GLP-1(7-37) présent dans le sang portal n'est plus insulino-trope.

D'autre part, le GLP-1 est connu pour ralentir la vidange gastrique. Puisque le GIR des souris traitées à la sitagliptine est le même que celui des souris témoins, nous pouvons suggérer que la sitagliptine n'a pas d'effet sur la vidange gastrique. Dans la figure 6A, l'effet non hyperglycémiant en présence de l'agent pharmacologique ne serait donc pas dû à un retard d'absorption du glucose par les entérocytes.

A cette dose de sitagliptine, l'effet sur la glycémie est-il bien dû au GLP-1 ?

2. La régulation de la glycémie par la sitagliptine 40mg est-elle due au GLP-1 ?

Pour s'assurer que l'effet non hyperglycémiant induit par l'administration orale de sitagliptine est bien dépendant du GLP-1, nous avons perfusé un antagoniste au récepteur au GLP-1, l'exendine 9. Celui-ci a été administré par la veine fémorale ou veine splénique respectivement à 0,1nmol/kg/min ou 0,5pmol/kg/min, 45 minutes avant l'administration orale de glucose et durant les deux heures qui suivent. Le gavage avec de la sitagliptine est toujours fait 30 minutes avant le gavage de glucose.

L'administration d'exendine 9 dans le sang circulant nous permet d'inhiber l'ensemble des récepteurs systémiques au GLP-1. Ainsi, en présence de cet agent pharmacologique, l'effet non hyperglycémiant induit par la sitagliptine est reversé ; la glycémie atteint 225mg/dl (12,5mM) 30 minutes après la charge orale en glucose (figure 8A).

L'administration de l'exendine 9 dans la veine splénique nous a permis de préciser l'implication des récepteurs au GLP-1 dans la veine porte, nécessaire à l'activation du sensor portal au glucose, (figure 8B). Ainsi, l'effet non hyperglycémiant induit par la sitagliptine est altérée par la perfusion d'exendine 9 au cours du temps. D'autre part, l'injection de cet antagoniste dans la veine splénique n'a pas modifié l'insulinémie par rapport aux souris traitées uniquement à la sitagliptine (figure 8C).

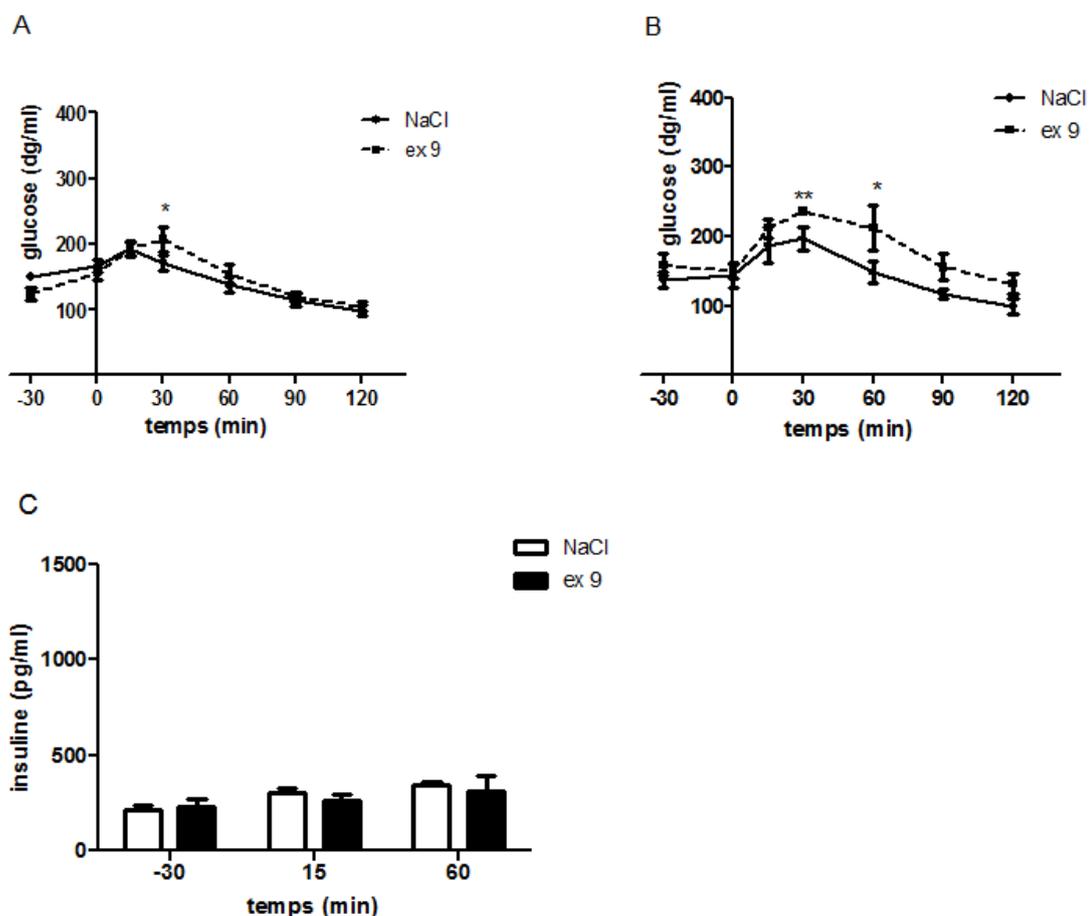


Figure 8: Des souris gavées à la sitagliptine 40mg ont été perfusées avec une solution de NaCl (trait plein, barre blanche) ou d'exendine 9 (trait haché, barre noire) administrée par

voie intraveineuse (A) ou par la veine splénique (B,C), **A,B** glycémie, **C** insulïnémie (pg/ml) suivies après une charge orale en glucose.

Conclusion

L'effet non hyperglycémiant induit par la sitagliptine 40mg est du, au moins en partie, au GLP-1 (7-37) qui recrute les sensors au glucose de la veine porte. L'activation du système porte régule la glycémie indépendamment des hormones pancréatiques (101) ce qui est confirmé par l'absence d'effet de l'exendine 9 sur l'insulïnémie.

Pour confirmer ce résultat nous avons réalisé un test de tolérance au glucose par voie intraveineuse alors que la sitagliptine est toujours administrée par voie orale ce qui ne doit pas permettre la sécrétion de GLP-1.

3. L'effet de la sitagliptine sur la glycémie est-t-il uniquement du à un signal « GLP-1 entéro-portal » induit par la détection intestinale de glucose?

Lors d'exposition à de forte dose de sitagliptine et donc à une concentration élevée de GLP-1(7-37), l'effet non hyperglycémiant généré par cette hormone doit être dû à l'association d'effets entéro-portaux et systémiques. Nous nous sommes donc assurés que la sécrétion puis l'effet entéro-portal du GLP-1 intestinal était nécessaire à la régulation de la glycémie. Dans ce protocole le glucose sera donc administré par voie intraveineuse afin d'outrepasser la sécrétion de GLP-1 induit par le glucose détecté dans l'intestin. Il permettra aussi d'éviter ses effets sur l'axe « intestin-cerveau » et le système porte. Ainsi, des souris sont gavées avec de la sitagliptine (40mg) ou de l'eau 30 minutes avant une injection intraveineuse de glucose (2g/kg ; 30%). Les mêmes paramètres que ci-avant ont été mesurés.

En réponse à la charge orale en sitagliptine et à une charge intraveineuse de glucose, le profil glycémique de ces souris est similaire à celui des souris contrôles, qui présentent un pic glycémique à 600dg/ml (33mM) (figure 9A). Les insulïnémies, mesurées au cours du temps, des souris traitées à la sitagliptine sont identiques à celles des souris témoins (figure 9B). En

revanche, la concentration de GLP-1 est augmentée dès deux minutes et est conservée comme dans les conditions du test de tolérance par voie orale (figure 9C).

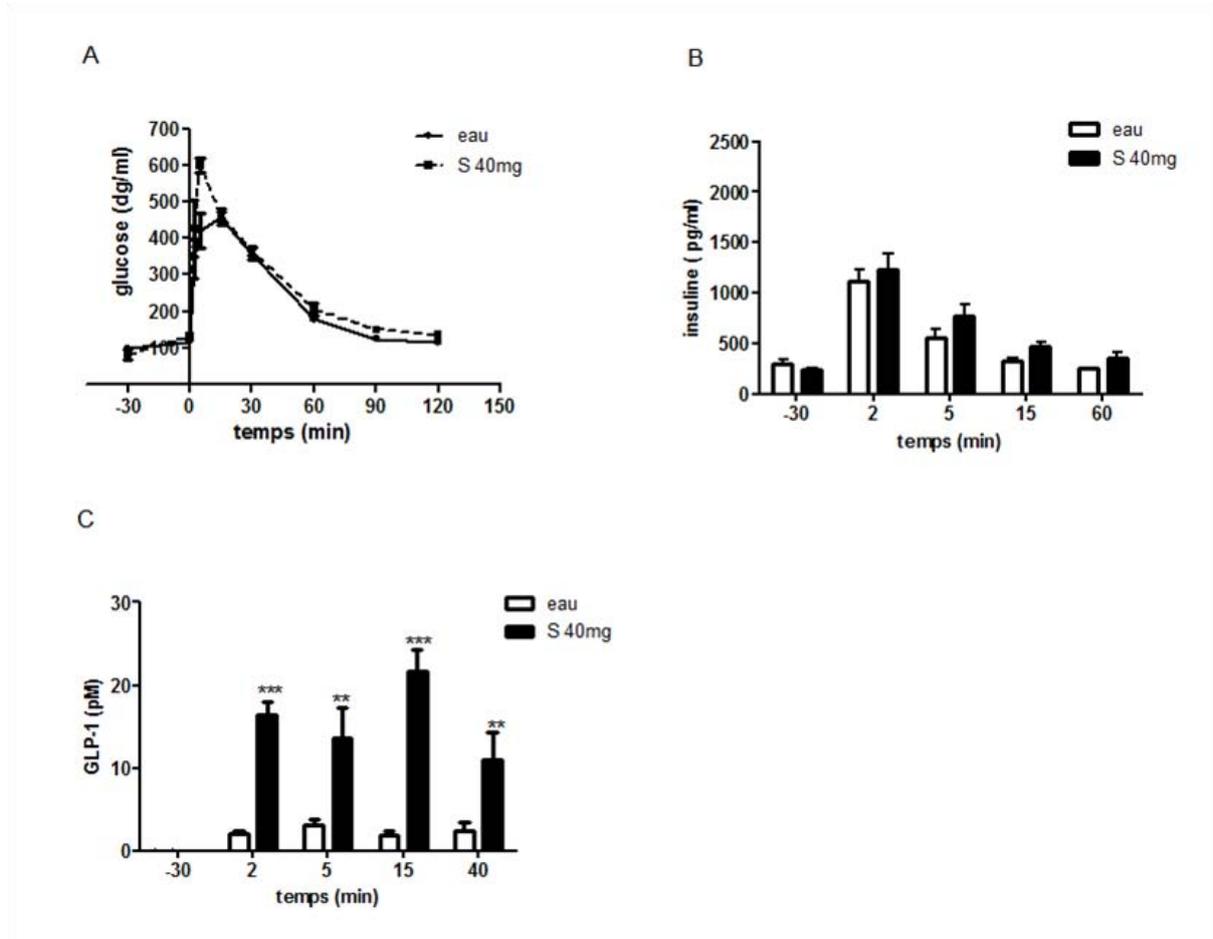


Figure 9: Sur des souris gavées à l'eau (trait plein, barre blanche) ou à la sitagliptine (S40mg, trait haché, barre noire) **A)** glycémie (dg/ml), **B)** insulïnémie (pg/ml), **C)** concentration plasmatique de GLP-1 (pM) après une injection intraveineuse de glucose.

Conclusion

Lorsque la sitagliptine est administrée par voie orale mais que le glucose est injecté par voie intraveineuse, elle n'induit pas d'effet sur la glycémie. L'effet non hyperglycémiant induit par la sitagliptine est donc dépendant d'une stimulation entérique par le glucose qui recruterait uniquement les senseurs au glucose de la veine porte. Cependant, en absence de

détection entérique de glucose, la sitagliptine a favorisé la sécrétion et la stabilisation de la forme (7-37) du GLP-1. La sitagliptine à forte dose aurait donc une activité propre qui active la sécrétion de GLP-1. Néanmoins, cette sécrétion de GLP-1 n'a pas généré de régulation de la glycémie. L'effet du GLP-1 entérique semble donc être dépendant d'un gradient artérioveineux du glucose.

Dans ces conditions d'absence d'élévation de la glycémie en réponse à une charge orale en glucose, le GLP-1 cérébral est-il recruté ?

4. L'effet non hyperglycémiant induit par la sitagliptine recrute-t-il le GLP-1 cérébral ?

Selon le même protocole que précédemment, une solution d'exendine 9 ou contrôle est perfusée à 0,5pmol/kg/min, dans les ventricules latéraux, en présence de sitagliptine et de glucose qui sont administrés par voie orale.

L'exendine 9 n'a pas eu d'effet sur la glycémie par rapport aux souris traitées avec une solution contrôle (figure 10).

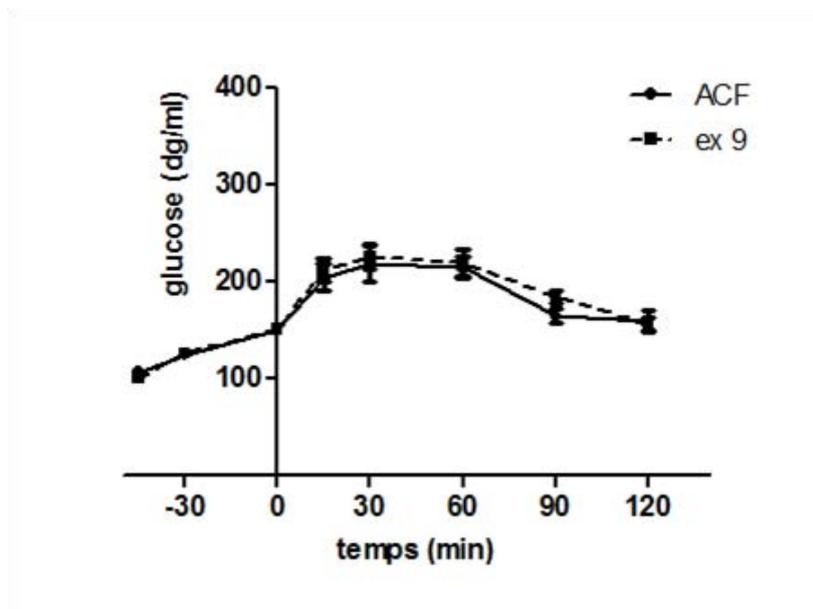


Figure 10: Sur des souris gavées à la sitagliptine 40mg, perfusées par voie intracérébroventriculaire d'une solution contrôle (ACF, trait plein) ou d'exendine 9 (trait haché) un test de tolérance au glucose est réalisé. La glycémie est suivie au cours du temps.

Conclusion

Le GLP-1 cérébral est connu pour agir en condition d'hyperglycémie. L'effet non hyperglycémiant induit par la sitagliptine n'a donc pas permis le recrutement du GLP-1 cérébral. Nous pouvons aussi supposer que les effets centraux ont été mineurs par rapport aux effets périphériques.

En présence de sitagliptine 4 μ g, la concentration de GLP-1 portal est faible et induit un effet pic glycémique à 300dg/ml (16,5mM) qui recrute le GLP-1 cérébral. Le contrôle de la concentration entéro-portale du GLP-1 par la DPP-IV serait donc un modulateur de la régulation de la glycémie nécessaire à l'activation de la signalisation induite par le GLP-1 cérébral.

Le contrôle de la glycémie et le recrutement du GLP-1 cérébral semble donc être dépendant de l'effet du GLP-1 sur la sphère entéro-portale qui véhiculent des messages nerveux aux

centres intégrateurs du cerveau. A forte dose de sitagliptine, il a donc été envisagé de voir l'activité du nerf vague en présence ou non de glucose administré par voie entérale.

5. La sitagliptine (40mg) modifie-t-elle la transmission du signal glucose véhiculé par l'axe « intestin-cerveau » et le système porte ?

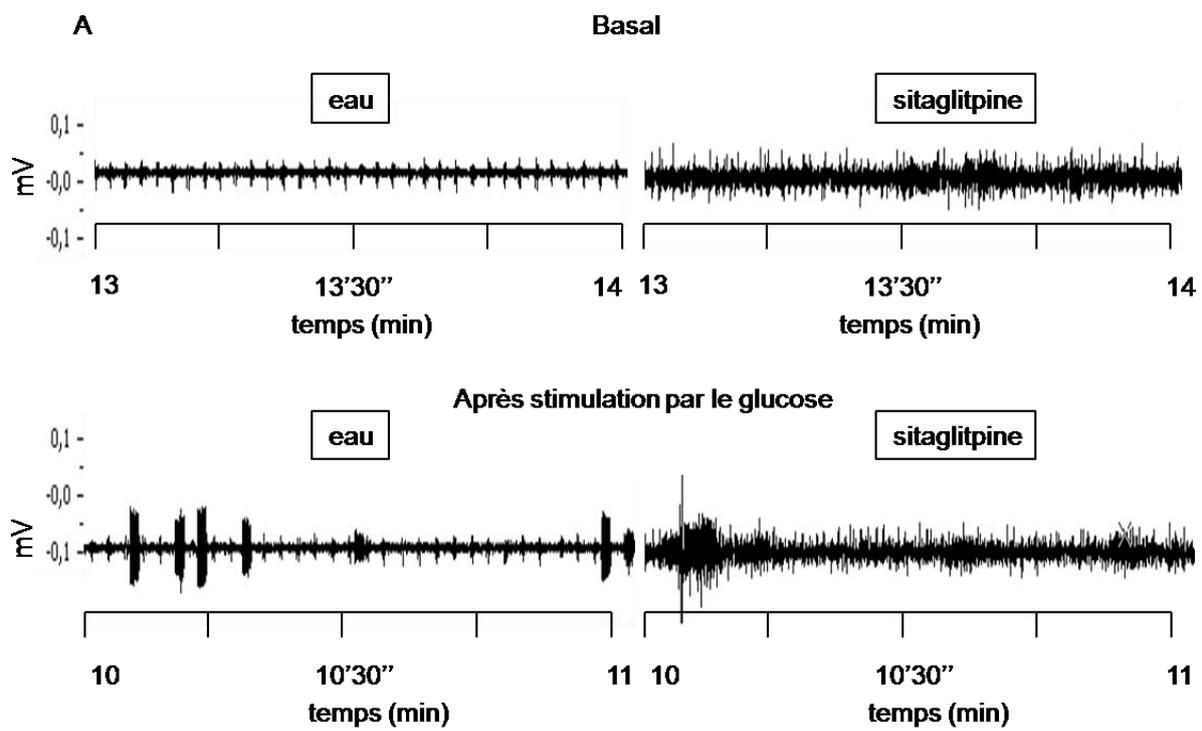
Après 6h de jeun, les souris sont gavées avec de l'eau ou de la sitagliptine (40mg). Les souris sont alors rapidement anesthésiées pour pouvoir placer une sonde sur le nerf vague situé à proximité de la carotide. La souris est placée sur une plaque chauffante pour maintenir sa température et, est mise dans la cage à Faraday. Une électrode est reliée à la sonde, une autre est placée sur la patte de la souris et, une dernière est fixée sur la cage. Ainsi, à l'aide d'un système d'amplification du signal, l'activité électrique du nerf vague est enregistrée sur l'ordinateur.

L'activité du nerf vague a été mesurée pendant 15minutes après cette chirurgie. Puis, une solution de glucose (2g/kg ; 30%) est infusée par le cathéter intragastrique qui leur a été mis une semaine avant cette expérimentation. Ainsi, nous avons enregistré l'activité du nerf vague pendant 30 minutes.

La sitagliptine (figure 11A, droite) augmente l'activité nerveuse (figure 11A, B) par rapport aux souris témoins (figure 11A, gauche) avant (figure 11A haut, B) et après la stimulation au glucose (figure 11A bas, C). Ainsi, les souris traitées à la sitagliptine présentent des bouffées de potentiels d'action plus diffus par rapport à l'enregistrement très net des souris traitées à l'eau.

Conclusion

Sur des souris anesthésiées, la sitagliptine à forte dose a perturbé la transmission nerveuse du signal véhiculé par le nerf vague qui est stimulé par le glucose. Ceci renforce l'idée que l'effet du GLP-1 endogène est dépendant de l'axe « intestin-cerveau » et du système porte pour réguler la glycémie.



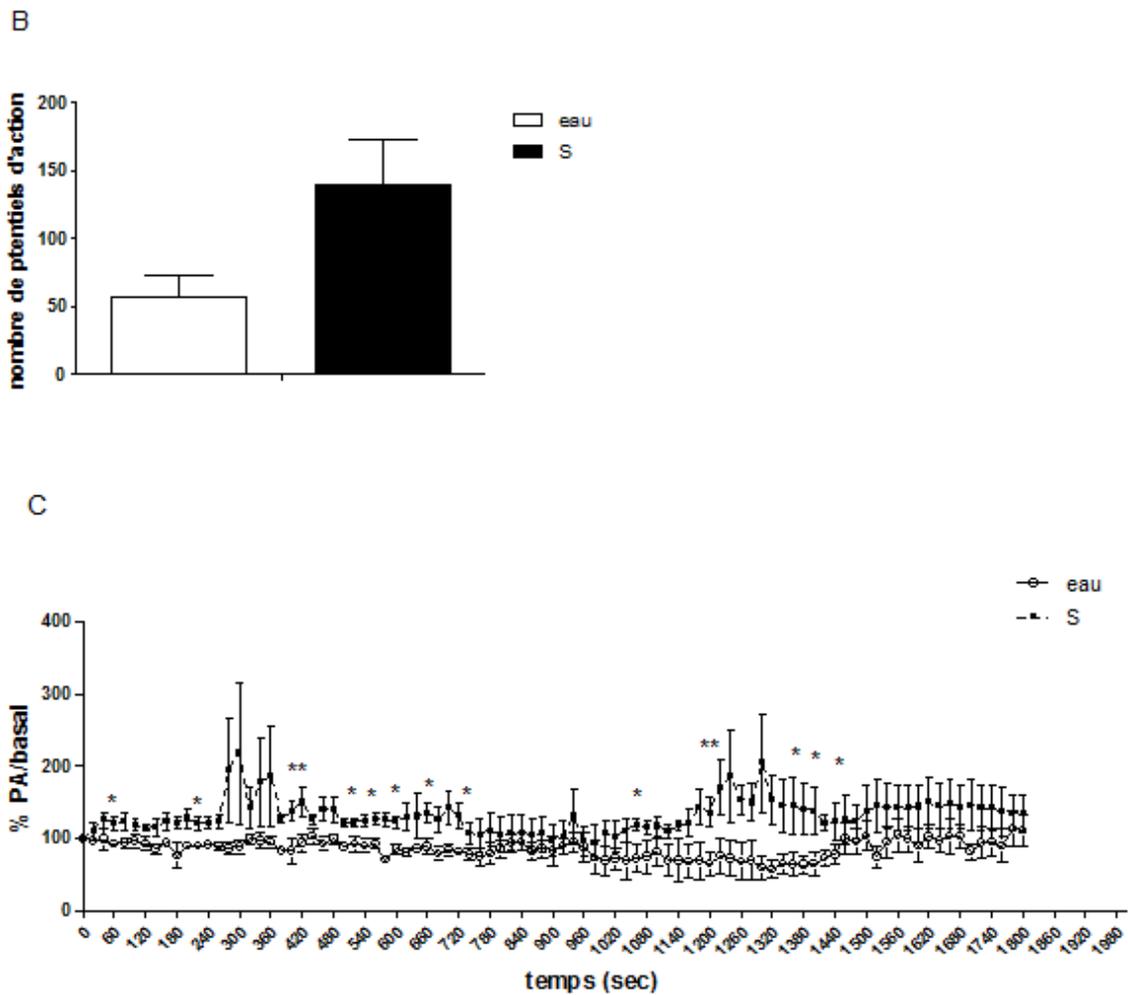


Figure 11: Chez des souris gavées à l'eau (droite, barre blanche, rond vide) ou la sitalgiptine 40mg (gauche, barre noire, carré noir), **A**) enregistrement de l'activité du nerf vague avant (haut) ou après (bas) stimulation par le glucose, **B**) nombre de potentiel d'action enregistré sur 15 minutes avant la stimulation par le glucose, **C**) % de potentiels d'action après stimulation par le glucose par rapport à la condition basale.

DEUXIEME PARTIE

La transmission des messages nerveux et hormonaux de l'intestin sont dépendants de stimuli nutritionnels. Les lipides sont des stimuli qui favorisent la sécrétion de certaines hormones telles que le GLP-1. Néanmoins, lors de longue exposition, ils peuvent devenir toxiques pour les cellules. Or, l'intestin semble être un organe essentiel dans la régulation de la glycémie. Quel est donc l'impact des lipides sur le sensing entérique du glucose après une exposition de 24h ?

A/ Quelle est la réponse métabolique induite par le sensing intestinal au glucose lorsque seul l'intestin ou le cerveau a détecté une forte dose de lipides, perfusés en continu sur 24h ?

1. Vérification du protocole

Des souris saines, males, âgées de 11 semaines, ont été incisées sur la partie haute de l'estomac ou dans la carotide pour placer un cathéter (figure 12). Après une semaine de récupération, les souris sont mises à jeun pendant 6h avant d'être perfusées pendant 24h par une solution de lipides (intralipid, IL) ou d'une solution isocalorique (isocal). La valeur énergétique des perfusions est de 18kcal/24h ce qui correspond au nombre de calories ingérées par des souris qui sont nourries par un régime riche en lipides (70% de lipides). Ainsi, la composition nutritionnelle est non la quantité d'énergie est comparable.

A la fin des perfusions, les souris sont détachées de leur système de perfusion pour réaliser différents tests métaboliques ainsi que différentes analyses moléculaires et biochimiques.

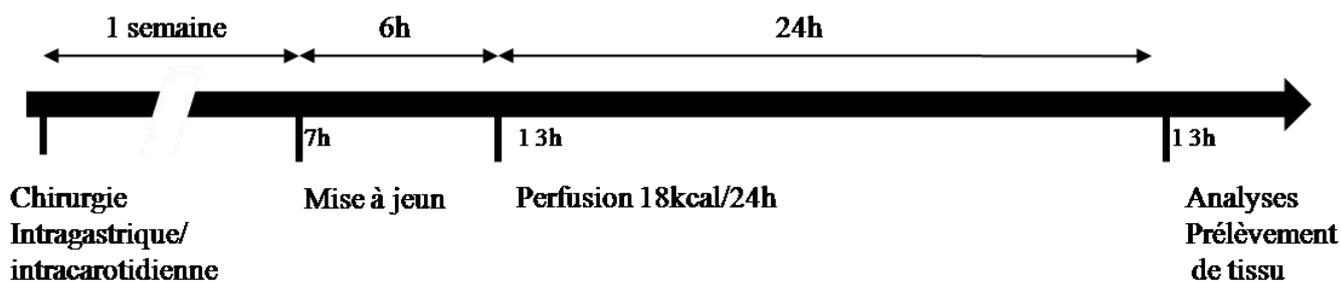


Figure 12 : présentation du protocole expérimental

Pour vérifier que seul l'intestin ou le cerveau a détecté la charge de lipides, 20µl de sang ont été prélevés à la veine caudale des souris avant et après les perfusions pour déterminer la concentration plasmatique des acides gras et des triglycérides.

Après 24h de perfusion d'intralipid (IL) dans l'intestin, la concentration plasmatique des acides gras libres n'a pas augmenté par rapport aux souris perfusées avec une solution isocalorique (isocal). La concentration plasmatique des triglycérides est augmentée chez les souris perfusées avec la solution de lipides (figure 13). De la même manière lorsque les lipides sont perfusés par la carotide pour arriver au cerveau, les taux d'acides gras et de triglycérides ne sont pas augmentés (données non montrées).

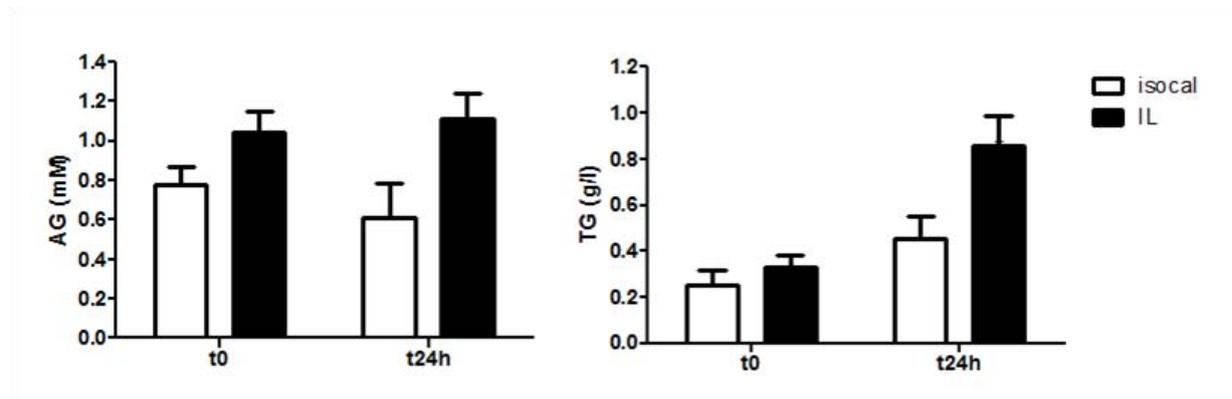


Figure 13 : Concentration plasmatique des AG (mM) et des triglycérides (g/l) avant (t0) et après (t24h) la perfusion de solution isocalorique (isocal, blanc) ou d'intralipid (IL, noir).

Conclusion

Le protocole de perfusion intragastrique ou intracarotidienne de lipides est donc validé puisque les acides gras ne sont détectés que par les cellules concernées, à savoir les cellules intestinales ou cérébrales.

2. Quelles est la réponse métabolique induite par le sensing entérique au glucose lorsque seul l'intestin a détecté une forte charge en lipides ?

Après 24h de perfusion d'IL ou de solution isocalorique, les souris sont laissées au repos 20min avant l'administration orale d'une charge en glucose (2g/kg ; 30%). La glycémie est relevée à la fin de la perfusion (t-20) et durant le test de tolérance au glucose. Un capillaire de sang est prélevé à la veine caudale de la souris à la fin de la perfusion et 15 minutes après la charge orale en glucose pour déterminer l'insulinémie. Pour tester la sensibilité à l'insuline, une injection intrapéritonéale d'insuline (0.05 U/ml, 10µl/g) a été réalisée 20 min après la fin des 24h de perfusion. Ainsi, la glycémie a été mesurée au cours du temps.

D'autre part, sur un autre lot de souris, 300µl de sang est prélevé à la veine porte à la fin de la perfusion et 15 minutes après le gavage au glucose pour déterminer la concentration plasmatique de GLP-1.

Les deux groupes de souris ont une glycémie de 135dg/ml (7,5mM) après la perfusion et présentent un pic glycémique à 200dg/ml (12mM) après la charge orale en glucose (figure 14A). Les souris perfusées par la solution de lipides maintiennent leur glycémie à cette valeur. Elles présentent donc une intolérance au glucose. De plus, elles ont une insulinémie qui est augmentée 15 minutes après le gavage au glucose par rapport aux souris contrôles (figure 14B) bien que leur profil glycémique soit faiblement décroissant après l'administration d'insuline (figure 14C).

Conclusion

La détection intestinale d'une forte dose de lipides par l'intestin induit une intolérance au glucose et une perte de la sensibilité à l'insuline . L'augmentation d'insuline est accompagnée d'une augmentation exacerbée de GLP-1. Une explication serait que les lipides aient diminué l'activité de la DPP4 entérique dont le dosag est en cours d'analyse. L'augmentation de GLP-1 s'expliquerait donc par une forte sécrétion et / ou une inefficacité de la DPP-IV.

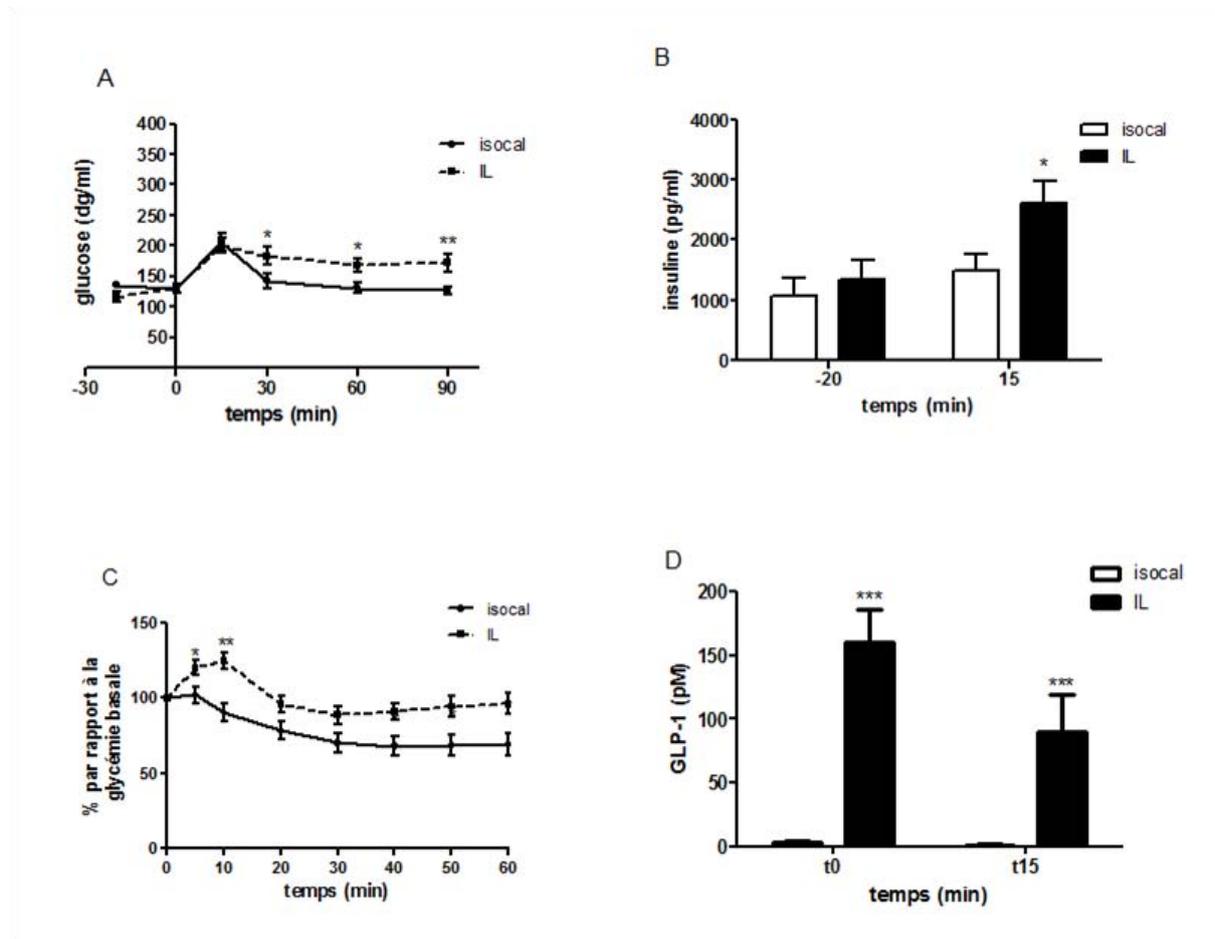


Figure 14 : sur des souris perfusées pendant 24 heures avec une solution isocalorique (isocal, blanc trait plein) ou d'intralipid (IL, noir, trait hachuré **A,B,D**) test de tolérance au glucose pour lequel différents paramètres sont relevés tels que la glycémie (dg/ml) (**A**), insulinémie (pg/ml) (**B**) et la concentration plasmatique de GLP-1 (**D**). **C**) Test de sensibilité à l'insuline où la glycémie est relevée au cours du temps (% par rapport à la glycémie basale).

3. Quelle est la réponse métabolique induite par le sensing entérique de glucose lorsque seul le cerveau perçoit une forte dose de lipides?

Sur des souris saines, un cathéter a été placé dans la carotide. Selon le même protocole que ci-avant (figure 11) les souris sont mises à jeun pendant 6 heures et sont ensuite perfusées pendant 24 heures avec une solution d'intralipid à 18 kcal ou de NaCl (0,9%). Les souris témoins sont perfusées avec une solution de NaCl qui mime une situation physiologique. A la

fin des perfusions, nous avons réalisé un test de tolérance au glucose et un test de sensibilité à l'insuline.

Les profils glycémiques (figures 15A) les insulinémies (figure 15B) des souris traitées aux lipides ne sont pas différents de ceux des souris témoins. La tolérance à l'insuline est identique dans les deux groupes (figure 15C).

Conclusion

Le sensing entérique de glucose de souris dont seul le cerveau détecte une forte charge en lipides n'induit pas d'intolérance au glucose. Ces souris présentent une sécrétion et une tolérance à l'insuline identique à celles des souris témoins. Ainsi, seules des modifications par les lipides du sensing entérique au glucose et plus largement de l'axe « intestin-cerveau » seraient donc responsables d'une intolérance au glucose. Les signaux qui arrivent aux centres intégrateurs du cerveau tels que le tronc cérébral et l'hypothalamus semblent donc être sous le contrôle de l'information provenant de l'axe « intestin-cerveau ».

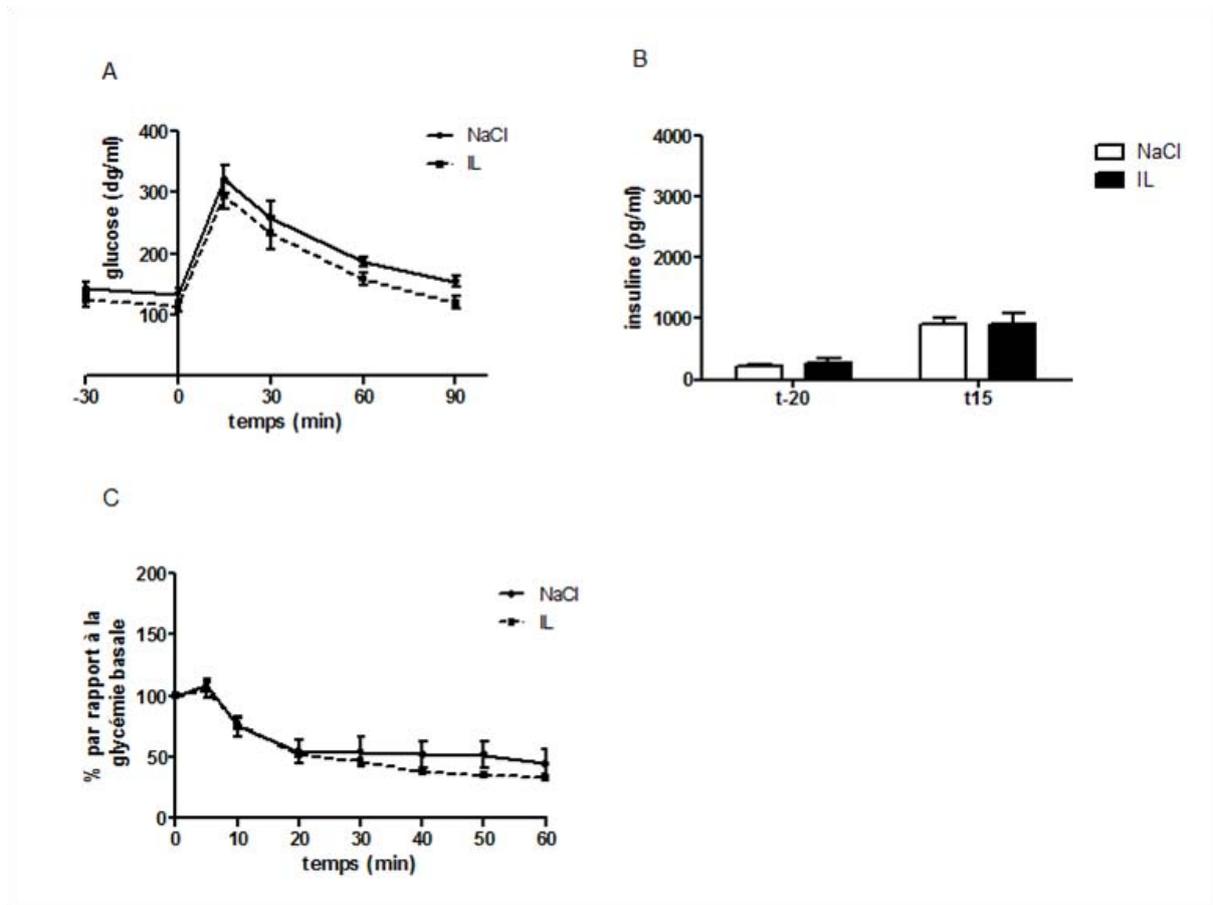


Figure 15 : Chez des souris perfusées pendant 24h par la carotide avec une solution de NaCl (blanc, trait plein) ou d'intralipid (IL, noir, trait hachuré) **A**) la glycémie (dg/ml) , **B**) l'insulinémie (pg/ml) sont déterminées lors d'un test oral de tolérance au glucose. **C**) le pourcentage de diminution de la glycémie par rapport à la glycémie déterminée à t0 est mesuré lors du test de tolérance à l'insuline (ITT).

B/ Quels sont les mécanismes moléculaires responsables de la perturbation de la détection au glucose par l'intestin ?

1. Description de l'intestin après 24h de perfusion intragastrique de lipides.

A la fin des 24h de perfusions, les différents segments de l'intestin sont prélevés et congelés pour extraire le contenu lipidique par la technique de Folch afin de déterminer la concentration en acides gras.

Des échantillons du jéjunum ont permis de regarder par microscopie électronique la structure cellulaire de l'épithélium intestinal.

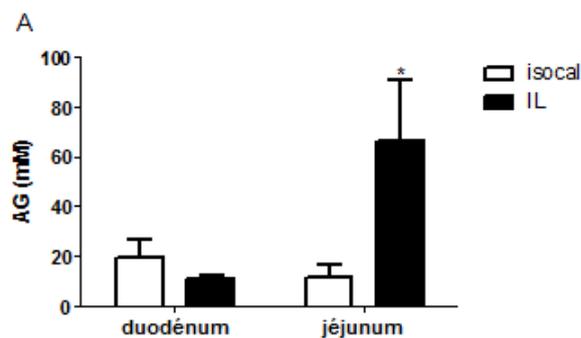
Les acides gras contenus dans l'intestin ne sont pas augmentés dans le duodénum des souris traitées aux lipides mais sont en plus forte concentration dans le jéjunum (figure 16A).

En microscopie électronique, le jéjunum des souris perfusées avec des lipides présente des gouttelettes lipidiques dans les cellules de l'épithélium intestinales (figure 16B).

Conclusion

Le jéjunum, qui est la partie absorptive des acides gras, semble capable de stocker les acides gras dans des gouttelettes à l'image des adipocytes. Cette réserve intestinale de lipides serait donc un rempart à la diffusion d'acides gras vers la circulation systémique.

Les acides gras sont connus pour induire un état d'inflammation notamment dans le tissu adipeux. Ils sont aussi susceptibles d'induire un stress oxydant relevé dans les neurones de l'hypothalamus. Ces deux paramètres seront donc étudiés ci-après.



B

Microscopie électronique

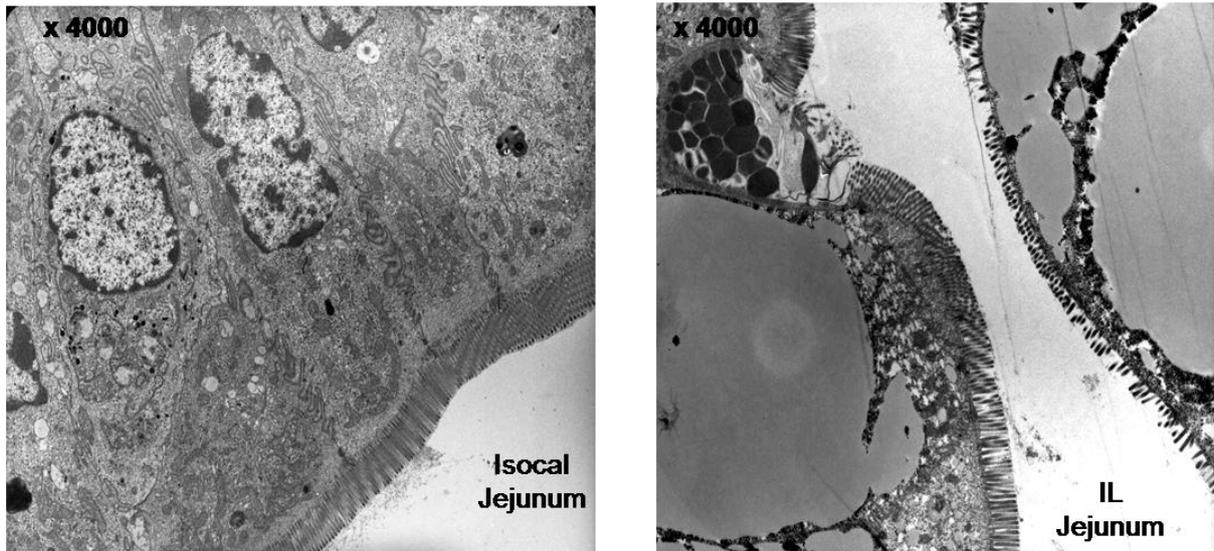


Figure 16 : Sur des souris perfusées pendant 24h avec une solution isocalorique (isocal, blanc) ou d'intralipid (IL, noir) **A)** contenu intestinal en acides gras (AG, mM) **B)** microscopie électronique de cellules intestinales de jéjunum (grossissement x4000).

2. Les lipides perturberaient-ils le système inflammatoire ?

A partir des échantillons de duodénum et de jéjunum prélevés à la fin des perfusions, nous avons quantifié, par PCR, l'expression de l'ARNm de gènes codant pour des facteurs inflammatoires, tels que PAI-1, TNF α , IL1 β , ainsi que l'expression de gènes codant pour les cellules immunitaires, CD3 et interféron γ .

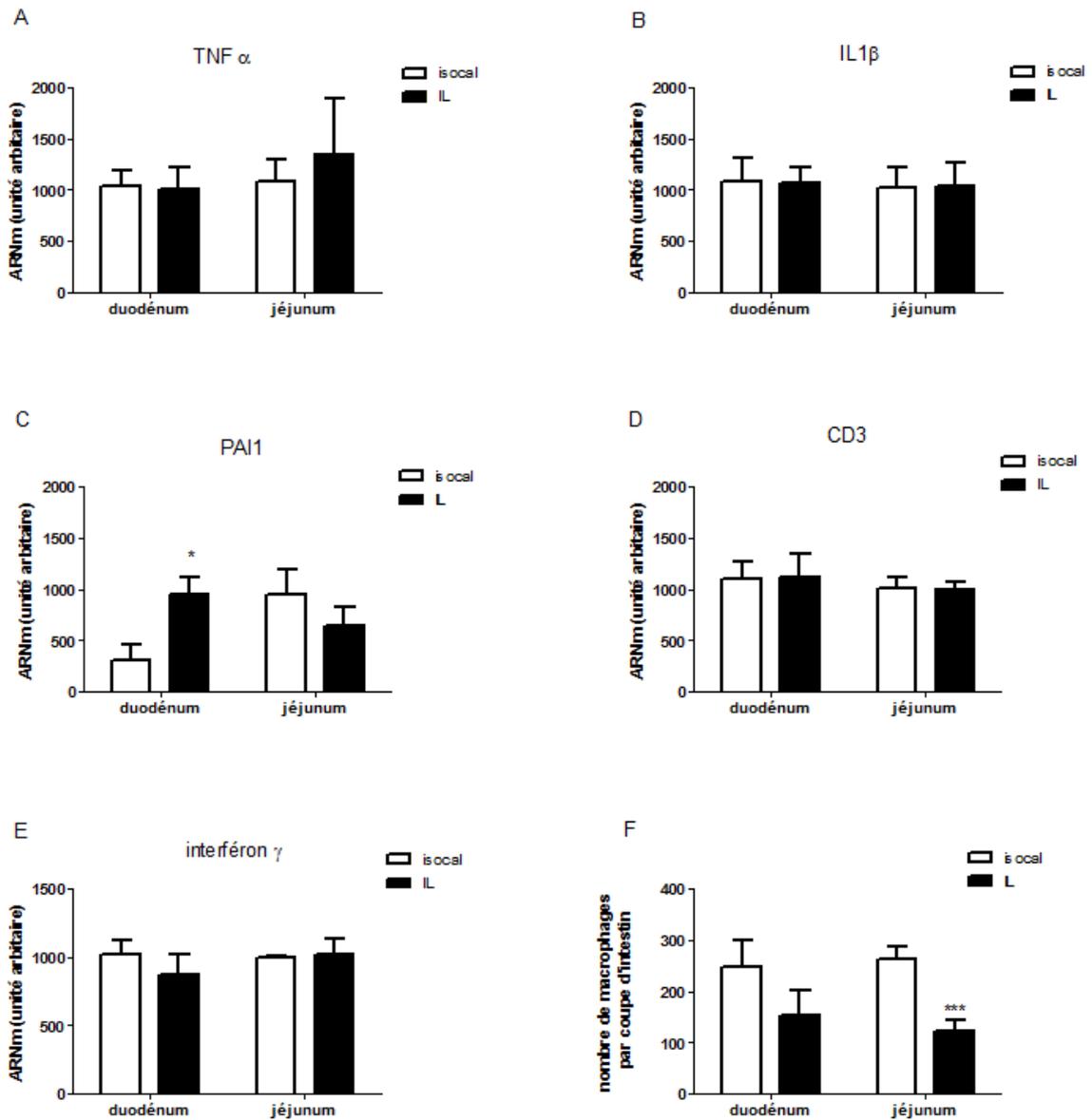
D'autre part, par immunohistologie, le marquage des macrophages par l'anticorps F4/80 a permis de déterminer le nombre de macrophages.

L'expression des ARNm codant pour les différents marqueurs de l'inflammation sont similaires dans les deux groupes (figure 17A,B,C). Dans le duodénum de souris traitées aux lipides, l'expression de l'ARNm de PAI-1 est augmentée. En présence de lipides, les marqueurs lymphocytaires, CD3 et interféron γ n'ont pas variés (figure 17D,E).

Le nombre de macrophages est diminué dans le duodénum et surtout dans le jéjunum de souris perfusées avec la solution de lipides (figure 17F,G).

Conclusion

Après une perfusion de 24h, une modification de l'expression génique des marqueurs de l'inflammation n'est pas perceptible. L'intestin est un tissu qui recrute 80% du système immunitaire inné. Le niveau basal d'expression des ARNm de ces marqueurs est donc peut être élevé. Le système immunitaire présent dans l'intestin aurait donc des réactions inflammatoires très forte en permanence étant donnée sa proximité avec l'environnement. Une variation de leur expression n'est donc peut être pas décelable. En revanche, la présence de lipides dans l'intestin diminuerait le recrutement des macrophages qui se localisent dans les cryptes ce qui révélerait un affaiblissement immunitaire.



G
immunohistologie, marquage F4/80



Figure 17: A la fin de 24h de perfusion intragastrique de solution isocalorique (isocal, blanc) ou d'intralipid (IL, noir) l'expression des ARNm codant pour les gènes (unité arbitraire) **A)** TNF α , **B)** IL1 β , **C)** PAI1, **D)** CD3, **E)** interféron gamma est déterminée. **F,G)** par marquage immunohistologique F4/80, le nombre de macrophages dans le jéjunum est comptabilisé.

3. Les lipides induisent-ils un stress oxydant dans l'intestin ?

A partir des ARN extraits des échantillons de duodénum et de jéjunum de souris traitées aux lipides ou avec une solution isocalorique, l'expression des ARNm codant pour des gènes du stress oxydant a été analysée. Ainsi, nous avons recherché l'expression de la NADPH oxydase qui est une enzyme pro-oxydante ainsi que la glutathion γ -S-transférase (GST) et, la catalase qui sont des enzymes anti-oxydantes.

A partir d'extraits protéiques de duodénum et de jéjunum des souris perfusées, nous avons pu analyser biochimiquement la peroxydation lipidique par le dosage de manoldialdéhyde (MDA) et, l'activité de la glutathion réductase. Ces analyses reflètent alors la balance oxydative.

L'expression de l'ARNm du gène codant pour la NADPH oxydase est augmentée chez les souris traitées par les lipides (figure 18A). En revanche l'expression des ARNm codant pour les enzymes anti-oxydantes similaire est dans les deux groupes de souris (figure 18B,C). Par analyse biochimique, la perfusion intragastrique avec une solution de lipides induit une augmentation de la concentration de MDA dans le duodénum et surtout dans le jéjunum ce qui reflète donc une augmentation de la peroxydation lipidique (figure 18D). D'autre part, l'activité de la glutathion réductase de ces souris est moins importante dans les deux parties étudiées de l'intestin (figure 18E,F).

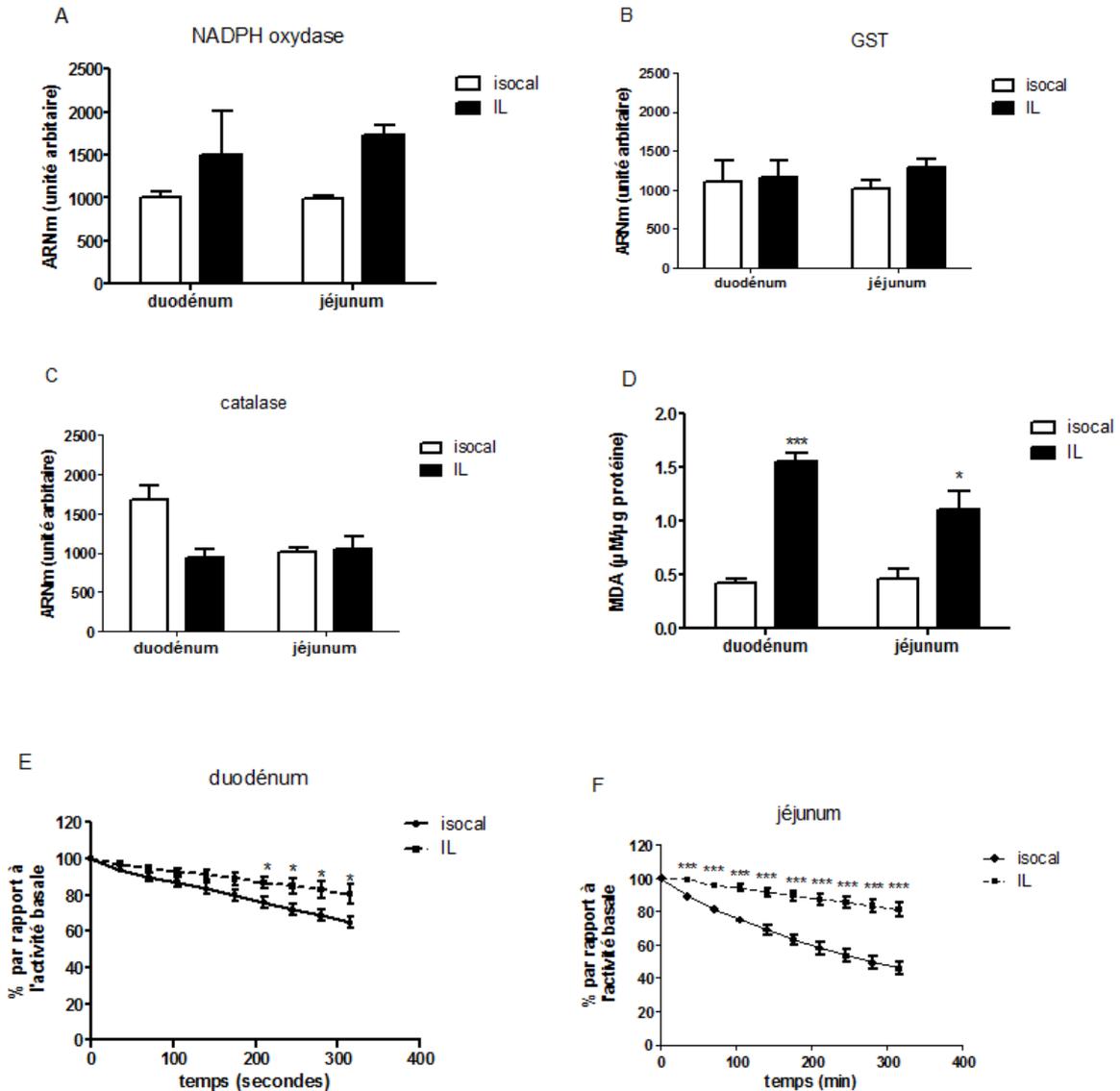


Figure 18 : sur des souris perfusées pendant 24h avec une solution isocalorique (isocal, blanc, trait plein) ou d'intralipid (IL, noir, trait hachuré **A,B,C**) l'expression de l'ARNm des gènes (unité arbitraire) codant pour la NADPH oxydase (**A**), la GST (**B**) et la catalase (**C**), **D**) quantité de MDA produit ($\mu\text{M}/\mu\text{g}$ de protéine), **E,F**) activité de la glutathion réductase (% par rapport à l'activité de basale) dans le duodénum (**E**) et le jéjunum (**F**).

Conclusion

Les lipides présents dans l'intestin ont favorisé le développement d'un stress oxydant révélé par l'augmentation de l'expression de l'ARNm d'une enzyme pro-oxydante, la NADPH

oxydase, et, la diminution de la l'activité de l'enzyme anti-oxydante, la glutathion réductase. Les lipides induisent aussi une peroxydation lipidique dans le duodénum et le jéjunum. Ce phénotype est-il une cause ou une conséquence à l'état diabétique décrit à 24h de perfusion intragastrique de lipides ? Pour cela nous avons analysé l'état oxydatif et le phénotype métabolique de souris perfusées par une solution d'IL ou une solution isocalorique pour une durée de 6 heures.

4. Après 6h de perfusion intragastrique, le stress oxydant induit par les lipides est-il déjà présent et altère-t-il la régulation de la glycémie ?

Des souris sont perfusées pendant 6 heures avec une solution d'intralipid ou une solution isocalorique à 18kcal afin de mesurer la peroxydation lipidique et l'activité enzymatique de la glutathion réductase à partir d'extraits protéiques de duodénum et de jéjunum.

Comme les procédures décrites ci-avant (figure 12) un test de tolérance au glucose par voie orale est réalisé et accompagné de la mesure de l'insulinémie.

Après 6 heures de perfusion, la concentration de MDA des souris traitées aux lipides est plus élevée que celle des souris contrôles (figure 19A). L'activité de la glutathion réductase n'est pas modifiée dans le duodénum mais est significativement diminuée dans le jéjunum des souris perfusées avec la solution d'intralipid (figure 19B,C).

Les profils glycémiques sont identiques dans les deux groupes (figure 19D) et, la sécrétion d'insuline est augmentée chez les souris perfusées avec la solution de lipides (figure 19E).

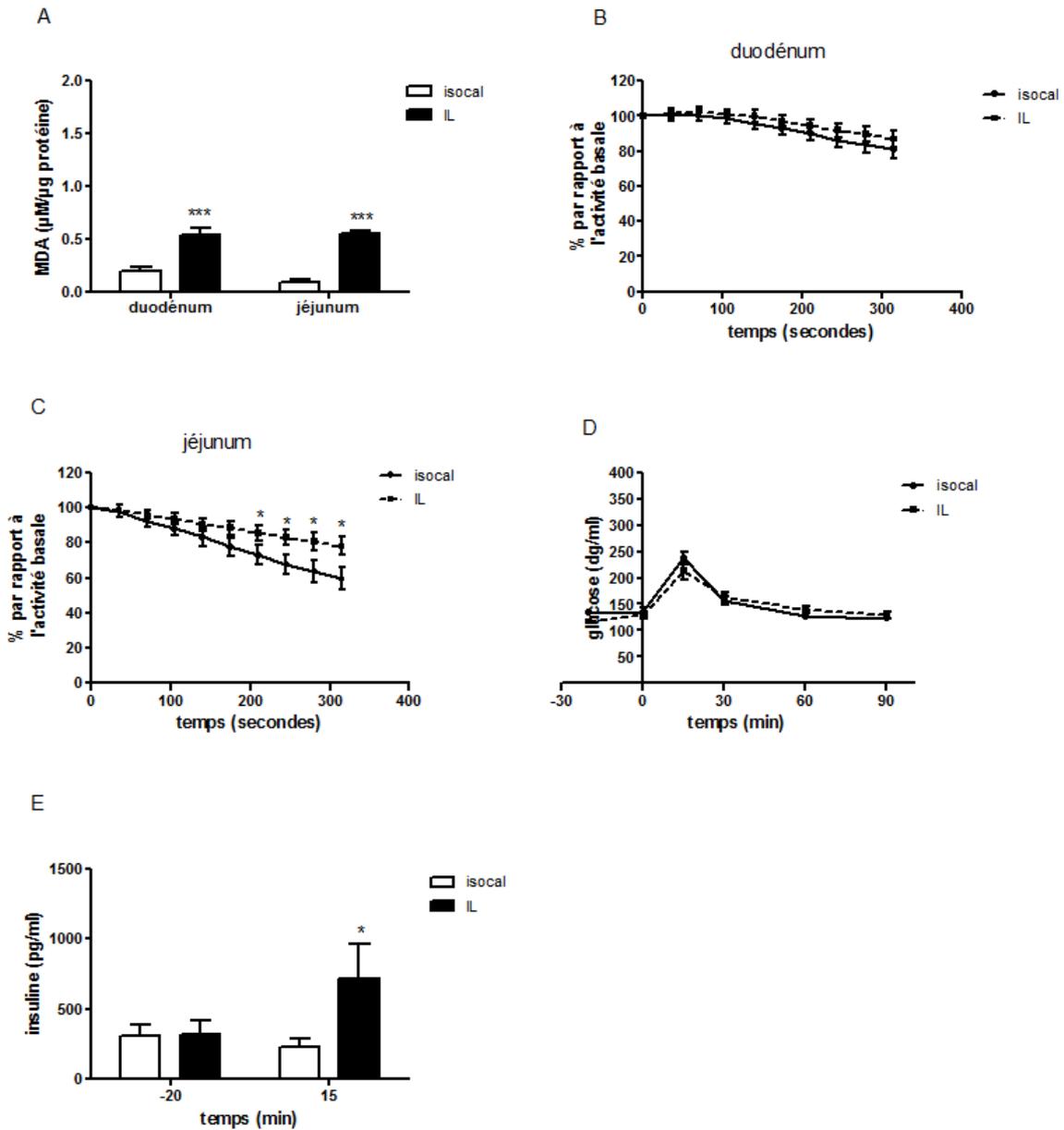


Figure 19 : Après 6 heures de perfusion de solution isocalorique (isocal, trait plein, barre blanche) ou d'intralipid (IL, trait haché, barre noire), **A**) dosage des TBARS (MDA, μM/μg de protéines), **B,C**) activité de la glutathion réductase (% par rapport à l'activité de base) dans le duodénum (**B**) et le jéjunum (**C**), **D**) glycémie (dg/ml), **E**) insuliniémie (pg/ml) après un test de tolérance au glucose par voie orale.

Conclusion

Après 6h de perfusion de lipides, les souris présentent une augmentation de la peroxydation lipidique qui n'a pas de conséquence sur la régulation de la glycémie. Néanmoins, les souris ont une sécrétion d'insuline plus élevée. La comparaison des effets des lipides après 6h et 24h de perfusion suggère que la peroxydation lipidique et le stress oxydant sont des événements moléculaires précoces qui altèreraient la sensibilité intestinale au glucose au cours du temps.

Il est donc nécessaire de vérifier que la peroxydation lipidique est une des causes de la perte de contrôle de la régulation de la glycémie par l'intestin.

5. La prévention de la peroxydation lipidique par l'aminoguanidine restaure-t-elle un contrôle de la glycémie et de l'insulinémie ?

a. Vérification préliminaire de l'effet de l'aminoguanidine sur la peroxydation lipidique et la concentration en lipides circulants.

Pendant la semaine de récupération des souris qui suit la chirurgie intragastrique les souris s'abreuvent d'une solution contenant ou non de l'aminoguanidine à 1g/kg/J dissoute dans 2ml d'eau. L'aminoguanidine est une molécule capable de prévenir la formation de produits avancés de glycation (AGE) et d'inhiber la NO synthase (294). Elle est donc utilisée dans la prévention de maladies cardiovasculaires ou neurologiques. Les souris sont ensuite perfusées avec la solution d'intralipid selon le protocole décrit ci-dessus (figure 12). A la fin des perfusions, des échantillons de duodénum et de jéjunum sont prélevés pour doser le MDA. 20µl de sang collectés à la veine caudale permettent de déterminer la concentration plasmatique des acides gras libres et des triglycérides.

En présence d'aminoguanidine, la concentration de MDA est diminuée dans le duodénum et le jéjunum de souris traitées aux lipides (figure 20A). L'aminoguanidine n'a pas augmenté la concentration plasmatique des acides gras et des triglycérides (figure 20B).

Conclusion

L'aminoguanidine a bien prévenu le développement de la peroxydation lipidique ce qui n'a pas favorisé le passage entérique des acides gras vers la lymphe puis le sang circulant. Ainsi, l'aminoguanidine semble avoir un effet uniquement sur la peroxydation lipidique développée dans l'intestin.

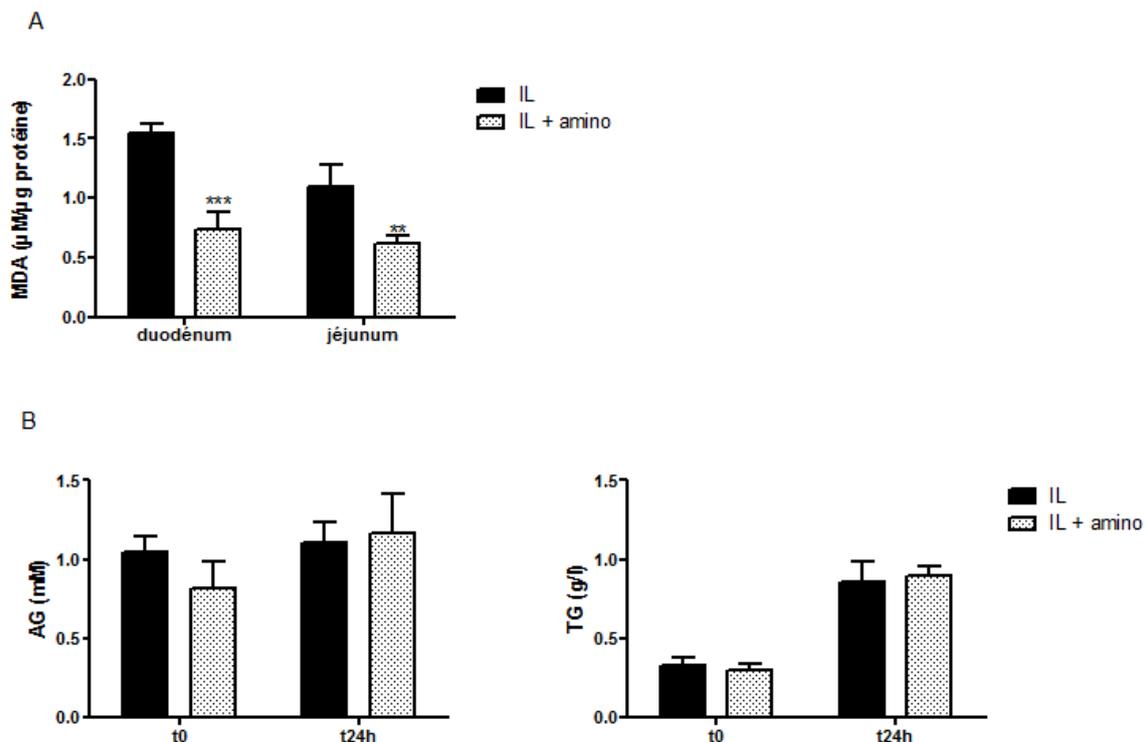


Figure 20: Après 24h de perfusion intragastrique de lipides précédés (IL+ amino, tacheté de gris) ou non (IL, noir) d'un traitement à l'aminoguanidine, **A**) la concentration de MDA ($\mu\text{M}/\mu\text{g}$ de protéines) et **B,C**) la concentration plasmatique des acides gras (mM) et des triglycérides (g/l) est mesurée.

b. Le traitement à l'aminoguanidine prévient-il l'état diabétique?

Comme décrit ci-avant (figure 11et, B/4.a), à la fin des perfusions, sur les souris perfusées avec la solution d'intralipid et traitées ou non à l'aminoguanidine un test de

tolérance au glucose est réalisé pour lequel la glycémie et l'insulinémie sont déterminées au cours du temps.

Pour analyser la sensibilité à l'insuline, la glycémie des souris est déterminée au cours du temps après une injection intrapéritonéale d'insuline.

Lorsque les souris sont traitées à l'aminoguanidine, les souris perfusées avec la solution d'intralipid ont une glycémie améliorée par rapport aux souris témoins (figure 21A). Le traitement pharmacologique a diminué la sécrétion d'insuline (figure 21B) et rétabli une meilleure tolérance à l'insuline (figure 21C).

Conclusion

L'aminoguanidine a prévenu l'intolérance au glucose et la perte de tolérance à l'insuline induite par les lipides ce qui est associé à une sécrétion d'insuline contrôlée.

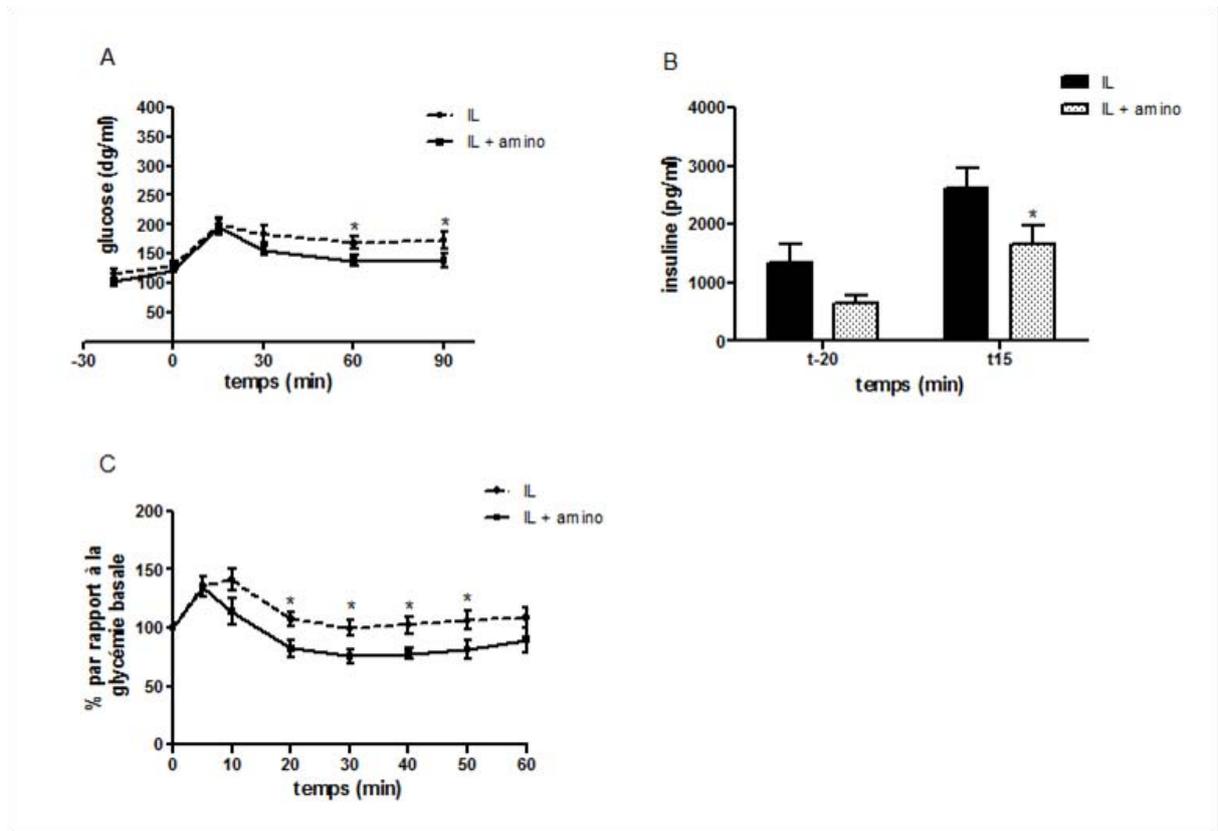


Figure 21 : Sur des souris traitées (IL + amino, tacheté de gris, trait plein) ou non (IL, noir, trait hachuré) à l'aminoguanidine, **A,B)** test de tolérance au glucose par administration orale pour lequel la glycémie (dg/ml) (A) et l'insulinémie (pg/ml) (B) sont déterminées. **C)** test de la tolérance à l'insuline pour lequel la diminution de la glycémie est rapportée à la glycémie mesurée à t0.

6. L'aminoguanidine a-t-elle un effet propre ?

Pour contrôler que l'aminoguanidine a un effet qui est dépendant des lipides nous avons réalisé ce même protocole en remplaçant la perfusion d'intralipid par une perfusion de la solution d'isocalorique.

Lorsque le traitement à l'aminoguanidine précède une perfusion de la solution isocalorique, la réponse au test de tolérance au glucose de ces souris est identique à celle des souris témoins (figure 22).

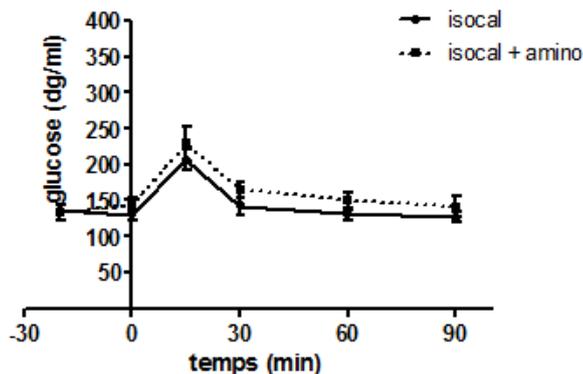


Figure 22 : test de tolérance au glucose sur des souris traitées (isocal + amino, trait en pointillé) ou non (isocal, trait plein) à l'aminoguanidine et qui ont été perfusées avec une solution isocalorique.

Conclusion

L'aminoguanidine n'a pas d'effet sur la régulation de la glycémie lorsque les souris sont perfusées avec la solution isocalorique. Et, comme la concentration plasmatique des acides gras n'est pas augmentée par le traitement à l'aminoguanidine (figure 19B), et diminue la peroxydation lipidique dans l'intestin (figure 20), nous pouvons conclure que cet agent agit donc uniquement sur la toxicité induite par les lipides qui génère un état diabétique.

7. Les lipides induisent-ils une peroxydation lipidique dans le cerveau après 24h de perfusion intracarotidienne ?

Le stress oxydant induit par les lipides est un évènement qui se déroule particulièrement dans les noyaux cérébraux notamment lors des maladies neurodégénératives (295-297). Nous avons donc analysé la peroxydation lipidique dans l'hypothalamus de souris

qui ont été perfusées par une solution d'intralipid par voie intracarotidienne et prétraitée ou non à l'aminoguanidine.

La peroxydation lipidique dans l'hypothalamus de souris perfusés avec la solution d'intralipid est 3 fois plus élevée que celle de souris perfusées par voie intragastrique (figure 23). L'aminoguanidine prévient cette oxydation cellulaire.

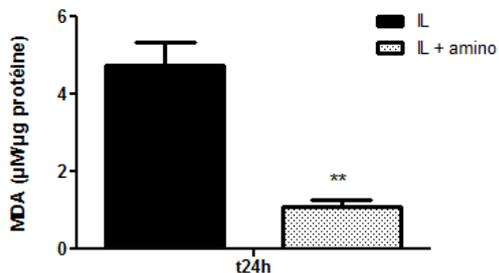


Figure 23 : Détermination de la concentration de MDA ($\mu\text{M}/\mu\text{g}$ de protéines) dans l'hypothalamus de souris qui ont été perfusées par la carotide pendant 24h avec une solution d'intralipid (IL) plus ou moins prétraitées à l'aminoguanidine (IL + amino)

Conclusion

Malgré une peroxydation lipidique plus importante dans l'hypothalamus des souris traitées par la perfusion d'intralipid, la régulation de la glycémie a été correctement contrôlée (figure 15A, 18D,23). Le message nerveux que les cellules sensibles au glucose émettent semble donc prédominant dans l'intégration du message nerveux efférent qui se forme dans les noyaux de l'hypothalamus.

La peroxydation lipidique et plus largement le stress oxydant altère donc uniquement le sensor intestinal au glucose qui régule l'homéostasie glucidique. Pour affiner le mécanisme d'action des lipides sur ce sensor, nous avons analysé l'impact de la toxicité des lipides sur la transmission nerveuse de l'axe « intestin-cerveau ».

C/ La peroxydation lipidique induite par les lipides affecte-t-elle la transmission entérique du signal glucose qui est transmis au cerveau par le nerf vague ?

L'activité du nerf vague a été mesurée sur des souris perfusées pendant 24h avec une solution d'intralipid ou isocalorique. Certaines souris ont aussi été prétraitées pendant une semaine à l'aminoguanidine avant d'être perfusées avec la solution de lipides. A la fin de la perfusion, les souris sont anesthésiées pour pouvoir placer une sonde sur le nerf vague situé à proximité de la carotide. La souris est placée sur une plaque chauffante pour maintenir sa température et, est mise dans la cage à Faraday. Une électrode est reliée à la sonde, une autre est placée sur la patte de la souris et, une dernière est fixée sur la cage. Ainsi, à l'aide d'un système d'amplification du signal, l'activité électrique du nerf vague est enregistrée sur l'ordinateur.

L'activité du nerf vague a été mesurée pendant 15 minutes après la perfusion. Une solution de glucose a ensuite été infusée par le cathéter intragastrique aux souris anesthésiées. L'enregistrement a duré 30 minutes.

Quelque soit la condition de perfusion, l'enregistrement de l'activité du nerf vague après la perfusion, dit « basal », a été similaire pour les trois groupes (figure 24A, haut). Chez les souris perfusées avec la solution isocalorique, la stimulation de glucose induit des « bouffées de potentiels d'action » (figure 24B, bas), qui s'assimilent à celles détectées chez les souris traitées à l'eau (figure10). L'activité nerveuse de ces souris est estimée à 0,85Hz (figure 24C). Lorsque les souris ont été perfusées avec la solution d'intralipid, elles présentent des bouffées de potentiels d'action plus diffuses après l'injection intragastrique de glucose. La

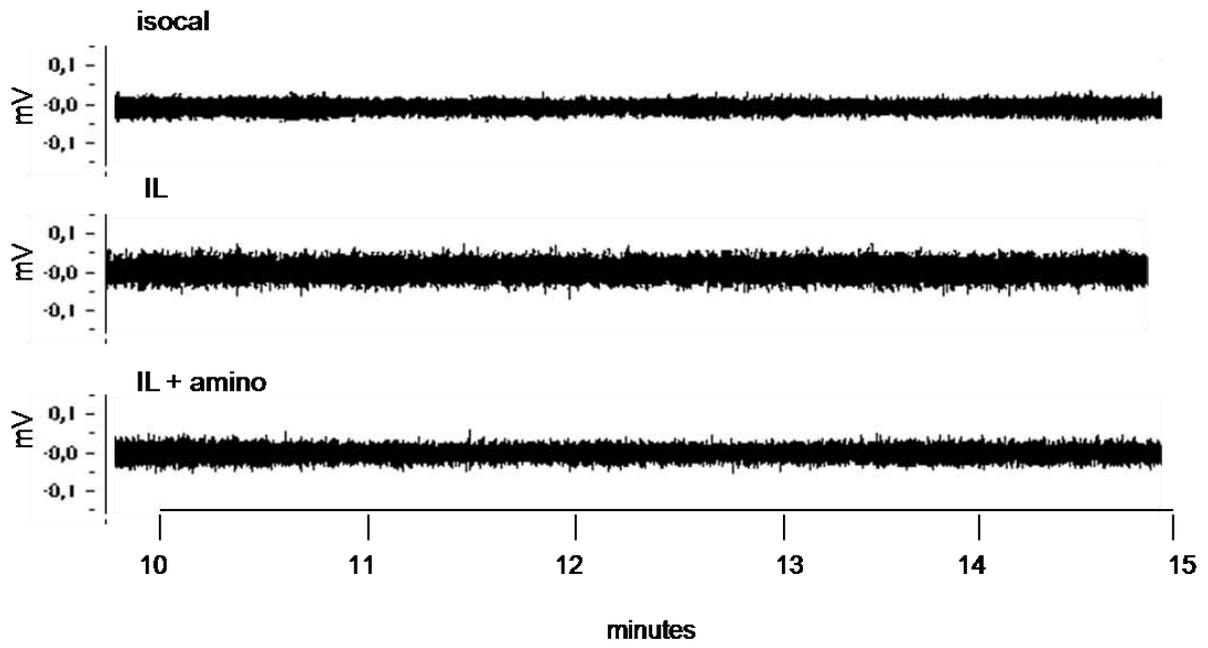
fréquence des potentiels d'action est de 0,5Hz. Avec le traitement à l'aminoguanidine, l'enregistrement de l'activité nerveuse est un phénotype intermédiaire au deux conditions précédentes. En effet, par ce traitement, les bouffées de potentiels d'actions sont moins diffuses que lors d'un simple traitement aux lipides, et deviennent apparent comme lors de la perfusion de solution isocalorique. La fréquence est alors de 0,78Hz.

Conclusion

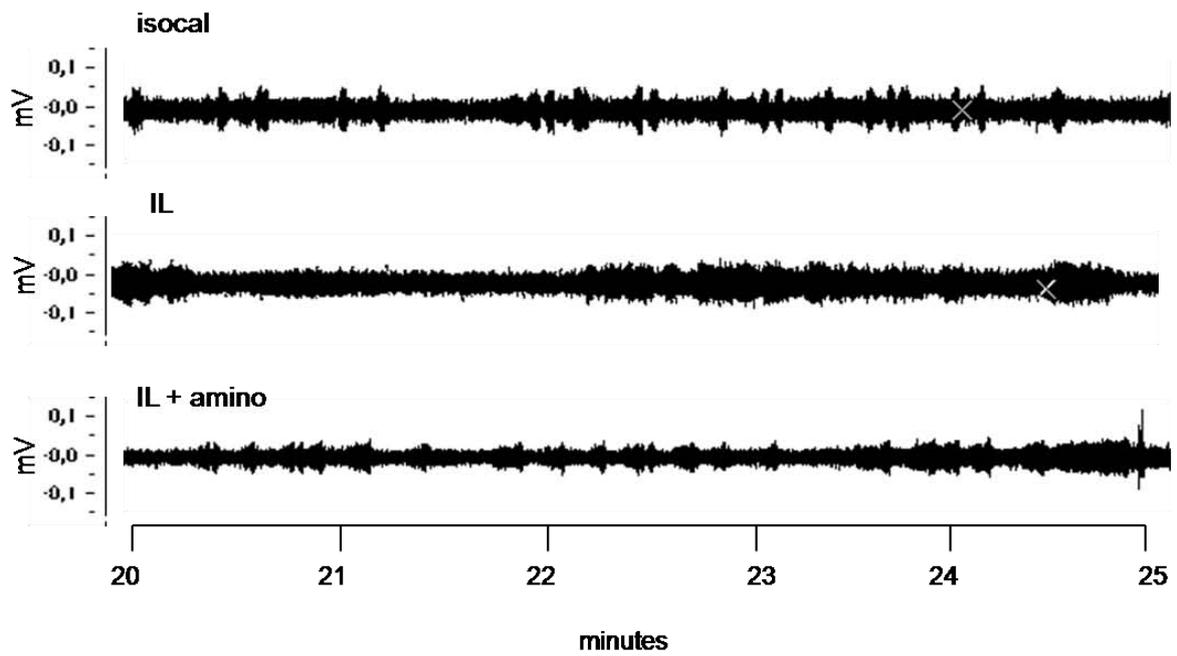
Les lipides présents dans l'intestin perturbent la transmission du signal nerveux induit par le glucose. Ils altèrent donc la transmission du signal nerveux de l'axe « intestin-cerveau ». L'aminoguanidine corrige l'altération de la transmission nerveuse induite par les lipides. La peroxydation lipidique, et plus largement l'état oxydatif, induit par les lipides, modifierait donc la sensibilité des cellules intestinales sensibles au glucose, qui génère une information nerveuse au cerveau pour réguler la glycémie.

A

Après la perfusion (« basal »)



Après la stimulation par le glucose



B

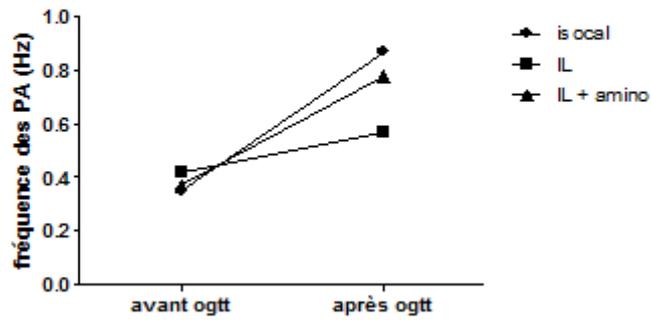


Figure 24 : sur des souris perfusées avec une solution isocalorique (isocal), et des souris perfusées avec une solution d'intralipid précédé (IL + amino) ou non (IL) d'un traitement à l'aminoguanidine, **A)** enregistrement de l'activité du nerf vague avant (haut) et après (bas) une administration intragastrique de glucose, **B)** fréquence des potentiels d'action (Hz).

Article

ARTICLE 1

Intestinal but not systemic dipeptidyl peptidase 4 regulates the gut to brain axis for the control of glucose tolerance

Myriam Masseboeuf¹, Gaetan Jouglia¹, Aurélie Waget¹, Pierre Cattan^{4,5}, Cendrine Cabou¹, Mattieu Armanet^{4,5}, Mélis Karaca³, Julien Castel³, Gaëlle Payros¹, Daniel J. Drucker², Christophe Magnan³, and Rémy Burcelin^{1*}

¹Institute of Molecular Medicine Ranguel, I²MR U858 Inserm, IFR31, Toulouse, France

²Department of Medicine, Samuel Lunenfeld Research Institute, Mount Sinai Hospital, University of Toronto, Toronto, Ontario, Canada.

³ Unit of Functional and Adaptative Biology, CNRS EAC 4413, Paris, France

⁴ Cell Therapy Unit, Hôpital Saint Louis, AP-HP, and University Paris 7, Paris, France

⁵ Inserm U872. Centre de recherches des Cordeliers, Paris, France.

M.M.; G.J. and R.B. analyzed the data; M.M., D.J.D. and R.B. wrote the paper. MM, AW and RB declare that they have no conflict of interest. DJD has served as a consultant for Merck Inc.

Abbreviations : GLP-1, Glucagon-Like Peptide 1; HFD, High Fat Diet; NC, Normal Chow; Ex9, Exendin-9

to whom correspondence should be addressed at : Institut de Medecine Moleculaire de Ranguel (I2MR), INSERM U858, IFR31, CHU Ranguel, BP84225, 31432 Toulouse Cedex 4, France. Phone: +33(0)561 325 614, Fax: +33 (5)561 325 622.

email: remy.burcelin@inserm.fr

Key words: dipeptidyl peptidase 4, GLP-1, sitagliptin, gut brain axis, vagus nerve

Correspondence should be sent to RB remy.burcelin@inserm.fr

Abstract

OBJECTIVE: We examined the role of the intestine, versus hepatoportal or systemic DPP-4 activity and control of glucose tolerance.

RESEARCH DESIGN AND METHODS: We administered a low oral dose of the DPP-4 inhibitor sitagliptin to reduce DPP-4 activity in the intestinal lumen but not the circulation. Glucose tolerance, insulin and GLP-1 concentrations, DPP-4 activity in the hepatoportal and systemic blood and in the intestine, were assessed. In subsets of mice, vagus nerve activity was recorded and in others the GLP-1 receptor (R) was blocked by an intravenous (iv) or intracerebroventricular (icv) infusion of exendin9. The role of the DPP4-mediated GLP-1 degradation dipeptide His-Ala was studied *in vivo* and *in vitro* on isolated islets.

RESULTS: Inhibition of DPP4 activity in lumen of the jejunum and ileum by low dose sitagliptin improved glucose tolerance, whereas low dose intravenous sitagliptin infusion had no effect. Improved glycemic control was associated with a moderate rise in plasma insulin concentration and activation of the vagus nerve activity. Although a rise in portal GLP-1 concentration could not be detected, the glucoregulatory effect of sitagliptin required GLP-1R signaling and was prevented by iv and icv infusion of the GLP-1 receptor antagonist exendin9 suggesting that there is no direct effect of circulating GLP-1 on beta-cell induced insulin secretion. Since sitagliptin prevented the production of the dipeptide GLP-1 degradation product His-Ala, we infused the dipeptide iv with the DPP4 inhibitor and showed that glucose tolerance was no longer improved, and secretion of glucagon and insulin increased and decreased, respectively. Similar results were obtained when the dipeptide was incubated with isolated mouse or human islets.

CONCLUSION: These findings suggest that local inhibition of DPP4 activity in the intestine is sufficient to improve glucose tolerance through a mechanism characterized by reduced generation of the bioactive dipeptide His-Ala.

Introduction

During a meal glucagon-like peptide one (GLP-1) and glucose-dependent insulintropic peptide (GIP) are secreted into the mesenteric and hepatoportal veins (105; 298). Upon binding to their respective receptors on insulin-secreting β -cells, both peptides dramatically enhance glucose-dependent insulin secretion (299; 300). This mechanism is called the incretin effect (301). Whereas GIP alone has not been developed for the treatment of type 2 diabetes, enhancing GLP-1 action is currently the basis of several therapeutic strategies which aim to control hyperglycemia. One major drawback to the use of native GLP-1 is that the peptide is rapidly degraded by an endoprotease, dipeptidyl peptidase-4 (DPP-4) as soon as it is secreted by enteroendocrine L cells (302; 303). Dpp4^{-/-} mice exhibit reduced glycemic excursion following a glucose challenge in association with increased levels of glucose-stimulated insulin and the intact insulintropic form of GLP-1. Hence, two major therapeutic strategies are now available, one employing injectable DPP-4 resistant GLP-1 receptor agonists and a second approach involves orally available inhibitors of DPP-4. The former strategy produces a large increase of the concentration of circulating GLP-1 receptor agonists, which directly and potently increase plasma insulin concentrations. The second strategy, using DPP-4 inhibitors, allows the more physiological augmentation of intact levels of GLP-1 in the mesenteric and hepatoportal veins, close to the site of intestinal GLP-1 secretion. However, it has never been validated that the moderate increase in circulating intact GLP-1 achieved via DPP-4 inhibition was responsible for the direct engagement of the β -cell GLP-1 receptor leading to stimulation of insulin secretion. Moreover we and others previously showed *in vivo*, in the awake free moving mouse and other animal models, that a vagal hepatopancreatic reflex (304) is initiated by activation of the hepatoportal glucose sensor to control peripheral glucose utilization in a GLP-1R-dependent manner (85; 101; 195; 305; 306). This mechanism required the simultaneous activation of brain GLP-1 signaling to trigger glucose-regulated insulin secretion (307), muscle blood flow and insulin sensitivity (308), hepatic glucose production and food intake (228; 309). Together, these data show that a physiological increase in GLP-1 regulates glucose metabolism through a mechanism that involves the entero-portal gut-to-brain-to-periphery axis (1). Consequently, we suggest that the glucoregulatory actions of endogenous DPP-4 may involve local regulation of the GLP-1-dependent gut-to-brain-to-periphery axis. To test this hypothesis, we inhibited DPP-4 activity in the intestinal lumen using a very low oral dose of sitagliptin before an oral glucose tolerance test. We show that partial inhibition of DPP-4 activity in the jejunum and ileum was sufficient to control glucose tolerance. This effect was associated with activation of the vagus nerve and required functional systemic and central GLP-1 receptors. Unexpectedly, the improved glycemic control mediated by the DPP-4 inhibitor was

blunted when the dipeptide His-Ala, the degradation product of GLP-1 generated by DPP-4, was administered simultaneously with the glucose load. Remarkably, His-Ala increased glucagon and reduced glucose-induced insulin secretion both *in vivo* and *in vitro* in isolated human and mouse islets. Therefore, our data suggest first, that selective local reduction in intestinal DPP-4 activity is sufficient for activation of the gut-to-brain-to-periphery axis and second, that the prevention of His-Ala production may contribute to the therapeutic effects of DPP-4 inhibition.

RESEARCH DESIGN AND METHODS

Animals and research design

Eleven-week-old C57BL6/J (Charles River, L'Arbresle, France) male mice were housed in a controlled environment (inverted 12-h daylight cycle, lights off at 10:00 A.M.) with free access to food and water. All the following animal experimental procedures have been approved by the local ethical committee of the Ranguel hospital. Mice were fed a normal carbohydrate diet (energy content: 12% fat, 28% protein, and 60% carbohydrate; A04, Safe, France). Intrafemoral, intraportal, and intracerebral catheters were indwelled for glucose and drug administration. A few days after recovery from surgery the catheters are connected to infusion systems allowing the animal to remain in its cage. This allows for injections without handling the animals. Mice underwent a glucose tolerance test as described below. Some mice were infused with the GLP-1 receptor antagonist exendin(9-39) (exendin9) for 45 minutes before the glucose challenge and until the end of the experimental procedure into the femoral (0.1 nmol/kg.min), or intracerebroventricular catheters (0.5pmol/kg.min). In other sets of mice a higher dose of exendin(9-39) was flash injected (1nmol/mouse) to pharmacologically inhibit the GLP-1 receptor signalling.

Surgical procedures

Intraportal, femoral, or cerebroventricular catheters. The mice were anesthetized with isoflurane (Abbott, Rungis, France). A catheter was indwelled into the femoral vein (308), or the portal vein (101; 310; 311), or the lateral ventricle of the brain, as described (308; 312; 313). Following insertion of catheters, mice were allowed to recover for a full week to reach their pre-surgical body weight. Mice that did not recover completely were not used in further experiments.

Glucose tolerance test

A glucose solution (30%) was administered (2 g/kg) orally in mice fasted for 6 hours. The mice were gavaged with the dipeptidyl peptidase-4 inhibitor sitagliptin (Merck Sharp Dohme and Chibret laboratories, Rahway, NJ, USA) diluted in 200 µl of water at different concentrations ranging from 0.4 µg to 40 mg/mouse, as indicated for each experimental condition thirty minutes before the glucose challenge. Fifteen microliters of blood was sampled from the tip of the tail vein thirty minutes before, and at two, five, fifteen, or sixty minutes after the glucose challenge. Blood was immediately centrifuged and plasma frozen until assay. In mice allocated for the assessment of portal vein GLP-1 concentrations, blood was sampled in the presence of Diprotin A (ile-pro-ile, 0,1 nmol/L, Sigma-Aldrich, Saint Louis MO) and heparin thirty minutes before, and two, five, fifteen, or forty minutes following the glucose challenge. A rapid anesthesia was induced by an intraperitoneal injection of a mix of Ketamine 1000 (Vibrac, France) xylamine (Rompum 2%, Bayer health care, France, 100 and 10mg/kg i.p., respectively) to perform the portal vein blood samplings.

Plasma parameters

Plasma insulin concentration was determined from ten microliters using the mouse ultrasensitive insulin ELISA kit (Mercodia, Uppsala, Sweden). Plasma GLP-1 concentration was determined from one hundred microliters using the Glucagon-Like Peptide-1 (Active) ELISA kit (Linco Research). Plasma glucagon was determined using the RIA Kit glucagon (Millipore, Billerica, MA).

Measurement of parasympathetic nervous system activity

The mice were gavaged with sitagliptin or water 30 minutes before the intragastric glucose challenge. Then, before the glucose challenge the mice were anesthetized, and the vagus nerve activity was recorded as previously described (308; 313). Briefly, the vagus nerve was recorded under anesthesia at the level of the trachea. While the mice were kept on a heating blanket at 37°C in a Faraday cage set up, a first electrode was hooked to the vagus nerve whereas a second one was implanted under the skin as a reference. The vagus nerve activity was recorded using a data acquisition system (Powerlab 8/3, ADInstrument US). The signal was filtered between 0.1 and 1000 Hertz, with a 4 k/s sampling rate, and amplified by the BioAmp. After the glucose challenge the vagus nerve activity was recorded for thirty minutes. At completion of the recording period 600 µg of

acetylcholine was injected into the peritoneal cavity. This dramatically increased the vagus nerve activity facilitating calibration of the recording and validating the sensitivity of the experimental set up. Mice in which the firing rate activity of the vagus nerve was not increased by acetylcholine were not included in the analysis.

Insulin and glucagon secretion from isolated human and mice islets

Mice islets

Mice were killed by cervical dislocation, the pancreas removed, and islets isolated by collagenase digestion and subsequently separated from the remaining exocrine tissue by hand picking under a stereomicroscope, as previously described (314). Islets were then cultured overnight in CMRL-1066 (Invitrogen) supplemented with 0.25% human serum albumin, 20 mM L-glutamine, 64 mg/L gentamycin and 25 mM Hepes at 37°C in 95% O₂/5% CO₂ and saturated humidity in 96-well filter plates (multiscreen Durapore BV1.2µm, Millipore) (5 islets/well). *In vitro* insulin release was assayed under static incubation. The culture medium was replaced by Krebs-Ringer-Bicarbonate-Hepes (KRBH) buffer- 0.05% fatty acid free BSA containing 5.5 mM or 16.7 mM glucose with or without Histidine-Alanine (His-Ala) dipeptides at 1, 10 and 100 nM and islets were further incubated for 90 min at 37°C. The plates were then centrifuged and the supernatants were stored at -20°C until assayed for insulin and glucagon.

Human islets

Human islets were isolated from 20 to 52 years old non-diabetic adult donors (19<BMI<25) with brain death as previously described (314). The islets were handpicked and cultured overnight in CMRL-1066 (Invitrogen). *In vitro* insulin release was assayed under static incubation using the same protocol followed for mouse islets.

DPP-4 assay

The DPP-4 activity was assessed in plasma from the portal vein or the systemic blood or in the lumen from different segments of the intestine. Briefly, 50 µl of plasma are used and in other instances 30 mg of duodenum, jejunum, and ileum epithelium were harvested by scrapping the mucosa into 1 ml

of phosphate buffer saline (140 mM NaCl , 3 mM KCl, 4 mM Na₂HPO₄ ,1.5 mM KH₂PO₄). The epithelial cells are discarded by centrifugation (8000 rpm, 4°C, 5 minutes) and luminal DPP-4 activity was analyzed in the supernatant. 50 µl of the supernatant was incubated with kit reagents according to the manufacturers' recommendations (DPP-4 glo protease assay, Promega, Madison, USA) for 2 hours at 37°C.

Statistical analyses

Results are presented as means ± SEM. Statistical analyses were performed using Prism GraphPad version 5.01 (GraphPad Software Inc., California, USA). Between-group differences were analyzed using the Student's *t* test and a statistical difference was considered significant when $p < 0.05$.

Results

Systemic, portal and intestinal inhibition of DPP-4 and glucose tolerance

To determine whether the improved glucose tolerance mediated by sitagliptin was due to the inhibition of the enzyme in the systemic, hepatoportal, or intestinal compartments we determined the minimal dose of the inhibitor able to significantly reduce glycemic profiles following an oral glucose challenge. The data show that the oral administration of sitagliptin, 4 $\mu\text{g}/\text{mouse}$, improves glucose tolerance of normal healthy mice (**Figure 1A**). This effect could be further enhanced by administration of 40 and 400 μg of sitagliptin. Interestingly, a submaximal dose of 40 μg almost totally blunted the glycemic excursion and significantly reduced both the systemic and hepatoportal activity of DPP-4 (**Figures 1B&C**). The inhibition of circulating DPP-4 activity using the largest dose of the inhibitor was associated with a rise of the hepatoportal concentration of active GLP-1 (**Figure 1D**). We next examined whether more modest reduction of DPP-4 activity only in the intestinal compartment was sufficient to achieve glucoregulation. Therefore, we determined the activity of DPP-4 from the lumen of different intestinal segments following low dose oral sitagliptin administration. The lowest dose of sitagliptin, 4 $\mu\text{g}/\text{mouse}$, could significantly inhibit DPP-4 activity in the lumen of the jejunum (**Figure 1E**). This effect was further enhanced when a higher dose of 40 $\mu\text{g}/\text{mouse}$ was administered. Importantly, this low dose, although sufficient for control of glycemia, did not increase the concentration of active GLP-1 in the portal vein, suggesting that the newly released GLP-1, although initially protected by the low dose DPP-4 inhibitor at the vicinity of GLP-1 release from the L cell, could still be subsequently degraded upon reaching the mesenteric and portal circulation. However, insulin secretion was still increased using the low dose of 40 μg sitagliptin (**Figure 1F**). This suggests that indeed, the gut to brain to beta metabolic reflex was actually engaged by the sitagliptin treatment.

In contrast, when similar low doses of sitagliptin, 4 $\mu\text{g}/\text{mouse}$ (or 40 $\mu\text{g}/\text{mouse}$, not shown) were administered directly into the systemic (**Figure 2A**) or the hepatoportal circulation (**Figure 2D**), glucose tolerance was not improved and plasma DPP-4 activity (**Figure 2B**) and GLP-1 levels remained unchanged (**Figure 2C**).

The control of glucose tolerance by inhibition of intestinal DPP-4 requires an activated GLP-1 receptor.

To determine whether the GLP-1 receptor was required for control of glucose tolerance following systemic reduction of DPP-4 activity we injected the GLP-1 receptor antagonist exendin9 into the

systemic circulation simultaneous to the oral administration of the maximal glucoregulatory dose of sitagliptin (40 mg). Consistent with previous observations, the anti-hyperglycemic actions of sitagliptin were blunted by the GLP-1 receptor antagonist (**Figure 3A**). Second, we determined whether a much lower dose of sitagliptin (4 µg/mouse) that inhibited DPP-4 largely in the vicinity of GLP-1 release was sufficient to modulate glycemic control via a GLP-1R-dependent mechanism. The glucoregulatory actions of sitagliptin were also blunted by simultaneous co-infusion of a low dose exendin(9-39) (**Figure 3B**) or even when a pharmacological flash injection of a high dose of the antagonist was performed (Not shown). It is noteworthy that the dose of 40µg/mouse of sitagliptin provided similar data on the glycemic control. In all instances the GLP-1 receptor antagonist did not impact the plasma insulin concentrations (**Figure 3C**). This suggests that the glycemic control induced by sitagliptin depending on the direct effect of enteric GLP-1 production on beta cell induced insulin secretion. Since we previously showed that brain GLP-1 signaling was important for the control of glucose homeostasis (307; 308) we next blocked the activity of the brain GLP-1 receptor by icv exendin9 infusion. Importantly, CNS GLP-1R antagonism also blunted the action of low dose oral sitagliptin to reduce glycemic excursion (**Figure 3D**).

DPP-4 inhibition regulates vagus nerve activity

Enteric glucose activates the gut-to-brain axis by a mechanism which requires the GLP-1 receptor (85; 307; 315) and the autonomic nervous system. Hence we studied vagus nerve activity in mice treated with or without a submaximal dose of sitagliptin (40 mg) since these recordings can only be performed under anesthetized conditions. Sitagliptin alone in the basal fasted state increased the activity of the vagus nerve (**Figures 3E,F**). Glucose administration increased vagus nerve activity which was also further regulated by sitagliptin (**Figure 3E**). Glucose itself induced bursts of spikes which were augmented in response to sitagliptin (**Figures 3E,G**). The mean percent of spikes over basal in mice during the thirty minutes which followed the glucose injection was increased in response to sitagliptin (**Figure 3G**).

The dipeptide degradation product His-Ala blunted sitagliptin-dependent glucose control

Inhibition of DPP-4 activity increases the concentration of active GLP-1 in the mesenteric and the portal blood but also reduces the concomitant production of the corresponding degradation products i.e. GLP-1₉₋₃₆ and the dipeptide His-Ala. Although GLP-1₉₋₃₆ has no direct effect on oral

glucose tolerance and insulin secretion, the putative importance of the dipeptide His-Ala for control of glucose tolerance has not been examined. Accordingly, we performed an intravenous injection of 100 nmol of His-Ala in the presence of a low dose of sitagliptin. We hypothesized that this approach could mimic the liberation of the dipeptide during the physiological degradation of native GLP-1. Administration of His-Ala simultaneously to the glucose challenge impaired the reduction in glucose induced by a low dose of sitagliptin (**Figure 4A**). This was associated with reduced levels of plasma insulin and increased levels of glucagon after the oral glucose challenge (**Figure 4B,C**).

In vitro effect of His-Ala on glucagon and insulin secretion from isolated mice and human islets

His-Ala at the lowest concentration of 1 nM reduced glucose-induced insulin secretion from isolated mouse (**Figure 5A**) or human (**Figure 5C**) islets. Conversely, His-Ala dose- dependently increased glucagon secretion (**Figures 5B,D**). In all instances, the basal insulin and glucagon secretion rates remained unchanged by His-Ala.

Discussion

Our data here suggest two new mechanisms through which the inhibition of DPP-4 activity improves glucose tolerance. First, local reduction of DPP-4 activity in the gut is sufficient to reduce glycemia. Second, decreased production of the dipeptide His-Ala, released from the DPP-4-mediated cleavage of GLP-1, may contribute to improved glucose tolerance through direct actions on islet cells.

The mechanism(s) through which DPP-4 inhibitors exert their actions remain incompletely understood. Evidence for the central importance of the GIP and GLP-1 receptors for transduction of the glucoregulatory actions of DPP-4 inhibitors was revealed through analysis of loss of DPP-4 action in mice with genetic deletion of one or both incretin receptors (316) (317). This was further demonstrated in obese-diabetic ob/ob mice where the glucose-lowering activity of a DPP-4 inhibitor was abolished by co-administration of exendin9 (318). Nevertheless, the relative importance of peripheral vs. central GLP-1 receptors for transduction of a glucoregulatory signal pursuant to DPP-4 inhibition had not been previously determined. Acute oral or systemic administration of DPP-4 inhibitors increases the plasma concentration of circulating active GLP-1 and insulin only very moderately, within a one to two fold increase, in animal models of diabetes (319). In humans augmentation of plasma levels of GLP-1 with DPP-4 inhibition was non-linear and maximized at 10 mg of PF-00734200, a dose which resulted in about 75% weighted average DPP-4 inhibition over twenty four hours and a 2.3-fold increase in GLP-1 over placebo (320). Moreover, whereas the inhibition of DPP-4 activity remained complete for over twenty four hours, plasma GLP-1 concentrations declined (320). Hence, it could be suggested that the maintenance of elevated circulating plasma GLP-1 concentrations was not the only mechanism responsible for the glycemic control.

Our data demonstrating efficacy of a very low dose of sitagliptin sufficient to achieve intestinal DPP-4 inhibition without increases in circulating GLP-1 suggest that direct GLP-1-mediated activation of glucose-induced insulin secretion is unlikely to represent a dominant mechanism of action for DPP-4 inhibition-mediated glucose control. Conversely, intestinal inhibition of DPP-4 activity could certainly induce a local rise of intact GLP-1 concentrations within the mesenteric and hepatoportal veins. This set of data is further reinforced by our observation that the blockage of peripheral (but not central) GLP-1 receptors by the use of exendin(9-39) did not reduce glucose induced insulin secretion. Hence, our data suggest that the direct route of GLP-1 induced beta-cell insulin secretion is most likely a minor mechanism responsible for the effect of sitagliptin on the glycemic control. We and others

have described that the hepatoportal glucose sensor is an important regulator of glucose homeostasis (310; 311; 321). Upon oral absorption of glucose a positive glucose gradient is established between the mesenteric/hepatoporal vein and the arterial blood. This activates glucose-sensitive units of structures like intraganglionic laminar endings in connection with vagus nerves efferents (322-324). These neural structures probably surround the numerous capillaries of the mesenteric veins emptying into the portal vein and are capable of regulating the gut-to-brain neural axis (325; 326). We and others further showed that the GLP-1 receptor is one molecular component of the glucose sensor which regulates many physiological functions involved in the control of glycemia such as muscle glucose utilization, hepatic glucose production, or counterregulatory hormone production (85; 101; 195; 304-306; 327). Furthermore, GLP-1 receptor mRNA was present in the nodose ganglia, and nerve terminals innervating the portal vein contained the GLP-1 receptor (328). The selective blockade of the GLP-1 receptor via hepatoportal infusion of exendin9 partially prevented glucose-induced insulin secretion (329) and the peripheral control of glucose utilization (101). This model, invoking a role for the autonomic nervous system in the gut to pancreas axis was supported by experiments utilizing a ganglionic blocker to prevent the insulinotropic action of GLP-1 (218).

To further localize the site of initiation of a GLP-1 signal within these various compartments, we defined the lowest oral dose of sitagliptin which significantly improved glycemia. Interestingly, under these conditions, sitagliptin improved glycemic control without a detectable increase in active plasma GLP-1 concentrations in the systemic or the portal circulation. Although the low dose of sitagliptin did not reduce systemic DPP-4 activity, it did result in moderately reduced DPP-4 activity in the lumen of the small intestine. The DPP-4 enzyme has indeed been localized to the capillaries surrounding the enteroendocrine cells within the intestinal mucosa (302). Therefore, our model is consistent with the possibility that the GLP-1 signal triggers the enteric gut-to-brain-to-periphery axis locally, very proximal to its origination from gut endocrine cells. This hypothesis is consistent with the observation that sitagliptin increased vagus nerve activity in the basal state, and in response to glucose. We previously reported that the activation of cFos expression in the brain in response to a low rate gastric glucose infusion required the GLP-1 receptor since activation of the gut-to-brain axis was a) attenuated by exendin9 infusion and b) abrogated in *Glp1r^{-/-}* mice (85). Consistent with these findings, our current data demonstrate that inhibition of GLP-1 signaling by the co-administration of exendin9 directly into the systemic circulation prevented the glycemic control induced by sitagliptin. Interestingly, the blockade of GLP-1 signaling directly into the brain also blunted the sitagliptin-mediated improvement in glucose tolerance, showing that the brain GLP-1 receptor was also

important for transduction of the signal arising from intestinal inhibition of DPP-4 activity. Furthermore, when the lowest dose of sitagliptin sufficient to reduce glucose and intestinal DPP-4 activity was infused directly into the systemic circulation, no glucoregulatory effect was observed. These findings further suggest that the intestinal inhibition of DPP-4 is responsible for most of the glucoregulatory effect of the orally administered DPP-4 inhibitor.

Given the modest increases in circulating plasma levels of GLP-1 achieved following meal ingestion, it is conceivable that the improved glucose tolerance mediated by the secretion of GLP-1 reflects engagement of the gut-to-periphery axis, a mechanism which would be enhanced in type 2 diabetic patients treated with DPP-4 inhibitors. It is noteworthy that DPP-4 is an endoprotease which removes dipeptides from many substrates. Therefore, inhibition of DPP-4 also reduces the production of GLP-1 degradation products such as the dipeptide His-Ala. To delineate a role for this peptide we injected it in mice treated with sitagliptin and directly into the systemic blood following an oral glucose tolerance test. Under such conditions, the DPP-4 inhibitor prevented the endogenous generation of the dipeptide, enabling ascertainment of its biological activity via exogenous intravenous administration. The dipeptide partially impaired glucose tolerance, blunted glucose-induced insulin secretion and increased glucagon secretion. Furthermore, His-Ala produced similar effects on glucose-stimulated hormone secretion when directly incubated with isolated murine or human islets. Interestingly, His-Ala did not affect basal insulin and glucagon secretion rates suggesting that the effect of the dipeptide requires concomitant activation of a glucose-sensitive signal in β -cells.

The mechanism(s) through which dipeptides could regulate insulin and glucagon secretion is not known but could be related to two di-tri-peptide transporters, PepT1 and PepT2 which have been identified and functionally characterized (330). Although these peptide transporters have not been identified in β -cells they are certainly present in the small intestine. PepT1 is exclusively expressed in the intestinal epithelial cells, whereas both PepT1 and PepT2 are expressed in the proximal tubule of the kidney. Interestingly, previous data showed that the oral hypoglycemic agent nateglinide stimulates insulin secretion by inhibiting peptide transport through PepT1 and PepT2 (331). Therefore, our data are in line with these previous findings and further suggest that the dipeptide His-Ala released from the degradation of GLP-1 could regulate insulin and glucagon secretion.

Taken together, our new data strongly suggest that the mechanisms through which DPP-4 inhibitors control postprandial glycemia depend on the inhibition of intestinal DPP-4 proximal to the site of

GLP-1 secretion. This would lead to activation of the neural gut-to-brain-to-beta cell axis through a mechanism which does not involve the direct activation by intestinal GLP-1 release of beta-cell induced insulin secretion. Conversely, the mechanism involves rather requires brain GLP-1 signaling within the gut to beta cell axis. Furthermore, we provide that the release of specific dipeptides involved in sitagliptin action. This mechanism of action provides further evidence distinguishing the site(s) and mechanisms of action of DPP-4 inhibitors from those observed with GLP-1R agonists and highlight the emerging importance of gut-derived signals in the control of glucose homeostasis.

Acknowledgment

This work was supported by grants from the Merck Sharp and Dohme laboratories to RB and DJD. CM was recipient of funding from the "Agence Nationale de la Recherche" ANR-07-PHYSIO and DJD was supported in part by a Canada Research Chair in Regulatory Peptides.

Figures and legends

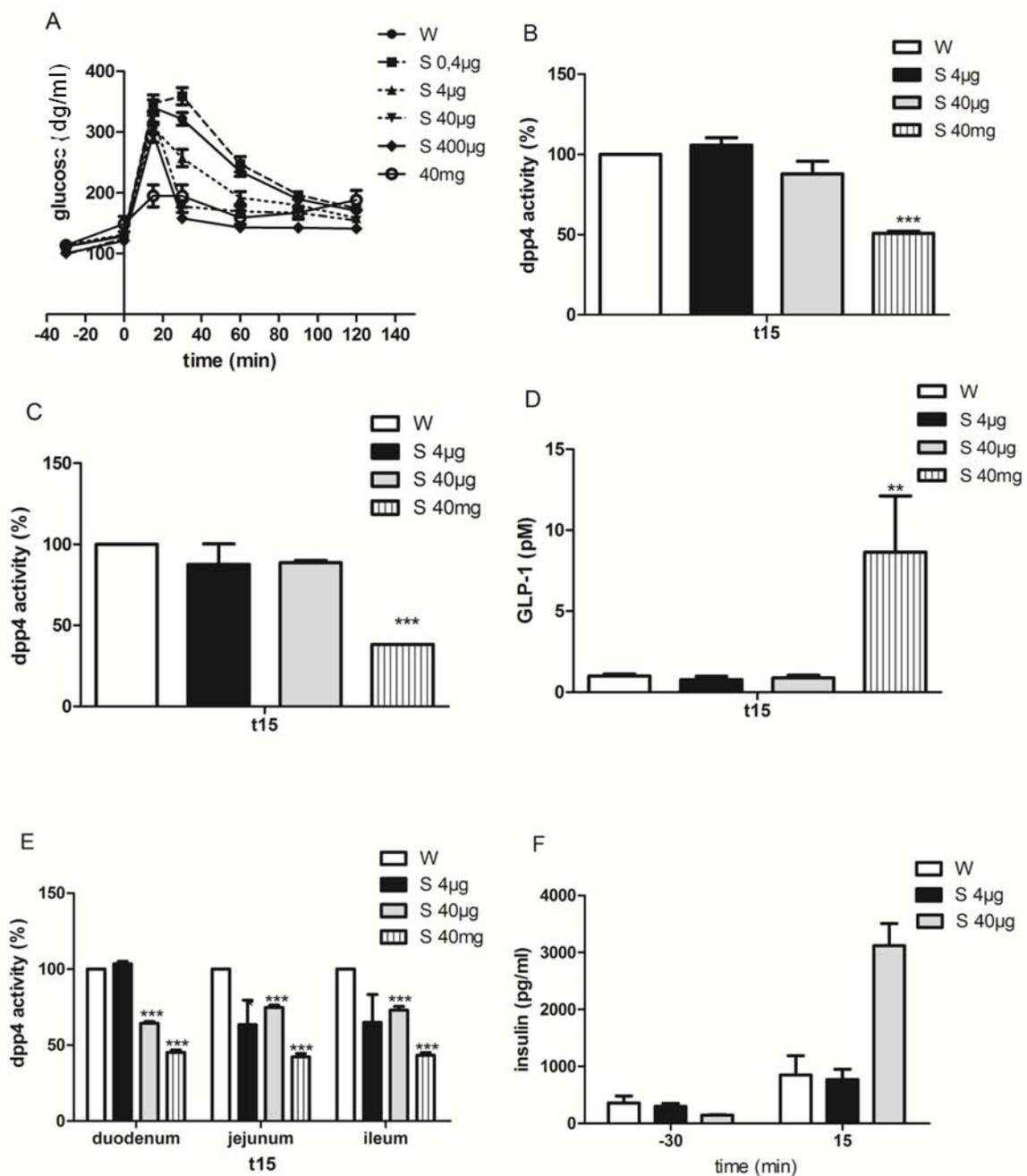
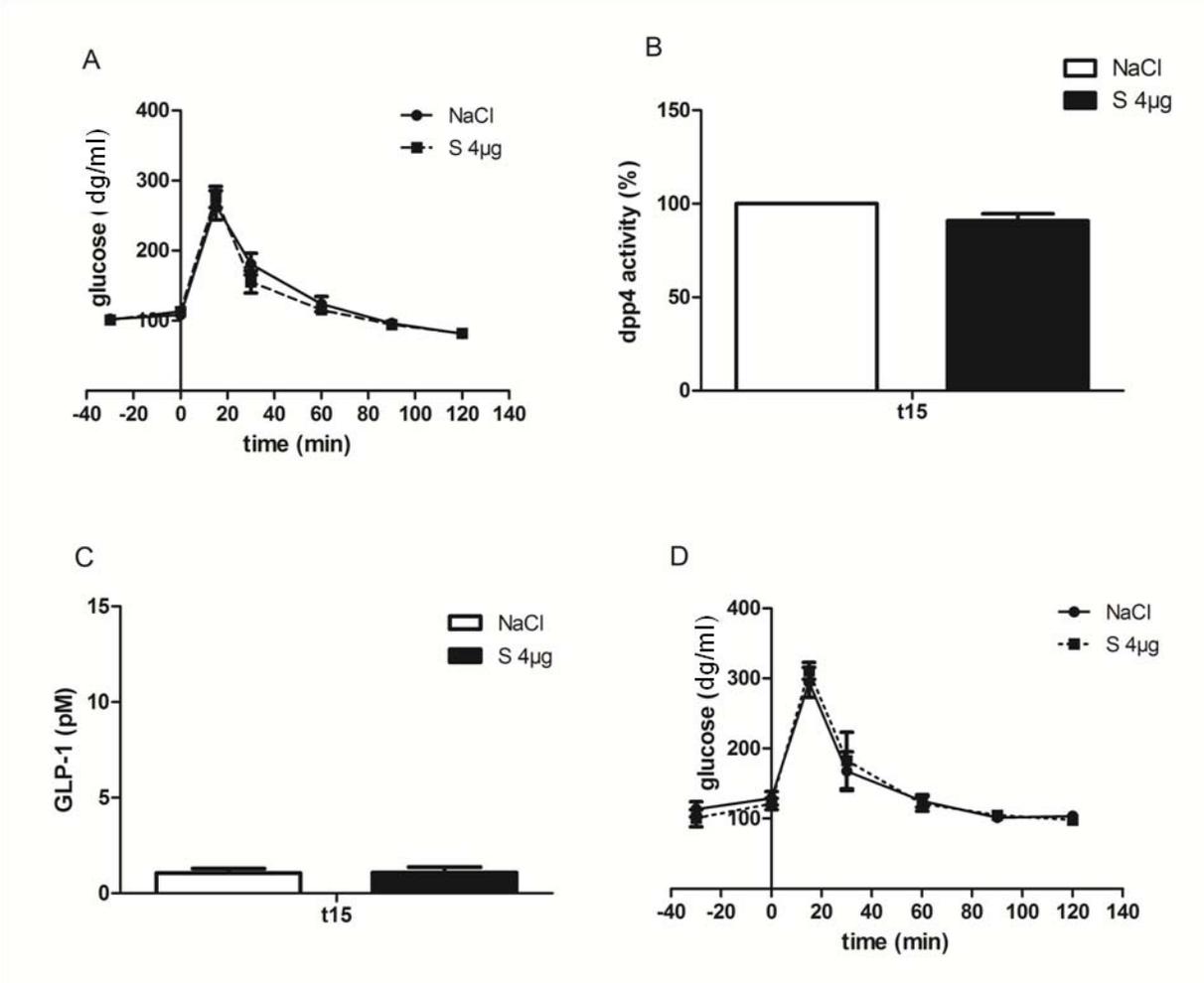


Figure 1: Dose response of sitagliptin for control of glucose tolerance in mice.

Water (W) or doses of sitagliptin (S; 0.4, 4, 40, 400 µg/mouse and a maximal dose of 40 mg/mouse) were administered orally thirty minutes before an oral glucose challenge. **A**) glycemia (dg/ml), **B,C,E**) DPP-4 activity (percent of total activity of the W group) in systemic blood (**C**) the portal blood (**D**), the duodenum, jejunum, ileum of the small intestine (**E**) and; **D**) portal vein GLP-1 concentration (pM) as

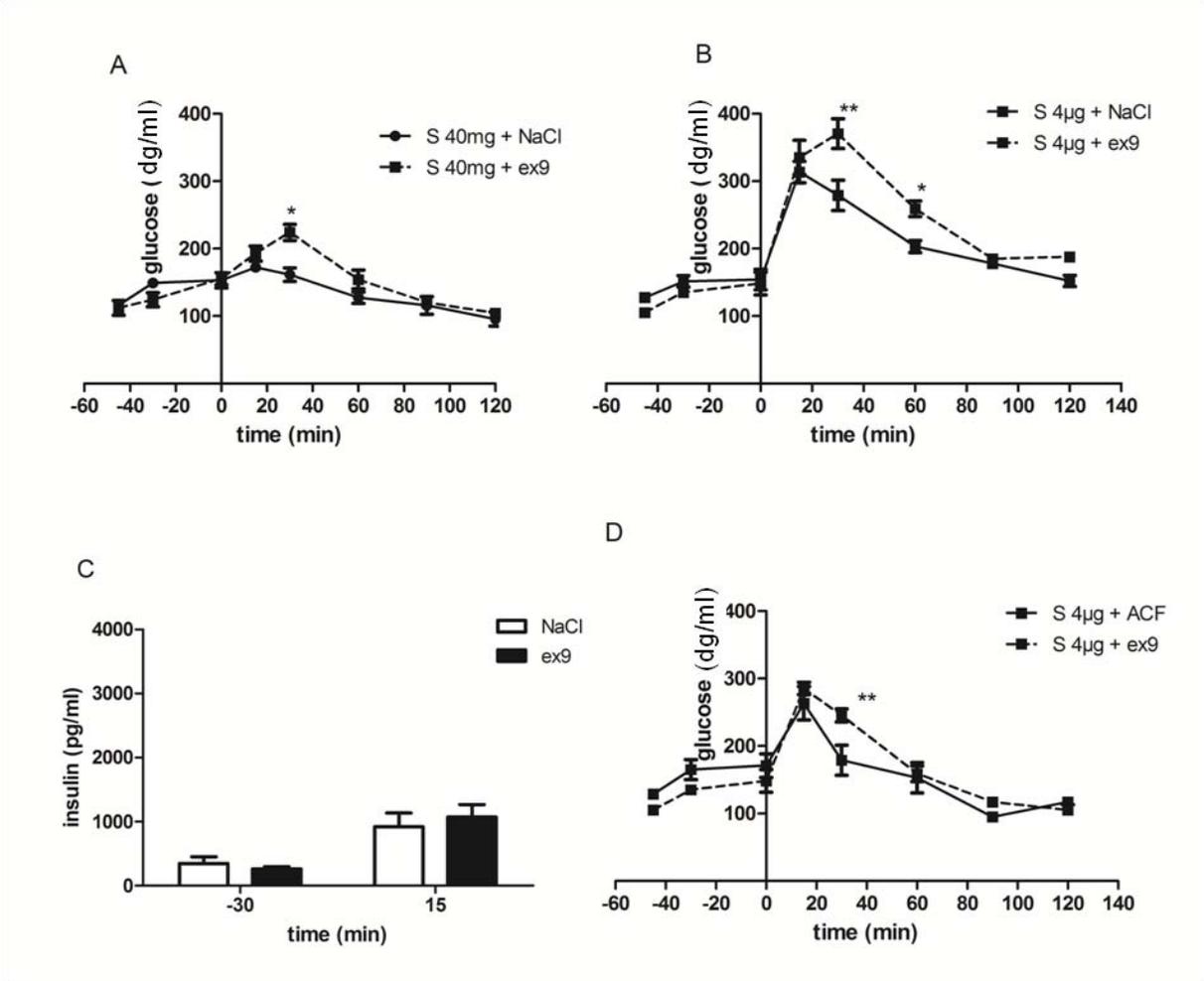
assessed fifteen minutes after the oral glucose load. Six to eight mice per group have been studied. * statistically significant from the water-treated group, $p < 0.05$.

Figure 2: intravenous sitagliptin infusion does not regulate glucose tolerance, DPP-4 activity or plasma GLP-1 concentrations.

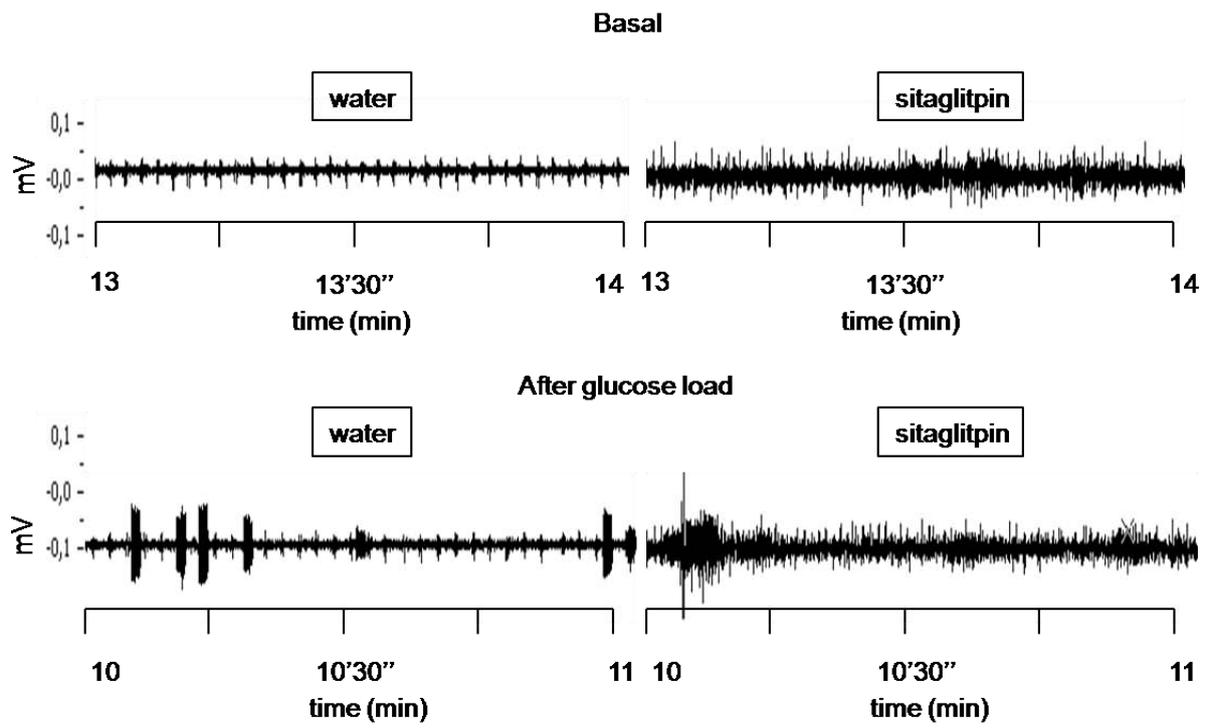


Saline (W) or sitagliptin (S; 4 µg/mouse) was administered into the femoral (A,B,C) or the portal vein (D) thirty minutes before an oral glucose challenge. A,D) glycemia (dg/ml); B) DPP-4 activity (percent of total activity of the NaCl group), C) portal vein GLP-1 concentration (pM) fifteen minutes after the oral glucose load. N= six to eight mice per group.

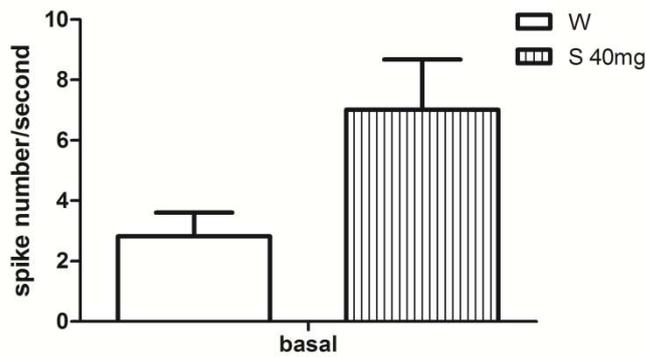
Figure 3: The sitagliptin gluoregulatory mechanism requires an activated GLP-1 receptor and activates vagus nerve activity



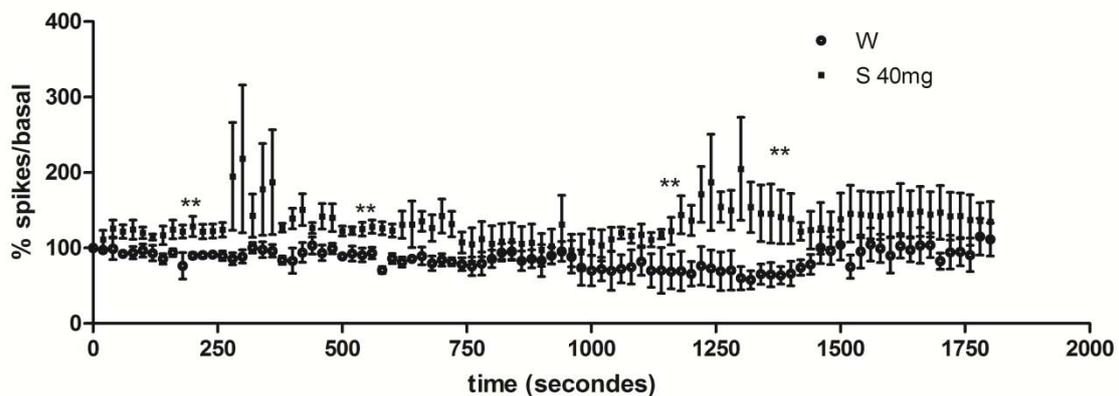
E



F

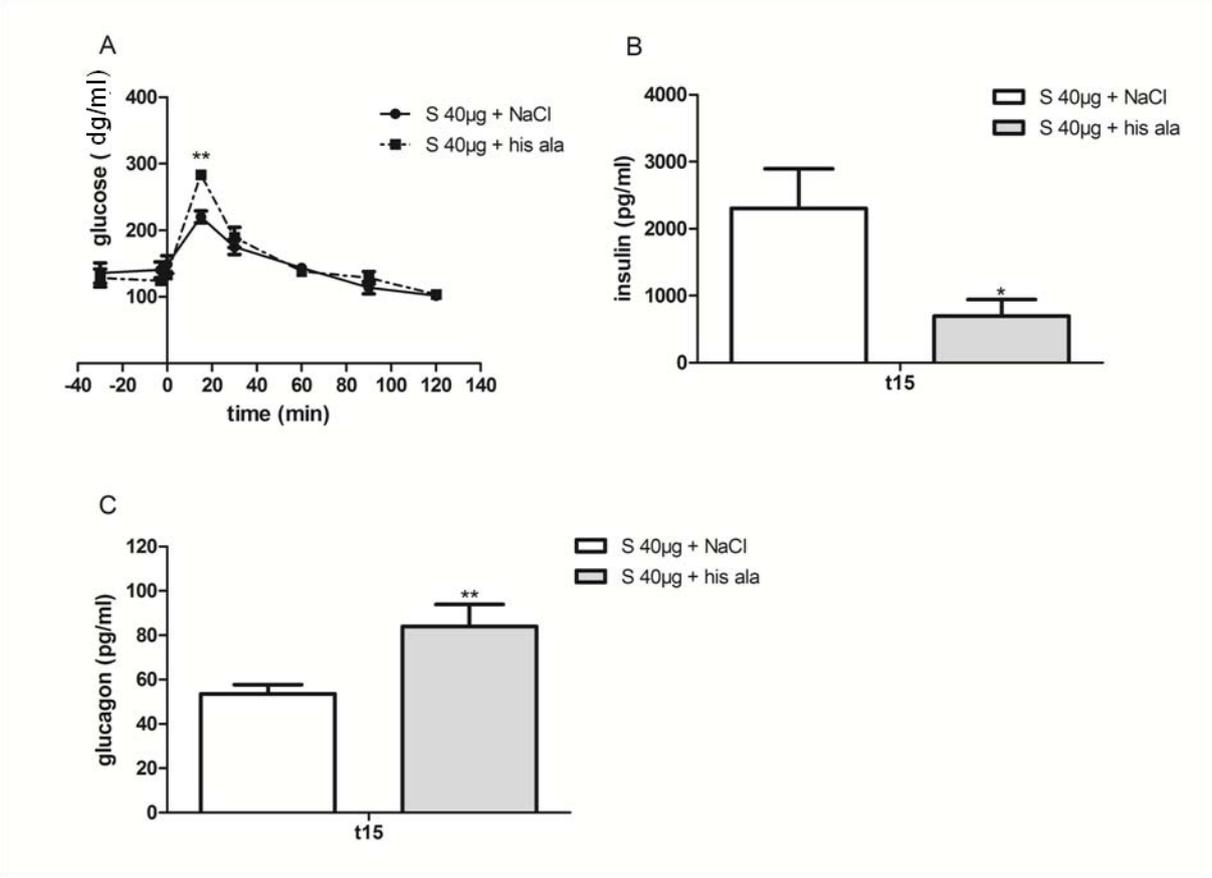


G



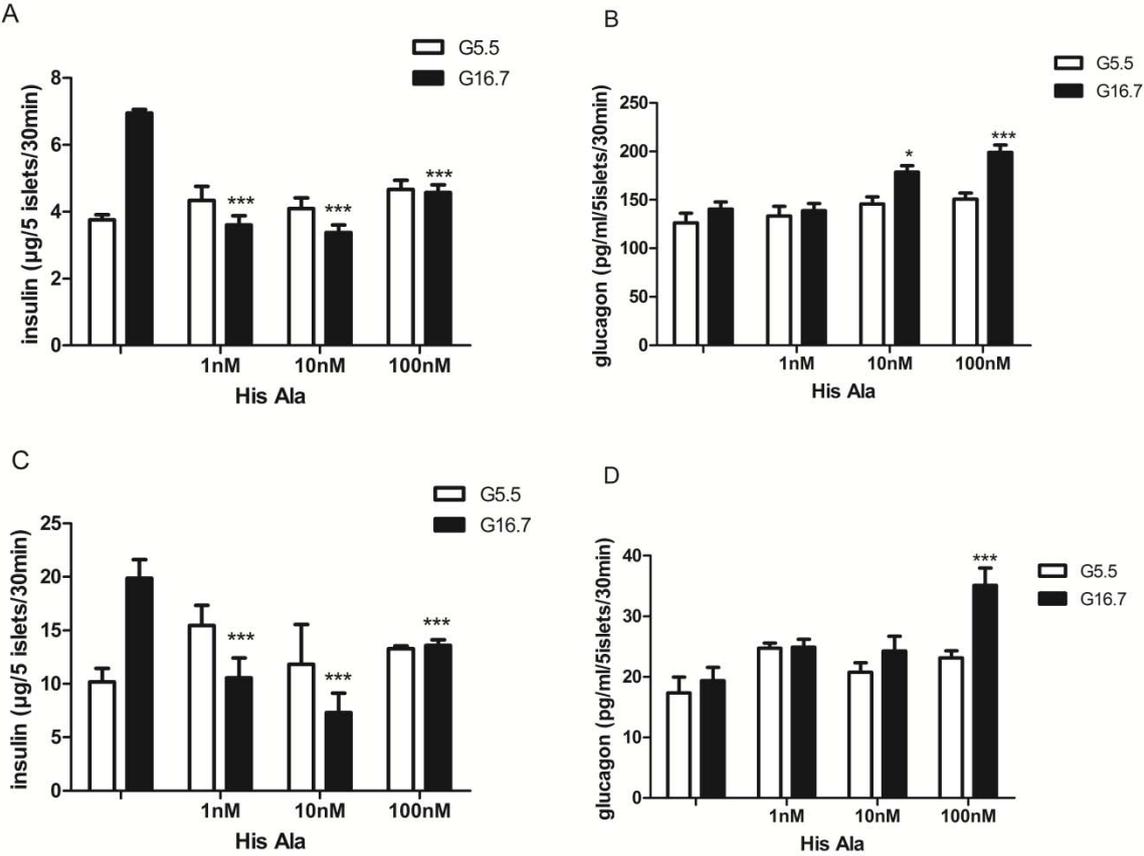
Water (W) or sitagliptin (S) was administered orally at the dose of 40 mg (A) or 4 μ g/mouse (B,C,D). Exendin9 was administered into the systemic blood (A,B,C) or the cerebral ventricle (D). A,B,D) blood glucose (dg/ml). Six to eight mice per group have been studied. * statistically significant from the water-treated group at $p < 0.05$. C) plasma insulin concentration (pg/ml); E) Recording of the firing rate activity (mV) in the basal (upper panels) and a few minutes following an oral glucose challenge (bottom panels) in water (left panels) and sitagliptin (40mg/mouse; right panels) treated mice. F) Mean number of spikes recorded by seconds during fifteen minutes (spikes/second) in the basal state in the presence or absence of sitagliptin. G) Percent of spikes over basal recorded following the glucose challenge and for 15 minutes. Six to eight mice per group have been studied. * statistically significant from the water-treated group, $p < 0.05$.

Figure 4: The GLP-1 dipeptide degradation product His-Ala blunts the glucoregulatory action of sitagliptin



Sitagliptin (S) was administered orally at the dose of 40 µg whereas NaCl or His-Ala (100 nmol) was injected intravenously before the oral glucose challenge. **A)** Blood glucose (dg/ml). **B)** Portal insulin concentration (pM). **C)** Portal glucagon concentration (pg/ml). Six to eight mice per group have been studied. * statistically significant from the water-treated group, p<0.05.

Figure 5: His-Ala regulates insulin and glucagon secretion in human and mouse islets.



Measurement of insulin and glucagon secretion from isolated mouse (A,B) and human (C,D) islets in absence (-) or presence of His-Ala. Insulin (A,C) and glucagon (B,D) secretion from isolated islets with basal (G5.5) or high (G16.7) glucose concentration. *p<0.05 ***p<0.001 compared without His-Ala; n=6.

References

1. Holst JJ: The Physiology of Glucagon-like Peptide 1. *Physiol Rev* 87:1409-1439, 2007
2. Burcelin R: The incretins: a link between nutrients and well-being. *Br J Nutr* 93 Suppl 1:S147-156, 2005
3. Weir GC, Mojsos S, Hendrick GK, Habener JF: Glucagonlike peptide I (7-37) actions on endocrine pancreas. *Diabetes* 38:338-342, 1989
4. Thorens B, Waeber G: Glucagon-like peptide-I and the control of insulin secretion in the normal state and in NIDDM. *Diabetes* 42:1219-1225, 1993
5. Creutzfeldt W: The incretin concept today. *Diabetologia* 16:75-85, 1979
6. Hansen L, Deacon C, Orskov C, Holst JJ: Glucagon like peptide-1-(7-36)amide is transformed to glucagon like peptide -1-(9-36)amide by dipeptidyl peptidase IV in the capillaries supplying the L cells of the porcine intestine. *Endocrinology* 140:5356-5363, 1999
7. Deacon CF: Circulation and degradation of GIP and GLP-1. *Horm Metab Res* 36:761-765, 2004
8. Nakabayashi H, Nishizawa M, Nakagawa A, Takeda R, Niijima A: Vagal hepatopancreatic reflex effect evoked by intraportal appearance of tGLP-1. *Am. J. Physiol.* 271:E808-813, 1996
9. Burcelin R, Da Costa A, Drucker D, Thorens B: Glucose competence of the hepatoportal vein sensor requires the presence of an activated glucagon-like peptide-1 receptor. *Diabetes* 50:1720-1728, 2001
10. Knauf C, Cani PD, Kim DH, Iglesias MA, Chabo C, Waget A, Colom A, Rastrelli S, Delzenne NM, Drucker DJ, Seeley RJ, Burcelin R: Role of central nervous system glucagon-like Peptide-1 receptors in enteric glucose sensing. *Diabetes* 57:2603-2612, 2008
11. Dardevet D, Moore MC, Neal D, DiCostanzo CA, Snead W, Cherrington AD: Insulin-independent effects of GLP-1 on canine liver glucose metabolism: duration of infusion and involvement of hepatoportal region. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 287:E75-81, 2004
12. Johnson KM, Edgerton DS, Rodewald T, Scott M, Farmer B, Neal D, Cherrington AD: Intraportal GLP-1 infusion increases nonhepatic glucose utilization without changing pancreatic hormone levels. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 293:E1085-1091, 2007
13. Johnson KM, Edgerton DS, Rodewald T, Scott M, Farmer B, Neal D, Cherrington AD: Intraportally delivered GLP-1, in the presence of hyperglycemia induced via peripheral glucose infusion, does not change whole body glucose utilization. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 294:E380-384, 2008
14. Knauf C, Cani P, Perrin C, Iglesias M, Maury J, Bernard E, Benhamed F, Grémeaux T, Drucker D, Kahn C, Girard J, Tanti J, Delzenne N, Postic C, Burcelin R: Brain Glucagon-Like Peptide-1 increases insulin secretion and muscle insulin resistance to favor hepatic glycogen storage. *J. Clin Invest* 115:3554-3563, 2005

15. Cabou C, Campistron G, Marsollier N, Leloup C, Cruciani-Guglielmacci C, Pénicaud L, Drucker DJ, Magnan C, Burcelin R: Brain GLP-1 regulates arterial blood flow, heart rate and insulin sensitivity. *Diabetes* In press, 2008
16. Sandoval DA, Bagnol D, Woods SC, D'Alessio DA, Seeley RJ: Arcuate GLP-1 receptors regulate glucose homeostasis but not food intake. *Diabetes* 57:2046-2054, 2008
17. Duez H, Smith AC, Xiao C, Giacca A, Szeto L, Drucker DJ, Lewis GF: Acute dipeptidyl peptidase-4 inhibition rapidly enhances insulin-mediated suppression of endogenous glucose production in mice. *Endocrinology* 150:56-62, 2009
18. Burcelin R, Cani PD, Knauf C: Glucagon-like peptide-1 and energy homeostasis. *J Nutr* 137:2534S-2538S, 2007
19. Burcelin R, Dolci W, Thorens B: Glucose sensing by the hepatoportal sensor is GLUT-2 dependent. In vivo analysis in GLUT-2null mice. *Diabetes* 49, 2000
20. Burcelin R, Dolci W, Thorens B: Portal glucose infusion in the mouse induces hypoglycemia. Evidence that the hepatoportal glucose sensor stimulates glucose utilization. *Diabetes* 49:1635-1642, 2000
21. Perrin C, Knauf C, Burcelin R: Intracerebroventricular infusion of glucose, insulin, and the adenosine monophosphate-activated kinase activator, 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1-beta-D-ribofuranoside, controls muscle glycogen synthesis. *Endocrinology* 145:4025-4033, 2004
22. Cabou C, Cani PD, Campistron G, Knauf C, Mathieu C, Sartori C, Amar J, Scherrer U, Burcelin R: Central insulin regulates heart rate and arterial blood flow: an endothelial nitric oxide synthase-dependent mechanism altered during diabetes. *Diabetes* 56:2872-2877, 2007
23. Van De Winkel M, Pipeleers D: Autofluorescence-activated cell sorting of pancreatic islet cells: purification of insulin-containing B-cells according to glucose-induced changes in cellular redox state. *Biochem Biophys Res Commun* 114:835-842, 1983
24. Knauf C, Cani PD, Ait-Belgnaoui A, Benani A, Dray C, Cabou C, Colom A, Uldry M, Rastrelli S, Sabatier E, Godet N, Waget A, Penicaud L, Valet P, Burcelin R: Brain glucagon-like peptide 1 signaling controls the onset of high-fat diet-induced insulin resistance and reduces energy expenditure. *Endocrinology* 149:4768-4777, 2008
25. Hansotia T, Baggio LL, Delmeire D, Hinke SA, Yamada Y, Tsukiyama K, Seino Y, Holst JJ, Schuit F, Drucker DJ: Double incretin receptor knockout (DIRKO) mice reveal an essential role for the enteroinsular axis in transducing the glucoregulatory actions of DPP-IV inhibitors. *Diabetes* 53:1326-1335, 2004
26. Flock G, Baggio LL, Longuet C, Drucker DJ: Incretin receptors for glucagon-like peptide 1 and glucose-dependent insulinotropic polypeptide are essential for the sustained metabolic actions of vildagliptin in mice. *Diabetes* 56:3006-3013, 2007

27. Duffy NA, Green BD, Irwin N, Gault VA, McKillop AM, O'Harte FP, Flatt PR: Effects of antidiabetic drugs on dipeptidyl peptidase IV activity: nateglinide is an inhibitor of DPP IV and augments the antidiabetic activity of glucagon-like peptide-1. *Eur J Pharmacol* 568:278-286, 2007
28. Moritoh Y, Takeuchi K, Asakawa T, Kataoka O, Odaka H: Chronic administration of alogliptin, a novel, potent, and highly selective dipeptidyl peptidase-4 inhibitor, improves glycemic control and beta-cell function in obese diabetic ob/ob mice. *Eur J Pharmacol* 588:325-332, 2008
29. Dai H, Gustavson SM, Preston GM, Eskra JD, Calle R, Hirshberg B: Non-linear increase in GLP-1 levels in response to DPP-IV inhibition in healthy adult subjects. *Diabetes Obes Metab* 10:506-513, 2008
30. Nijijima A: Afferent impulse discharges from glucoreceptors in the liver of the guinea pig. *Ann N Y Acad Sci* 157:690-700, 1969
31. Berthoud HR, Kressel M, Neuhuber WL: An anterograde tracing study of the vagal innervation of rat liver, portal vein and biliary system. *Anat. Embryol.* 186:431-422, 1992
32. Berthoud HR, Nijijima A, Sauter JF, Jeanrenaud B: Evidence for a role of the gastric, coeliac and hepatic branches in vagally stimulated insulin secretion in the rat. *Journal of the Autonomic Nervous System* 7:97-110, 1983
33. Berthoud HR, Patterson LM, Neumann F, Neuhuber WL: Distribution and structure of vagal afferent intraganglionic laminar endings (IGLEs) in the rat gastrointestinal tract. *Anat Embryol (Berl)* 195:183-191, 1997
34. Nijijima A: Neurophysiological evidence for hepatic glucose-sensitive afferents. Commentary on "The current status of hepatic theory of food intake control". *Appetite* 2:151-152, 1981
35. Nijijima A: Glucose-sensitive afferent nerve fibres in the hepatic branch of the vagus nerve in the guinea-pig. *Journal of Physiology* 332:315-323, 1982
36. Ionut V, Hucking K, Liberty IF, Bergman RN: Synergistic effect of portal glucose and glucagon-like peptide-1 to lower systemic glucose and stimulate counter-regulatory hormones. *Diabetologia* 48:967-975, 2005
37. Vahl TP, Tauchi M, Durler TS, Elfers EE, Fernandes TM, Bitner RD, Ellis KS, Woods SC, Seeley RJ, Herman JP, D'Alessio DA: Glucagon-like peptide-1 (GLP-1) receptors expressed on nerve terminals in the portal vein mediate the effects of endogenous GLP-1 on glucose tolerance in rats. *Endocrinology* 148:4965-4973, 2007
38. Preitner F, Ibberson M, Franklin I, Binnert C, Pende M, Gjinovci A, Hansotia T, Drucker DJ, Wollheim C, Burcelin R, Thorens B: Gluco-incretins control insulin secretion at multiple levels as revealed in mice lacking GLP-1 and GIP receptors. *J Clin Invest* 113:635-645, 2004
39. Balkan B, Li X: Portal GLP-1 administration in rats augments the insulin response to glucose via neuronal mechanisms. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 279:R1449-1454, 2000

40. Nielsen CU, Brodin B: Di/tri-peptide transporters as drug delivery targets: regulation of transport under physiological and patho-physiological conditions. *Curr Drug Targets* 4:373-388, 2003
41. Terada T, Sawada K, Saito H, Hashimoto Y, Inui K: Inhibitory effect of novel oral hypoglycemic agent nateglinide (AY4166) on peptide transporters PEPT1 and PEPT2. *Eur J Pharmacol* 392:11-17, 2000

ARTICLE 2

Protective effect of aminoguanidine on intestinal oxidative stress and deregulated glucose homeostasis induced by lipid infusion in mice

Myriam Masseboeuf¹, Nicolas Marsollier², Aurélie Waget¹, Gaëlle Payros¹, Catherine Kabani², Jessica Denom², Amélie Lacombe², Jean-Claude Thiers¹, Céline Cruciani-Guglielmacci², Anne Negre-Salvaire¹, Serge Luquet², Rémy Burcelin¹, and Christophe Magnan^{2*}

¹: INSERM U858, Institut de Médecine Moléculaire Rangueil, Toulouse, France

²: CNRS EAC 4413, Biologie Fonctionnelle et adaptative, Paris France

* : corresponding author : University Paris Diderot case courrier 7126, Bâtiment Buffon, 5ème étage, 4 rue Marie Andrée Lagroua Weill-Halle 75205 Paris Cedex 13, France

Tel : +33 (1) 57 27 77 92

christophe.magnan@univ-paris-diderot.fr

Abstract

Daily variations of lipid concentrations in both gut lumen and blood are detected by specific sensors located either in gastrointestinal tract or in specialized central areas such as the hypothalamus and the brainstem. Deregulation of the lipid sensitive sensors could be partly involved in glucose homeostasis dysfunction. The study aimed at comparing the effect of intralipid (IL) overload on glucose-induced insulin secretion and insulin sensitivity when administrated either through the intestine or the carotid artery in mice. To that end an intragastric or intracarotid catheter was indwelled in mice and a triglyceride emulsion (IL 18Kcal/24h) or an isocaloric/saline solution (Nutriflex, controls) was infused during 24hours. The intestinal but not the intracarotid infusion of IL led to glucose intolerance, impaired glucose-induced insulin secretion (GIIS) and insulin-resistance when compared to controls. The intestinal IL overload induced lipid accumulation and increased lipid peroxidation assessed by increased malondialdehyde production within both jejunum and duodenum. The deleterious effect of intestinal lipid infusion on glucose homeostasis was associated with the concomitant deregulation of vagus nerve activity -in response to glucose injection- evidenced in intestinal-IL infused mice when compared to controls. Administration of aminoguanidine protected against the lipid overload by preventing lipid peroxidation and consequently normalized glucose homeostasis as well as vagus nerve activity. We concluded that lipid overload within the intestine led to deregulation of gastrointestinal lipid sensing which in turn impaired glucose homeostasis through changes in autonomic nervous system activity. This could be an early event leading to the further deterioration of energy balance.

INTRODUCTION

It is now clearly evidenced that nutrient sensing is a key factor in the regulation of energy homeostasis, especially glucose homeostasis (1). Indeed daily variations of nutrient concentrations in both gut lumen or blood are detected by specific sensors located either in gastrointestinal tract (2; 3) or in specialized central areas (mainly hypothalamus or brainstem, 4; 5). Regarding gastrointestinal tract, it has been known for many years that luminal nutrients stimulate the release of regulatory peptides from gut endocrine cells and that luminal nutrients also activate intrinsic and extrinsic neural pathways innervating the gut in turn conveying to brainstem through vagus afferent fibers (3; 6). It has been also demonstrated that daily variations of nutrient concentration in blood can be directly detected by “nutrient sensitive neurons” (both glucose or fatty acid sensitive neurons located within the hypothalamus (7; 8). Among nutrients, growing evidences suggest an important role for intestinal lipid-induced gut-brain neuronal axis to regulate energy homeostasis (9; 10) as well as direct hypothalamic fatty acid (FA) sensing (11-13). Regarding glucose homeostasis, it has been evidenced that FA sensing contributes to nervous control of insulin secretion and action (14; 15).

Recent evidences suggest that deregulation of these glucoregulatory pathways could be partly involved in the etiology of metabolic diseases such as obesity and or type 2 diabetes. We previously demonstrated that early changes in insulin secretion and action induced by high-fat diet were related to a decreased sympathetic tone in rats (16). The effect of the lipid-enriched diet were also observed when a triglyceride emulsion was directly infused in the 3rd ventricle (17) or into the carotid artery (18; 19) without any change in plasma TG or fatty acid concentration. In this latter experiment lipid infusion induced hepatic insulin-resistance and an increased glucose-induced insulin secretion in response to glucose tolerance test, suggesting an adaptation of endocrine pancreas to decreased insulin sensitivity (19). In addition, data emphasized that high-fat diet may also affect sensing of dietary lipids by the gut (20). Mechanisms involved in these deleterious processes could include inflammation and oxidative stress (21; 22). Indeed, low-grade endotoxemia may contribute to the postprandial inflammatory state following high-fat meal ingestion (23) and finally contribute to initiation of insulin-resistance and obesity (24) These effects could be partly related to the accumulation of oxidant species like peroxidized lipids in the gut

epithelial cells which could contribute to alter the mucosal metabolic pathways and enterocyte function (25).

The present work firstly showed that a 24h lipid infusion impaired glucose-induced insulin secretion (GIIS) when administrated through the intestine but not through the carotid artery. We then secondly characterized that of the deleterious effects of intestinal lipid overload on glucose homeostasis could be prevented by administration of aminoguanidine a nucleophilic hydralazine compound and an *in vivo* antioxidant against reactive oxygen species (ROS) and lipid peroxidation. Therefore, during the development of metabolic diseases a lipid overload could impair energy homeostasis through mechanisms related to the early alteration of intestinal glucose sensing.

RESEARCH DESIGN AND METHODS

Animals and research design The following animal experimental procedures have been approved by the local ethical committee of the Ranguel hospital and Use Committee of University of Paris Diderot. Eleven-week-old C57BL6/J (Charles River, L'Arbresle, France) male mice were housed in a controlled environment (inverted 12-h daylight cycle, lights off at 10:00 A.M.) with free access to food and water. All Mice were fed by a normal carbohydrate diet (NC). A catheter was indwelled in the stomach or in carotid artery toward the brain. Following insertion of catheters, one week post-surgical recovery allowed mice to recover and to reach their pre-surgical body weight. At the day of experiment the catheters were connected to infusion systems allowing the animal to remain in its cage. Mice were infused during 24h with a triglyceride emulsion (Intralipid, IL 20%; 18Kcal/24h, KabeVitrum, Stockholm, Sweden) or an isocaloric solution (Nutriflex lipid, B Braun, France). It is noteworthy that this lipid infusion rate correspond to the amount of lipid absorbed over 24 hour by mouse fed a high-fat diet (Burcelin et al AJP 2002). A subset of mice were infused for six hours only to evaluate the effect of a very short term infusion on glucose homeostasis. At completion of the infusions, different metabolic analyses were performed and described below. The duodenum, jejunum and the hypothalamus were collected and stored at - 80°C respectively from intragastric catheter mice and intracarotid catheter mice. In another set of experiment, a group of mice have free access to drinking water added with a solution of aminoguanidine (100mg/ml, Sigma Aldrich, Saint Louis, MO), during the week of recovery from surgery, and before the intragastric or intracarotid 24-hours infusion.

Surgical procedures

Intragastric catheter. Mice were anesthetized with isoflurane (Abbott, Rungis, France). After hair shaving, a 4-mm laparotomy was performed under the thoracic cage, on the left side. The upper stomach was gently incised with a needle and a catheter was indwelled in the stomach hole. It was secured by surgical glue (Histoacryl, 3M, Health Care, St. Paul, MN), and the other side of the catheter was tunnelled under the skin and exteriorized and closed at the back of the neck.

Intracarotid catheter. The long-term infusion technique under unrestrained conditions was used, as previously described (26). Briefly, 7 days before the

beginning of the infusion, rats were anesthetized with isoflurane (Abbott, Rungis, France) for the insertion of a catheter in the carotid artery toward the brain. Then, the catheter was exteriorized at the vertex of the head and attached to a swivelling infusion device, allowing the animal free access to water and diet.

Plasma parameters during the infusion. Before the beginning of the infusion and at the end of the 24h-infusion, twenty microliters were collected from the tip of the caudal vein to estimate the plasma fatty acid (FFA) and triglyceride (TG) concentration. Blood was immediately centrifuged and plasma frozen until assay.

Plasma parameters after the 24-h infusion.

Tolerance test

Oral Glucose tolerance test (OGTT). After 24h-infusion, mice were disconnected of the perfusion system and could move in their cage. After twenty minutes, intragastric –perfused mice are gavaged with a glucose solution (30%; 2g/kg). The glycemia was determined by a glucometer (Accu Chek, France) from two μ l collected from the tip of the tail vein at time 0, 15, 30, 60, 90 and 120 min. In addition 20 μ l of blood was sampled 20 before, and at 15 and 60 min after the glucose gavage, in order to measure insulinemia. Blood was immediately centrifuged and plasma was frozen until insulin assay.

Insulin tolerance test (ITT). A single dose insulin was injected (0.05 U/ml, 10 μ l/g, ip). The glycemia was measured from tail at time 0, 5, 10, 15, 20 30, 40 50 and 60 min.

GLP-1 sample. In mice allocated for assessment of portal vein GLP-1 concentrations, blood was collected in the presence of Diprotin A (ile-pro-ile, 0.1 nM, Sigma-Aldrich, Saint Louis MO) and heparin at the end of 24-hours infusion , and fifteen minutes following the glucose challenge. A rapid anesthesia was induced by an intraperitoneal injection of a mix of Ketamine 1000 (Vibrac, France) Xylazine (Rompum 2%, Bayer health care, France, 100 and 10mg/kg i.p., respectively) to perform the portal vein samples.

Plasma parameters. Plasma insulin concentration was determined in 10 μ l using the mouse ultrasensitive insulin ELISA kit (Mercodia, Uppsala, Sweden). Plasma GLP-1 concentration was determined in 100 μ l using the Glucagon-Like Peptide-1 (Active) ELISA kit (Linco Research). Determination of plasma FFA concentration is allowed by the NEFA C kit (WAKO) by 8 μ l. Plasma triglyceride concentration is determined in 3 μ l by the triglycerides enzymatique PAP150 (Biomerieux).

Biochemical assays

Protein content extraction. The braked samples of intestine and hypothalamus were digested by a solution of digestion, Ripa (Tris 1M pH 7,5 (Sigma), triton 10X (Sigma), NaCl 5M, NaF 1M (Sigma)) with antiprotease solution (aprotin at 1.5mg/ml (Euromedex), leupeptin at 1mg/ml (sigma), PMSF at 100nM (Acros Organics, France) and vanadate at 100mM (Sigma)) respectively in 300 and 150 μ l. After 30 min of incubation, the samples were centrifuged 10 min at 1000 rpm, 4°C. The protein content was determined by DC protein assay kit (Biorad, Marne la coquette, France).

Lipid peroxidation. Reaction of malondialdehyde (MDA) with thiobarbituric acid (TBA) has been applied to assess lipid peroxidation in biological material. The reaction yields a red MDA-TBA adduct, the product of 2 mol of TBA plus 1 mol of MDA. The colored complex can be quantified spectrophotometrically from its visible absorbance (λ_{\max} 532 nm). Briefly, 200 μ l of duodenum and jejunum protein content or 50 μ l of hypothalamus protein content were colored by the reaction with HCl 0,5M, and TBA (Acros organics) during the dry bath- incubation (10 min, 95°C). In cold water, 2 ml of butanol (sigma Aldrich) were added and hardly shaken. The centrifugation (ten minutes at 12000 rpm, 4°C) allowed the up-stage of colored peroxide lipid. The colored surnageant was read at 532 nm with a spectrophotometer (WPA, Biowave).

Glutathion reductase. The glutathione (GS-SG) was reduced by the glutathione reductase to product an oxidized glutathione (GSH) and NADP⁺. NADPH absorption (340nm) was correlated to the glutathione reductase activity. On a 96 well plate, tissue treatment for glutathione reductase determination was accomplished by the

glutathione reductase assay kit (Sigma, Rabalot, France) from intestine protein extract.

Triglyceride content. Total lipid was extracted by the traditional Folch method from 50 mg of braked tissues which was mixed with 1 ml of Folch solution (chloroform/methanol: 2/1; v/v) (Sigma Aldrich, Saint Louis MO). The dried lipid content was diluted with five hundred of isopropanol (Sigma Aldrich, Saint Louis MO) to perform the triglyceride assay (triglycerides enzymatique PAP150; biomerieux)

mRNAs expression. Total mRNAs from duodenum and jejunum of mice were extracted using TriPure reagent (Roche, Basel, Switzerland). The concentration of TNF α (r: TTCGGAAAGCCCATTTGAGT, f: TGGGACAGTGACCTGGACTGT), IL-1 β (r: CATCAGAGGCAAGGAGGAAAAC, f: TCGCTCAGGGTCACAAGAAA), PAI-1 (r: CCGAACCAAAAGAGAAAGGA, f: ACAGCCTTTGTCATCTCAGCC), CD3 (r: ATGCCCCAGAAAGTGTTCCA, f: TCCGCCATCTTGGTAGAGAGA), IFN γ (r: TGACTGTGCCGTGGCAGTA, f: TTGGCTTTGCAGCTCTTCCT), NADPH oxydase (r: TCGACACACAGGAATCAGGAT, f: GGTTGGGGCTGAACATTTTTTC), GST (r: CCATCACTTCGTAACCTTGCC, f: AAGAATGGAGCCTATCCGGTG), catalase (r: TCCGCTCTCTGTCAAAGTGTG, f: AGCGACCAGATGAAGCAGTG) mRNAs was evaluated by quantitative RT-PCR analysis. PCRs were performed using an AbiPrism 7900 Sequence Detection System instrument and software (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The concentration of each mRNA was normalized for RNA loading for each sample using RPL19 rRNA (r: CCTTGTCTGCCTTCAGCTTGT, f: GAAGGTCAAAGGGAATGTGTTCA) as an internal standard.

Immunohistology of macrophages, F4/80 staining. 0.5 cm of both duodenum and jejunum were fixed in 4% paraformaldehyde (Sigma Aldrich). 8 μ m of transversal tissue sections were deparaffinized and rehydrated. Sections were blocked in normal goat serum and incubated overnight with primary rat anti-mouse F4/80 monoclonal antibody (1/1,000; Serotec, Oxford, U.K.). Endogenous horseradish peroxidase activity was quenched with incubation with 3% hydrogen peroxide for 20 min. Secondary antibody staining was performed using goat anti-rat biotinylated IgG Ab

(1/1000, 30 min, room temperature) and streptavidin horseradish peroxidase conjugated (1/500, 30 min, room temperature) (Sigma Aldrich) and detected with 3,3-diaminobenzidine (Sigma Aldrich). Sections were counterstained with hematoxylin before dehydration and coverslip placement. The number of F4/80-positive cells per microscopical field was calculated according the similar intestine area.

Electronic microscopy. The duodenum and jejunum samples were immediately fixed in 3% glutaraldehyde (Sigma) in PBS, postfixed in osmium tetroxide, dehydrated and embedded in Epon 812. Ultrathin sections were cut (Reichert ultramicrotome), placed on mesh copper grids, counterstained with uranyl acecate and lead citrate and examined with Hitachi 300 transmission electron microscope.

Measurement of parasympathetic nervous system activity. Mice were anesthetized with isoflurane to record the parasympathetic nerve activity of the vagus nerve at the level of the trachea. While the mice were kept on a heating blanket at 37°C and set up in a Faraday cage, a first electrode was hooked to the vagus nerve whereas a second one was implanted under the skin as a reference. A glucose solution (2g/kg; 30%) was administred to the mice (still awake) through an intragastric catheter. So, after the intralipid or isocaloric infusion, the mice were anesthetized, and the vagus nerve activity was recorded 15 min before, and 30 min after intragastric glucose administration. The signal was filtered between 0,1 and 1000 Hertz, with a 4 k/s sampling rate, and amplified by the BioAmp (Phymep, Paris, France). At completion of the recording period 600µg acetylcholine were injected into the peritoneal cavity. This led to dramatically increased vagus nerve activity thus validating the sensitivity of the experimental set up. Data were digitized with digitizer PowerLab/4sp (ADInstruments, Paris, France) and analysed spectrally using the Spike Histogram (ADInstruments). Neuronal activity was normalized to reduce variability resulting from differences in background activity.

DPP4 activity.

Statistic. Results are presented as means SE. The Student t-test was used to assess statistical significances between groups. $P < 0.05$ was considered as statistically significant.

RESULTS

A 24 hours intestinal but not brain lipid infusion impairs glucose homeostasis.

Intragastric IL infusion increased plasma TG concentration when compared to the isocaloric infusion (figure 1A). Conversely no change in plasma FFA concentration was observed. The 24h intracarotid IL infusion did not increase either plasma FFA or TG concentrations when compared to controls (figure 1B). GLP-1 concentration in the portal vein was markedly increased by the intragastric IL perfusion (figure 1C; t0). To determine the impact of intestinal or intracarotid lipid overload on the control of glucose homeostasis we first investigated the time-course of glycemia in response to an oral glucose challenge (OGTT). At the end of the intragastric IL infusions, the blood glucose profile following the oral glucose load was significantly higher when compared to controls and remained constant around 10 mM (figure 1D). The IL infusion-induced glucose intolerance was associated with an increased plasma insulin concentration 15 min after the glucose challenge (figure 1E). In addition, insulin was less efficient to decrease glycemia in intragastric-IL infused mice (figure 1F). In intracarotid-infused mice, IL did not change glycemic (figure 1G) nor the insulinemic profiles (figure 1H) during OGTT when compared to controls. Following intracarotid IL infusion, there was no change in time-course of glycemia during ITT compared to controls (figure 1I).

Intragastric lipid infusion induced lipid droplet accumulation in jejunum but no inflammation state

The intestinal lipid content was increased in the jejunum (figure 2A). Electron microscopy showed a large lipid droplet in intestinal epithelial cells (figure 2B). After the IL intestinal infusion the concentration of mRNA coding for inflammatory cytokines, TNF α IL1 β was not increased when compared to mice infused with the isocaloric infusion (figure 2C,D). However, PAI-1 mRNA content was increased only in the duodenum (figure 2E). In addition, the number of macrophages, as determined by F4/80 immunohistology (figure 2F,G), was slightly decreased in the duodenum and was 2 fold less in the jejunum of intragastric IL-infused mice when compared to controls. In addition neither IFN γ nor CD3 mRNA -both markers of macrophage-content were changed in both groups (data not show).

Intragastric lipid-infusion induced oxidative stress.

The duodenum and jejunum mRNA concentrations of genes coding for both oxidative (NADPH oxidase) (figure 3A) and anti-oxidative (GST, catalase) enzymes (figure B,C) was quantified. The data show no clear trend of difference between IL and isocaloric infused mice, although some statistical differences were noted. Importantly, the activity of the anti-oxidative enzyme glutathion reductase was impaired in the duodenum and jejunum of IL-infused mice when compared to the controls (figure 3D,E). Furthermore, the lipid peroxidation, as assessed by MDA production, was increased in the 2 segments of IL-infused intestine (figure 3F) when compared to controls. Importantly, in mice infused with IL for only 6 hours the MDA production was already increased (Figure 3G) and the antioxidant activity, as witnessed by the glutathione reductase activity, was impaired (Figure 3H,I). This was accompanied with a state of hyperinsulinemia (Figure 3J), although, at this early time point glucose tolerance was unchanged (Figure 3K).

Interestingly, the brain IL infusion was unable to increase MDA production suggesting that the duration of the infusion was not sufficient (not shown).

Aminoguanidine prevented the IL-induced glucose intolerance and insulin

resistance. To revert the impact of IL on intestinal lipid peroxidation we infused mice for one week with aminoguanidine. Then the mice were infused with IL for 24 hours. Following the 24h-lipid infusion, MDA production was lower in the duodenum and jejunum when the mice were previously infused aminoguanidine

(figure 4A). The aminoguanidine treatment had no impact in mice infused with the isocaloric solution (not shown). The aminoguanidine treatment did not modify plasma FFA (figure 4B) and TG (figure 4C) concentration neither before or after the IL infusion. The glycemic profile obtained in response to the oral glucose challenge was improved in aminoguanidine treated mice that in controls (figure 4D). Aminoguanidine had no effect on isocaloric-infused mice (not shown). Aminoguanidine treatment normalized plasma insulin concentration during OGTT (figure 4E) and insulin tolerance (figure 4F).

Intragastric lipid-infusion and vagus nerve activity.

The enteric glucose detection activates the “gut-brain axis” via the parasympathetic nervous system to transmit the glucose message to cerebral areas such as the brainstem. In basal conditions, vagus nerve activity was similar in all groups (fig 5A, upper panel and fig 5B). In contrast, during OGTT sequences of nerve spikes were different between mice infused with IL or isocaloric solution (fig 5A, bottom panel). In control group fragment of recording displayed a type of response with clear time intervals between events compared to IL-infused mice (fig 5A, bottom panel) and frequency of events was significantly higher (0.87 ± 0.03 vs 0.57 ± 0.05 Hz, $p < 0.01$, fig 5B). Duration of evoked events was also shorter in controls than in IL infused mice indicating changes in frequency of discharges (fig 5A, bottom panel). Aminoguanidin treatment normalized vagus nerve activity in response to OGTT (fig 5A, bottom panel; 0.87 ± 0.03 vs 0.78 ± 0.06 Hz, NS, fig 5B).

DISCUSSION

The present work evidenced that a 24h intragastric but not intracarotid lipid overload impaired both glucose and insulin intolerance and hence the overall glucose homeostasis. This was related to an augmented lipid content in the jejunum. Furthermore both, the duodenum and the jejunum displayed oxidative and peroxilipidic stresses which precedes the impaired glucose homeostasis. The lipid effects were prevented by a prior aminoguanidin treatment. Our data suggest that a short term lipid overload which targets preferentially the intestine glucose sensor and gut-brain axis is sufficient to initiate features of impaired glucose homeostasis. Early events would mainly involve excessive lipid peroxidation rather than oxidative stress. As mentioned above, the major consequence of intragastric lipid infusion is to deregulated glucose homeostasis including both glucose and insulin intolerance. It must be pointed out that in response to oral glucose infusion, plasma insulin concentration was more increased in IL mice than in controls. This could be an adaptation to glucose intolerance and decreased insulin sensitivity. However, this could be also linked to plasma GLP-1 concentration, which was significantly higher in IL than in control mice. Both glucose and insulin intolerance observed in IL-intragastric infused mice occurred without any change in plasma FFA concentration. In contrast, intragastric IL infusion increased plasma TG concentration when

compared to controls. This increased TG concentration was probably not responsible for the impaired glucose homeostasis, since aminoguanidin treatment, which had a preventive effect on the tested parameters, did not decrease plasma TG concentration. In addition, both increased GLP-1 and insulin concentrations were not sufficient to counteract glucose intolerance. Thus we hypothesized that change in glucose homeostasis could be related to change in autonomic nervous system (ANS). Indeed, it has been well described that activation of the parasympathetic nervous system was necessary for normal meal-induced insulin secretion (1; 2). Particularly, a study by Ahren and Holst showed that preabsorptive insulin response to meal ingestion in humans was largely attributed to autonomic activation (2). Authors concluded that this cephalic insulin response was required for a normal postprandial glucose tolerance, and that GLP-1 did not contribute to the preabsorptive cephalic phase insulin response to meal ingestion (2). In our model, the deregulated parasympathetic nerve activity in response to oral glucose ingestion may, at least in part, explain glucose intolerance despite high GLP-1 concentration. In our model vagus nerve activity was similar in all groups in basal conditions. In contrast, during OGTT, there was not increased in vagus nerve activity in IL infused mice. Thus, intestinal IL infusion may lead to deregulation of afferent signals and finally overall vagus nerve activity which could in turn impair neural component of glucose homeostasis. Interestingly, it must be pointed out that plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) expression was increased in duodenum of IL-infused mice. Previous reports evidenced that PAI-1 expression was upregulated in neurons after experimental peripheral nerve injury (28; 29). Taken together, both vagus nerve recording and PAI-1 expression suggest deregulation of enteric nervous system following IL infusion. How IL infusion into intestine may lead to change in vagus nerve activity ? It has been demonstrated that intestinal infusions of oleate and glucose activated myenteric neurons in the duodenum and jejunum in the rat (30). Such sensing could be deregulated in presence of lipid overload and consecutive oxidation/inflammation process. Functional changes of the enteric nervous system have been observed under inflammatory states (31-34). However, it must be pointed out that inflammation was not highly increased in our model. Indeed, neither IL1- β nor TNF α expression were increased in intestine of IL infused mice. This could be related to the short term of duration of infusion (24h) and we cannot exclude that

longer infusion period may induce inflammation and macrophage infiltration as described in other models (22; 25; 35). In contrast, oxidative stress was activated in both duodenum and jejunum of IL infused mice compared to controls as indicated by increased MDA production. Oxidative stress has been also showed to induce changes in enteric nervous system activity. For example, it has been evidenced that specific effects of the cytotoxic secondary lipid oxidation product, 4-hydroxynonenal (10(-8)-10(-4) M) on intact sheets of rat jejunum was to stimulate chloride secretion mediated by prostaglandins and the enteric nervous system (36). Oxidative stress is also associated with peripheral nerve dysfunction observed in diabetes. A study by Kellogg et al demonstrated that oxidative stress was an important regulator of diabetic neuropathy (37). In this study COX-2 inactivation -(COX-2(-/-)) diabetic mice had a protective effect against diabetes-induced motor and sensory nerve conduction slowing and impaired nerve antioxidative defense that were clearly manifest in the wild-type (COX-2(+/+)) diabetic mice (37). Deregulated vagus nerve activation in IL infused mice could be also related to high GLP-1 level {Bharucha, 2008 #108; Yamamoto, 2002 #109}. Aminoguanidine has been previously demonstrated to have a protective effect on blood and tissue lipid peroxidation in jaundiced rats with endotoxemia induced with LPS in rats (38). Aminoguanidine is also a potential therapeutic agent for preventing the generation of advanced glycation end products (AGEs) in diabetes mellitus (39). Our data showed that an increased lipid peroxidation is induced by the IL infusion as early as after six hours. This was accompanied with an excessive insulin secretion. However, these features preceded glucose intolerance. Therefore, we suggested that the alteration of gut glucose sensing is an early mechanism within the time course of impaired glucose homeostasis.

It is noteworthy that the 24 hours brain lipid infusion was not able to impair glucose homeostasis suggesting that the gut glucose signal is more sensitive than the brain to the lipid stress. Furthermore, we can speculated that since the short term nutritional stress on the brain was unable to impair glucose homeostasis the impaired brain glucose sensing described during HFD-induced diabetes could be a consequence rather than a cause of glucose intolerance.

In conclusion,

Our data show that a very short term lipid stress impairs intestinal glucose sensing, through mechanisms which involve a peroxilipidic and oxidative stresses that targets the gut-to-periphery neural axis. These biochemical events were prior to the latter impairment of glucose homeostasis.

REFERENCES

1. Levin BE: Central regulation of energy homeostasis intelligent design: how to build the perfect survivor. *Obesity (Silver Spring)* 14 Suppl 5:192S-196S, 2006
2. Dockray GJ: Luminal sensing in the gut: an overview. *J Physiol Pharmacol* 54 Suppl 4:9-17, 2003
3. Raybould HE: Nutrient sensing in the gastrointestinal tract: possible role for nutrient transporters. *J Physiol Biochem* 64:349-356, 2008
4. Luquet S, Magnan C: The central nervous system at the core of the regulation of energy homeostasis. *Front Biosci (Schol Ed)* 1:448-465, 2009
5. Blouet C, Schwartz GJ: Hypothalamic nutrient sensing in the control of energy homeostasis. *Behav Brain Res*, 2009
6. Maljaars J, Peters HP, Masclee AM: Review article: The gastrointestinal tract: neuroendocrine regulation of satiety and food intake. *Aliment Pharmacol Ther* 26 Suppl 2:241-250, 2007
7. Levin BE, Routh VH, Kang L, Sanders NM, Dunn-Meynell AA: Neuronal glucosensing: what do we know after 50 years? *Diabetes* 53:2521-2528, 2004
8. Wang R, Cruciani-Guglielmacci C, Migrenne S, Magnan C, Cotero VE, Routh VH: Effects of oleic acid on distinct populations of neurons in the hypothalamic arcuate nucleus are dependent on extracellular glucose levels. *J Neurophysiol* 95:1491-1498, 2006
9. Cheung GW, Kokorovic A, Lam TK: Upper intestinal lipids regulate energy and glucose homeostasis. *Cell Mol Life Sci*, 2009
10. McLaughlin J: Long-chain fatty acid sensing in the gastrointestinal tract. *Biochem Soc Trans* 35:1199-1202, 2007
11. Migrenne S, Magnan C, Cruciani-Guglielmacci C: Fatty acid sensing and nervous control of energy homeostasis. *Diabetes Metab* 33:177-182, 2007
12. Lam TK, Schwartz GJ, Rossetti L: Hypothalamic sensing of fatty acids. *Nat Neurosci* 8:579-584, 2005
13. Le Foll C, Irani BG, Magnan C, Dunn-Meynell AA, Levin BE: Characteristics and mechanisms of hypothalamic neuronal fatty acid sensing. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 297:R655-664, 2009
14. Kumar VM: Neural regulation of glucose homeostasis. *Indian J Physiol Pharmacol* 43:415-424, 1999

15. Thorens B, Larsen PJ: Gut-derived signaling molecules and vagal afferents in the control of glucose and energy homeostasis. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 7:471-478, 2004
16. Cruciani-Guglielmacci C, Vincent-Lamon M, Rouch C, Orosco M, Ktorza A, Magnan C: Early changes in insulin secretion and action induced by high-fat diet are related to a decreased sympathetic tone. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 288:E148-154, 2005
17. Clement L, Cruciani-Guglielmacci C, Magnan C, Vincent M, Douared L, Orosco M, Assimacopoulos-Jeannet F, Penicaud L, Ktorza A: Intracerebroventricular infusion of a triglyceride emulsion leads to both altered insulin secretion and hepatic glucose production in rats. *Pflugers Arch* 445:375-380, 2002
18. Marsollier N, Kassis N, Mezghenna K, Soty M, Fioramonti X, Lacombe A, Joly A, Pillot B, Zitoun C, Vilar J, Mithieux G, Gross R, Lajoix AD, Routh V, Magnan C, Cruciani-Guglielmacci C: Deregulation of hepatic insulin sensitivity induced by central lipid infusion in rats is mediated by nitric oxide. *PLoS One* 4:e6649, 2009
19. Cruciani-Guglielmacci C, Hervalet A, Douared L, Sanders NM, Levin BE, Ktorza A, Magnan C: Beta oxidation in the brain is required for the effects of non-esterified fatty acids on glucose-induced insulin secretion in rats. *Diabetologia* 47:2032-2038, 2004
20. Petit V, Arnould L, Martin P, Monnot MC, Pineau T, Besnard P, Niot I: Chronic high-fat diet affects intestinal fat absorption and postprandial triglyceride levels in the mouse. *J Lipid Res* 48:278-287, 2007
21. Hotamisligil GS, Erbay E: Nutrient sensing and inflammation in metabolic diseases. *Nat Rev Immunol* 8:923-934, 2008
22. Rezaie A, Parker RD, Abdollahi M: Oxidative stress and pathogenesis of inflammatory bowel disease: an epiphenomenon or the cause? *Dig Dis Sci* 52:2015-2021, 2007
23. Erridge C, Attina T, Spickett CM, Webb DJ: A high-fat meal induces low-grade endotoxemia: evidence of a novel mechanism of postprandial inflammation. *Am J Clin Nutr* 86:1286-1292, 2007
24. Cani PD, Amar J, Iglesias MA, Poggi M, Knauf C, Bastelica D, Neyrinck AM, Fava F, Tuohy KM, Chabo C, Waget A, Delmee E, Cousin B, Sulpice T, Chamontin B, Ferrieres J, Tanti JF, Gibson GR, Casteilla L, Delzenne NM, Alessi MC, Burcelin

- R: Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes* 56:1761-1772, 2007
25. Seidman EG, Bernotti S, Levy E: Nutritional modulation of gut inflammation. *Nestle Nutr Workshop Ser Clin Perform Programme* 7:41-61; discussion 61-45, 2002
26. Gilbert M, Magnan C, Turban S, Andre J, Guerre-Millo M: Leptin receptor-deficient obese Zucker rats reduce their food intake in response to a systemic supply of calories from glucose. *Diabetes* 52:277-282, 2003
27. Lindemann B: Receptors and transduction in taste. *Nature* 413:219-225, 2001
28. Laerum OD, Illemann M, Skarstein A, Helgeland L, Ovrebo K, Dano K, Nielsen BS: Crohn's disease but not chronic ulcerative colitis induces the expression of PAI-1 in enteric neurons. *Am J Gastroenterol* 103:2350-2358, 2008
29. Yamanaka H, Obata K, Fukuoka T, Dai Y, Kobayashi K, Tokunaga A, Noguchi K: Induction of plasminogen activator inhibitor-1 and -2 in dorsal root ganglion neurons after peripheral nerve injury. *Neuroscience* 132:183-191, 2005
30. Sayegh AI, Covasa M, Ritter RC: Intestinal infusions of oleate and glucose activate distinct enteric neurons in the rat. *Auton Neurosci* 115:54-63, 2004
31. von Boyen GB, Reinshagen M, Steinkamp M, Adler G, Kirsch J: Gut inflammation modulated by the enteric nervous system and neurotrophic factors. *Scand J Gastroenterol* 37:621-625, 2002
32. von Boyen GB, Steinkamp M, Geerling I, Reinshagen M, Schafer KH, Adler G, Kirsch J: Proinflammatory cytokines induce neurotrophic factor expression in enteric glia: a key to the regulation of epithelial apoptosis in Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 12:346-354, 2006
33. Murakami M, Ohta T, Ito S: Lipopolysaccharides enhance the action of bradykinin in enteric neurons via secretion of interleukin-1beta from enteric glial cells. *J Neurosci Res* 87:2095-2104, 2009
34. De Jonge F, Van Nassauw L, Adriaensen D, Van Meir F, Miller HR, Van Marck E, Timmermans JP: Effect of intestinal inflammation on capsaicin-sensitive afferents in the ileum of *Schistosoma mansoni*-infected mice. *Histochem Cell Biol* 119:477-484, 2003
35. Vogel U, Danesvar B, Autrup H, Risom L, Weimann A, Poulsen HE, Moller P, Loft S, Wallin H, Dragsted LO: Effect of increased intake of dietary animal fat and fat

energy on oxidative damage, mutation frequency, DNA adduct level and DNA repair in rat colon and liver. *Free Radic Res* 37:947-956, 2003

36. Bertelsen LS, Bukhave K: Oxidant-stimulated chloride secretion in rat jejunum in vitro is mediated by eicosanoids. *Dig Dis Sci* 48:598-604, 2003

37. Kellogg AP, Pop-Busui R: Peripheral nerve dysfunction in experimental diabetes is mediated by cyclooxygenase-2 and oxidative stress. *Antioxid Redox Signal* 7:1521-1529, 2005

38. Ogetman Z, Dirlik M, Caglikulekci M, Canbaz H, Karabacak T, Yaylak F, Tamer L, Kanik A, Aydin S: The effect of aminoguanidine on blood and tissue lipid peroxidation in jaundiced rats with endotoxemia induced with LPS. *J Invest Surg* 19:19-30, 2006

39. Youssef S, Nguyen DT, Soulis T, Panagiotopoulos S, Jerums G, Cooper ME: Effect of diabetes and aminoguanidine therapy on renal advanced glycation end-product binding. *Kidney Int* 55:907-916, 1999

Références qui étaient placées sous les legends des figures !!!

1. D'Alessio DA, Kieffer TJ, Taborsky GJ, Jr., Havel PJ: Activation of the parasympathetic nervous system is necessary for normal meal-induced insulin secretion in rhesus macaques. *J Clin Endocrinol Metab* 86:1253-1259, 2001

2. Ahren B, Holst JJ: The cephalic insulin response to meal ingestion in humans is dependent on both cholinergic and noncholinergic mechanisms and is important for postprandial glycemia. *Diabetes* 50:1030-1038, 2001

3. Bharucha AE, Charkoudian N, Andrews CN, Camilleri M, Sletten D, Zinsmeister AR, Low PA: Effects of glucagon-like peptide-1, yohimbine, and nitrergic modulation on sympathetic and parasympathetic activity in humans. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 295:R874-880, 2008

4. Yamamoto H, Lee CE, Marcus JN, Williams TD, Overton JM, Lopez ME, Hollenberg AN, Baggio L, Saper CB, Drucker DJ, Elmquist JK: Glucagon-like peptide-1 receptor stimulation increases blood pressure and heart rate and activates autonomic regulatory neurons. *J Clin Invest* 110:43-52, 2002

Figure legends.

Figure 1: Effects of intestinal and brain FFA on the glucose homeostasis. In 24h intragastric infusion with isocaloric (isocal, white bar or full line) or intralipid (IL, black bar or dash line) solution **A-** Plasma TG (g/l) **B-** FFA(mM) concentration **C-**Plasma portal GLP1 concentration (pM) after the intragastric perfusion (t0) and fifteen minutes after glucose gavage.**D-** Time course of glycemia (mM) during OGTT. **E-** Plasma insulin (pg/ml) twenty minutes before and fifteen minutes after glucose.-**F-** Time course of glycemia during ITT. In 24h carotid perfusion of NaCl (white bar or full line) or IL (black bar or dash line) solution **G-**glycemia and **H-**insulinemia during OGTT **I-**Time course of glycemia during ITT (n= 8) *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 compared to controls.

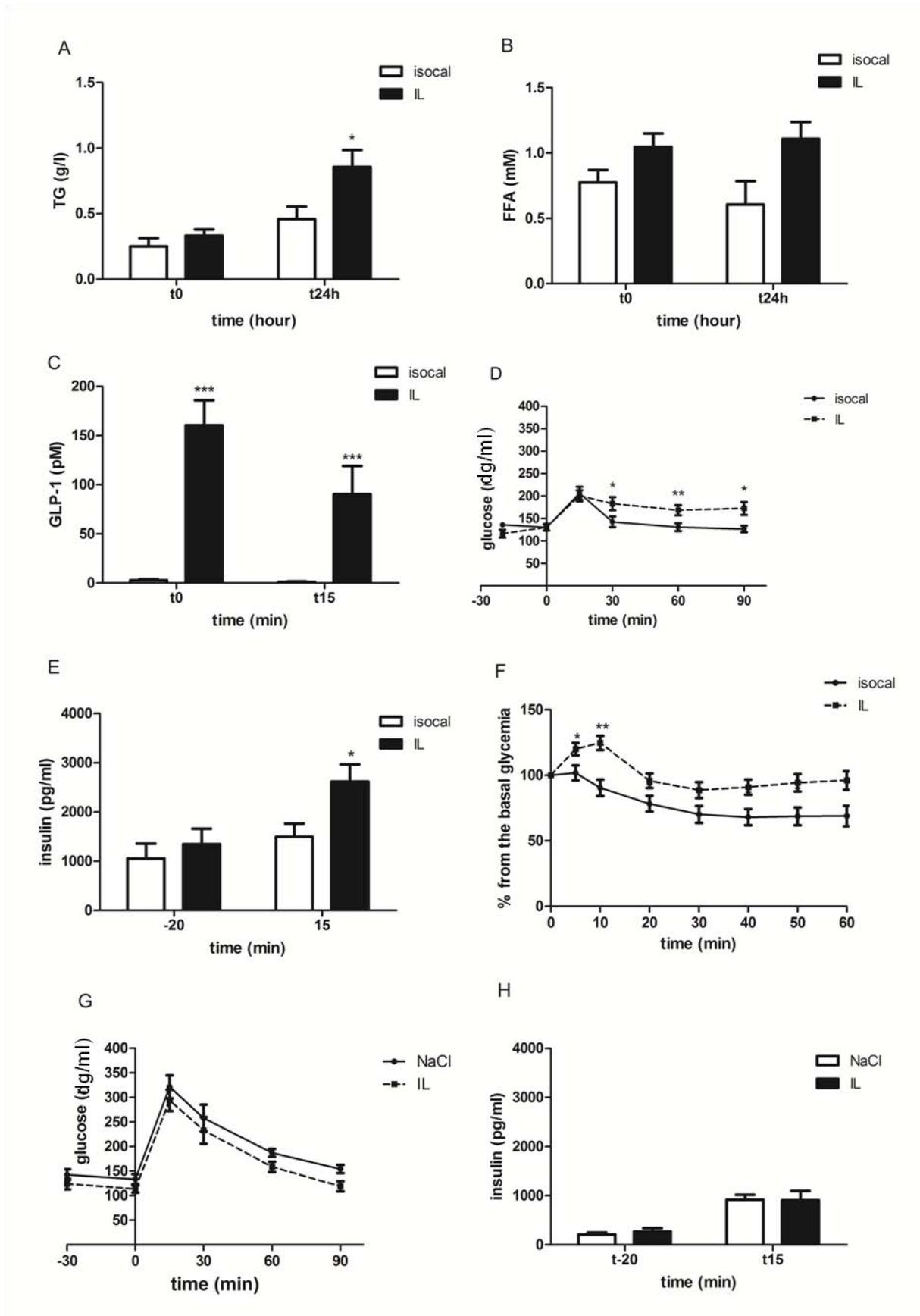
Figure 2: Lipid content and markers of inflammation in intestine. In isocal (white bar) or IL (black bar) perfusion mice **A-** FFA content (-mM). **B-** Electronic microscopy of jejunum (*4000). **C,D,E-**mRNA expression of TNF α (**C**), IL1 β (**D**) and PAI-1 (**E**),. **F,G-**number of macrophage (F4/80) (**F**) and F4/80 immunohistochemistry (**G**).

Figure 3: Markers of oxidative stress in intragastric-infused mice. In isocal (white bar or full line) or IL (black bar or dash line) perfusion mice **A,B,C-** mRNA expression of NADPH oxydase (**A**), GST (**B**), catalase (**C**). **D,E-**Activity of glutathion reductase and **F-** lipid peroxidation by the expression of MDA ($\mu\text{M}/\mu\text{g}$ protein) in the duodenum and jejunum. **G,H,I,J,K-** infusion of isocaloric and intralipid solution during 6h. **G-**MDA production, **H,I-** glutathion reductase activity in duodenum (**G**) and jejunum (**H**), **J-** time course of glycemia after the oral glucose challenge.

Figure 4: Effects of aminoguanidine on glucose homeostasis Effect of IL (black bar or dashline) or IL with aminoguanidin (IL +amino; grey bar or fullline) solution, in intragastric-perfused mice. **A-** Malondialdehyde (MDA) production in duodenum and jejunum at the end of the infusion and, **B-** FFA (mM), **C-** TG(g/l) concentration before (t0) and after (24h) the perfusion. **D-** Glycemia (mM) and **E-** insulin concentration (pM) before and after glucose challenge in intragastric **F-**time course of glycemia after insulin load.

Figure 5: Activity of the vagal nerve. A- Recordings during 5 min before (upper panel) and 5 min after (bottom panel) the glucose load in isocaloric (isocal), intralipid (IL) or, aminoguanidin treated-IL (IL + amino) condition. **B-** Frequency of the vagal activity recorded before and during OGTT. ** $p < 0.01$ vs IL.

figure 1



I

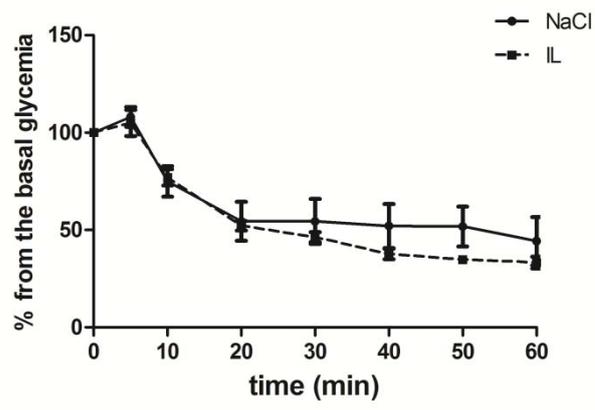
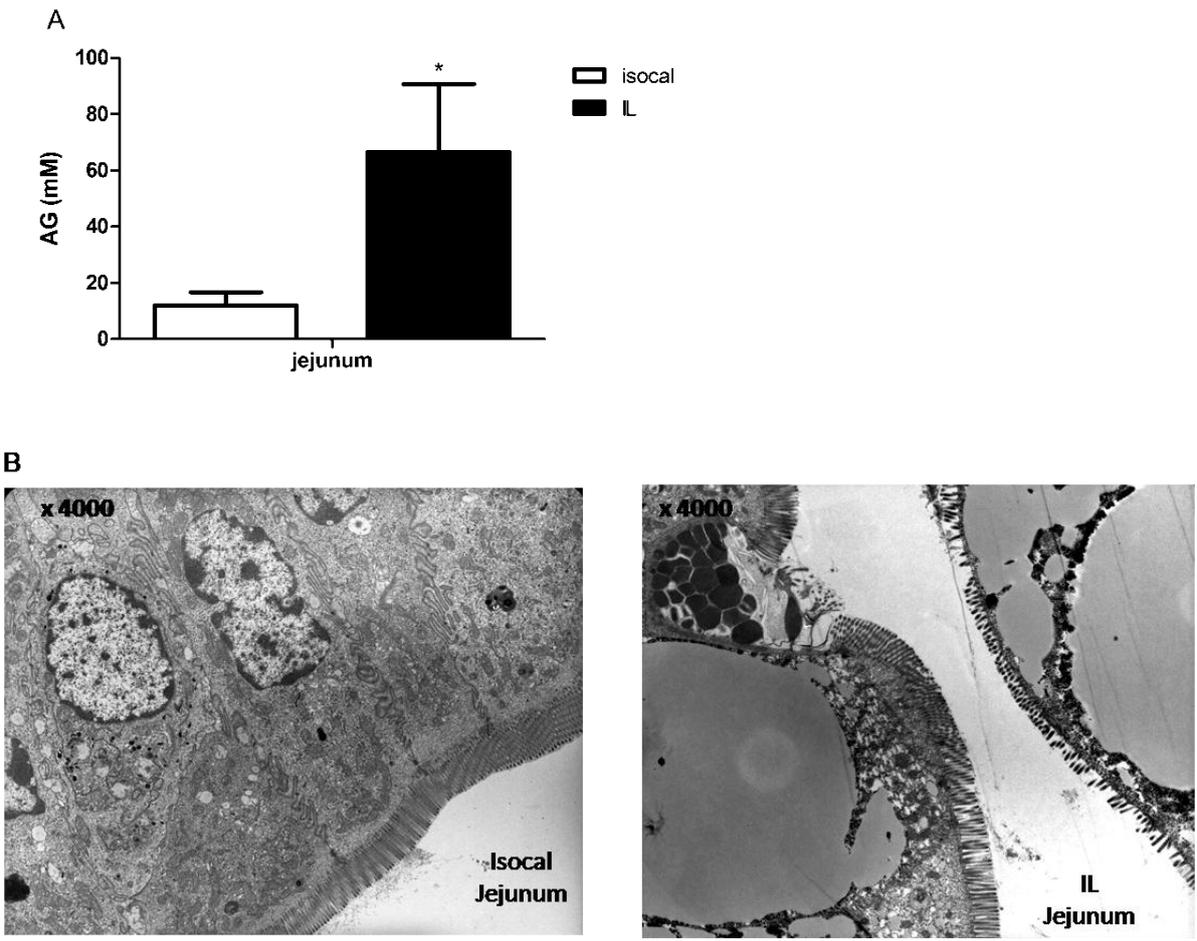


Figure 2



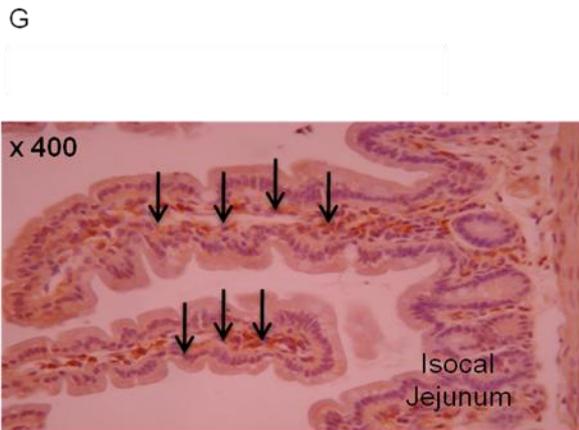
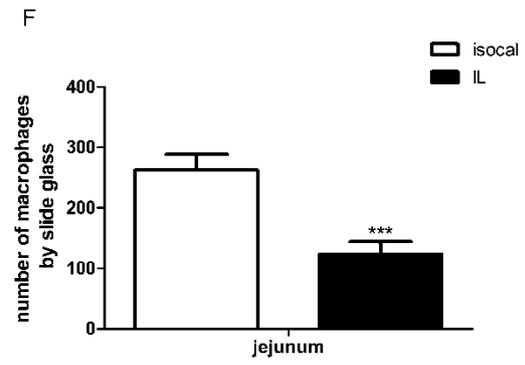
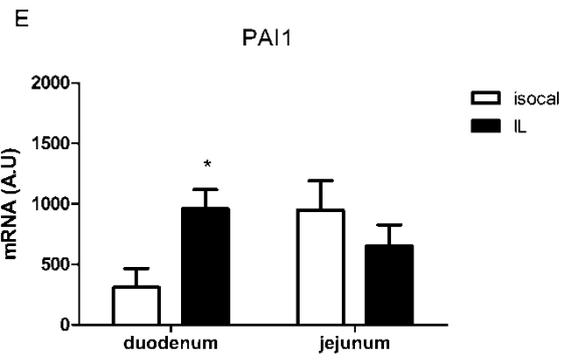
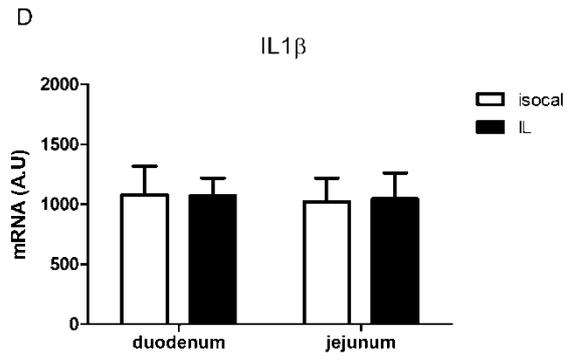
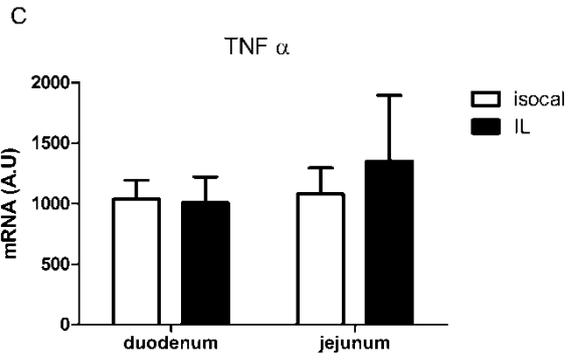
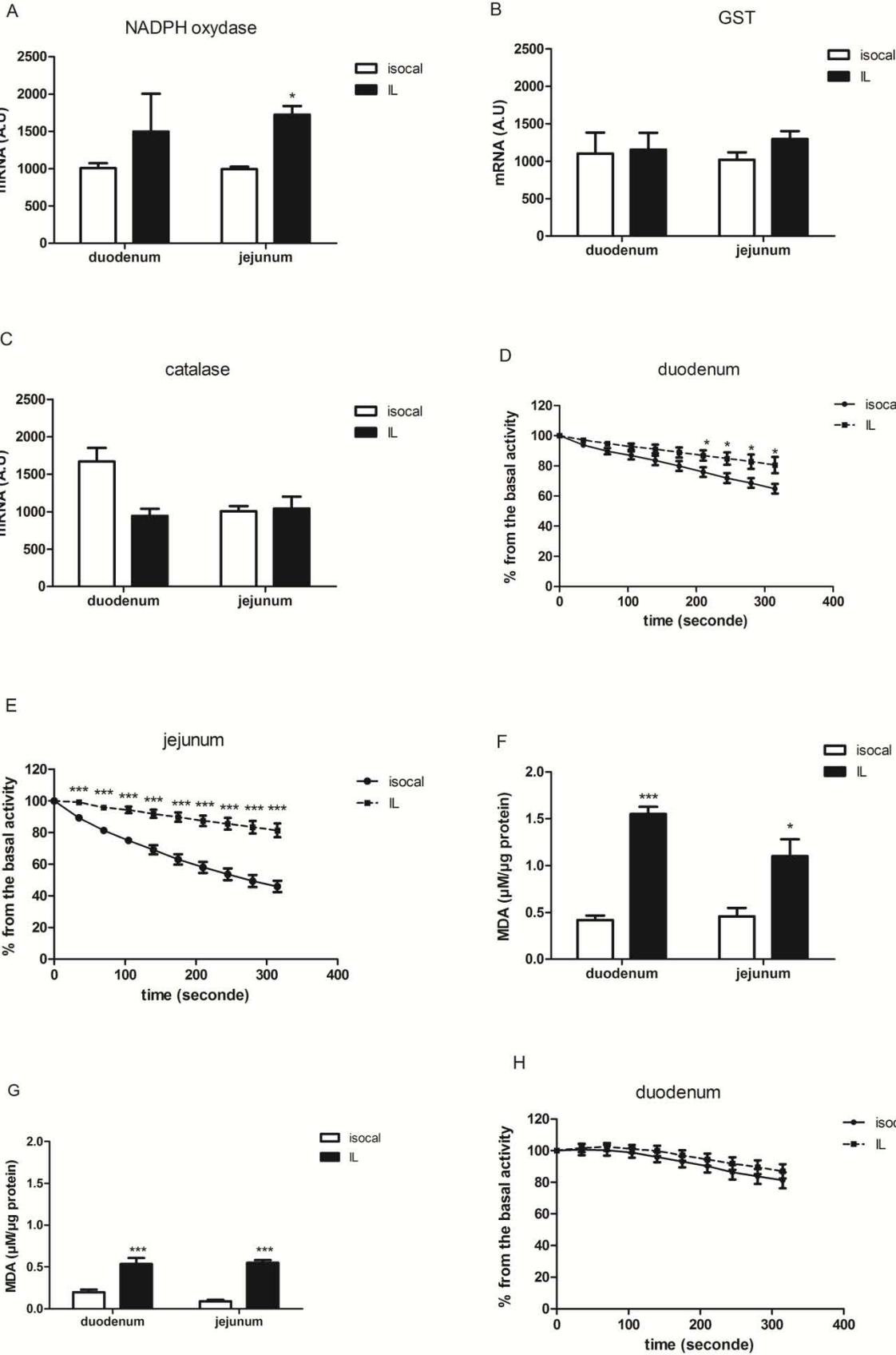


Figure 3



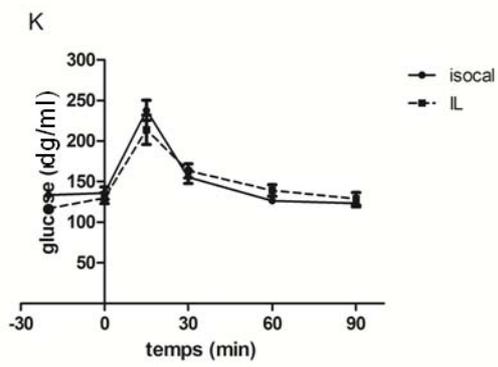
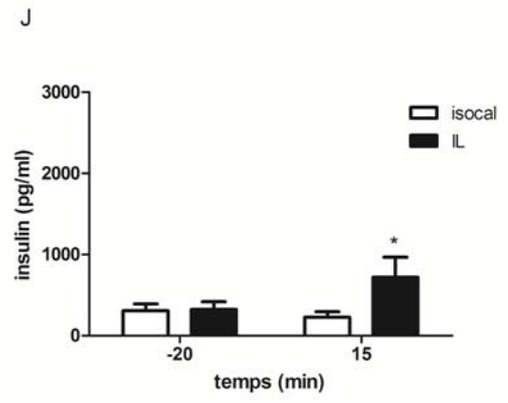
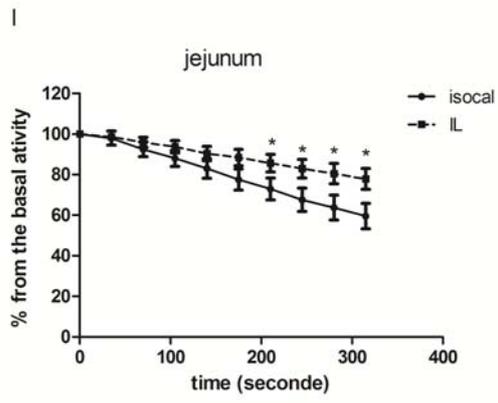


Figure 4

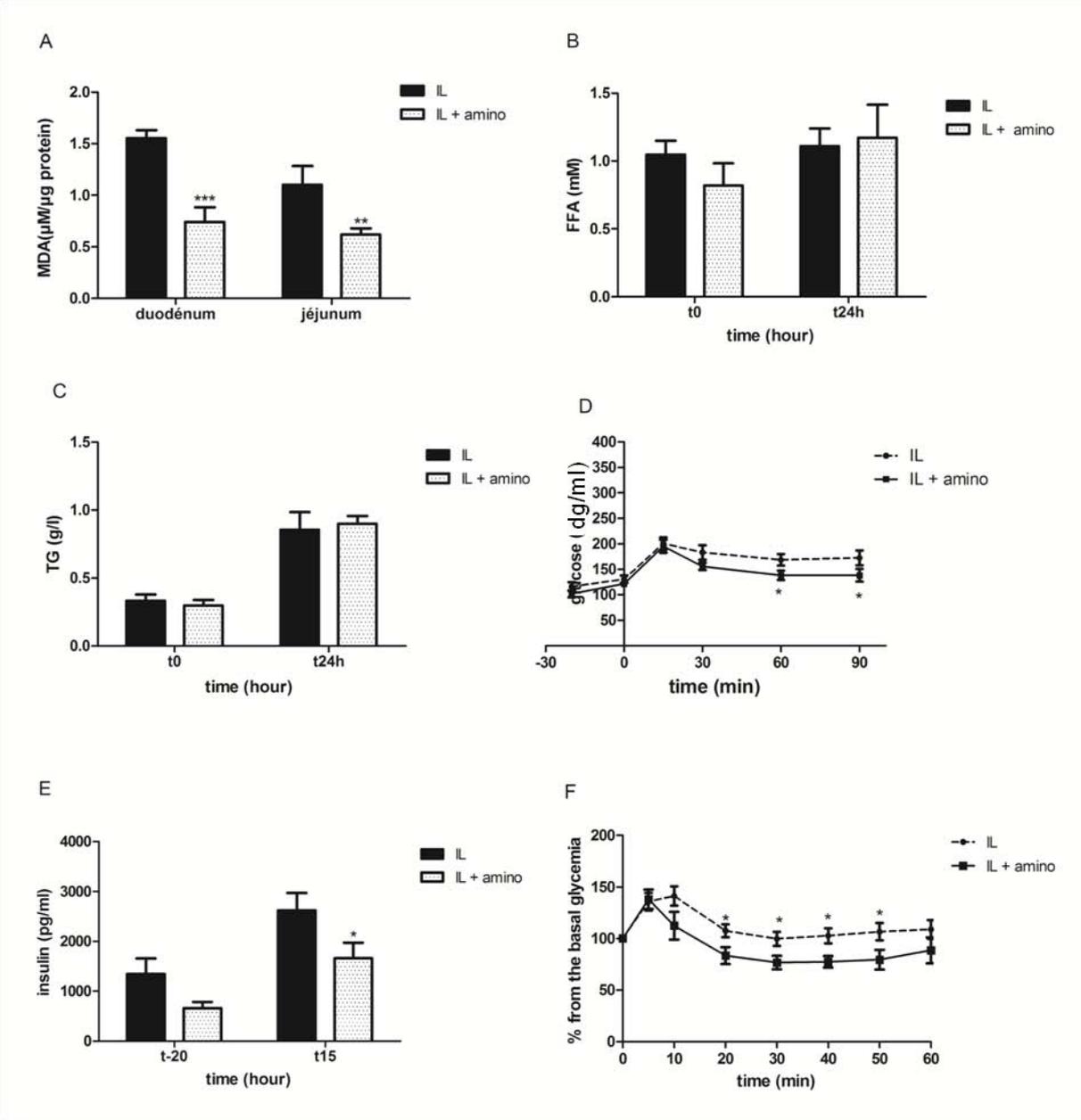
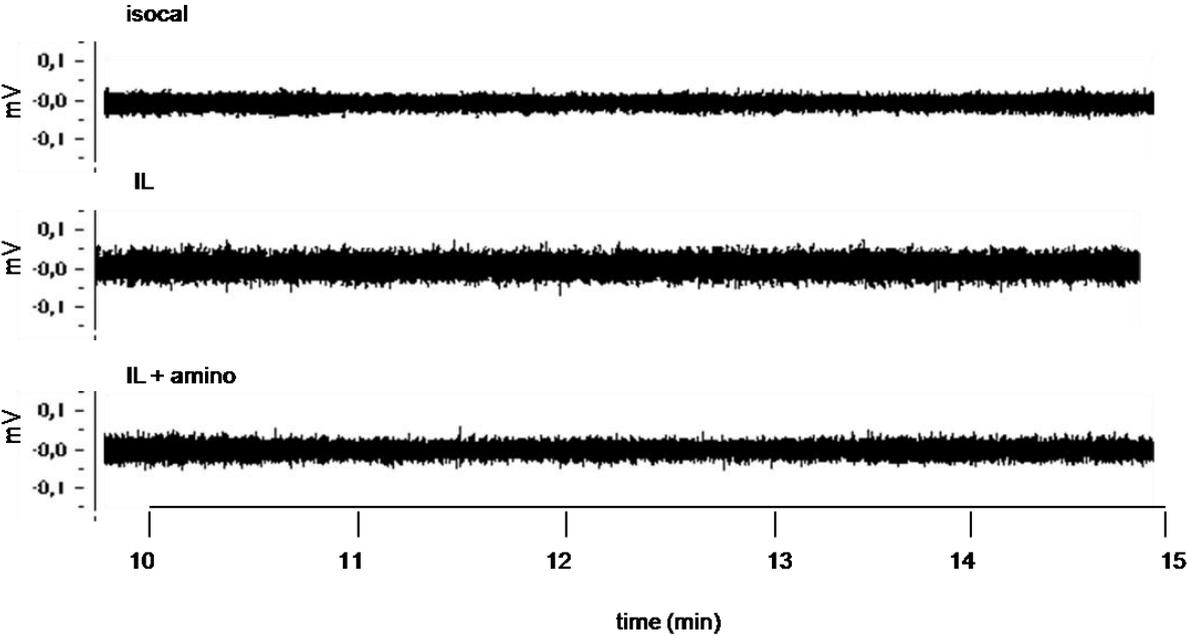


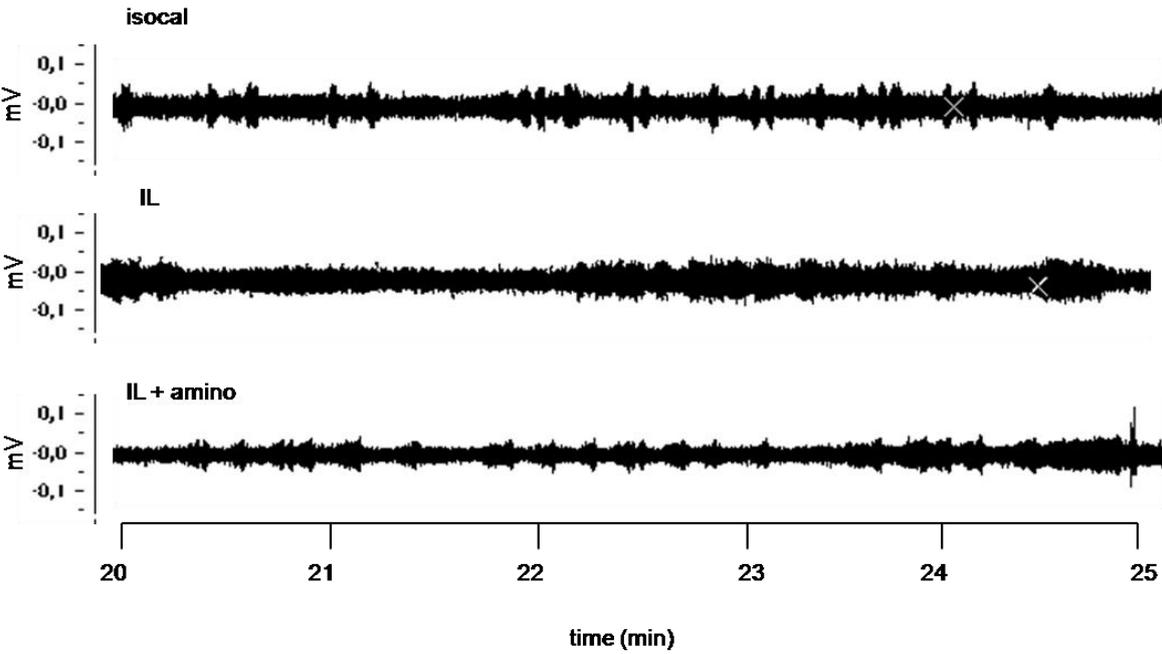
Figure 5

A

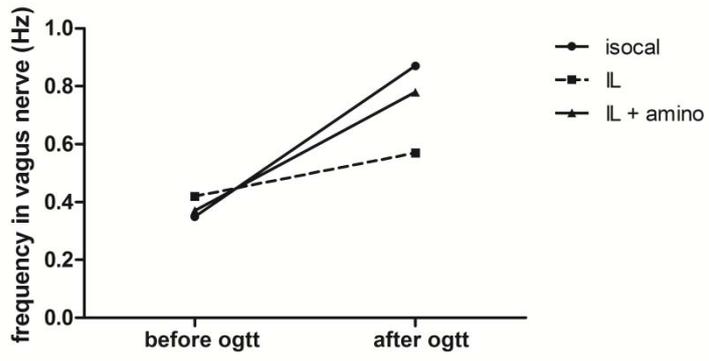
Before the glucose load



After glucose load



B



***D*iscussion**

Dans la première partie, l'étude d'une faible dose de sitagliptine, nous permet de conclure que la DPP-IV présente dans la lumière intestinale est suffisante pour contrôler la glycémie. Elle induirait deux processus de régulation de la glycémie par sa capacité à inactiver le GLP-1 (7-37). Dans un premier temps, elle induirait une action courte et efficace du GLP-1 dans la sphère entéro-portale qui permettrait à celle-ci d'augmenter la sécrétion d'insuline et de diminuer la glycémie. Dans un second temps, elle permettrait la génération d'un dipeptide issu du clivage du GLP-1 actif, l'histidine-alanine. Ce dipeptide agirait alors par un rétrocontrôle de la glycémie en diminuant la sécrétion d'insuline et en augmentant la sécrétion de glucagon.

La DPP-IV est une enzyme présente sur la bordure en brosse des cellules endothéliales (174) mais aussi sur les pôles apical et basal des cellules intestinales. Sa localisation entérique expliquerait son action directe précoce sur le GLP-1(7-37). Ainsi, par l'administration orale d'une faible dose de sitagliptine (4µg), nous démontrons que la DPP-IV est efficace pour réguler la glycémie. En effet, à cette dose, l'activité de la DPP-IV est inhibée dans le jéjunum des souris traitées à la sitagliptine sans que la concentration portale de GLP-1 actif ne soit augmentée. La dose supérieure, 40µg de l'agent pharmacologique, confirme l'inhibition de la DPP-IV qui est plus fortement marqué dans les différents segments de l'intestin mais qui n'augmente pas la concentration plasmatique de GLP-1 dans la veine porte. L'inhibition de la DPP-IV systémique par administration intraveineuse de 4µg de sitagliptine montre que celle-ci n'est pas recrutée pour le contrôle glucidique. La régulation de l'homéostasie glucidique semble donc bien être dépendante des sensors entéro-portaux (324; 332; 333) et des hormones qui en sont dépendantes.

Le GLP-1 est connu pour avoir de nombreux effets systémiques associés à l'expression de son récepteur sur les tissus cibles (152 ; 176-179). Néanmoins les modes d'actions restent à préciser étant donné sa durée de vie courte. Le récepteur au GLP-1 est localisé dans la sphère entéro-portale, précisément sur les fibres afférentes du nerf vague (187), et sur le sensor portal au glucose (6; 101; 104). D'autre part, le travail récent de l'équipe de Mulè, démontre la présence de récepteur au GLP-1 sur les neurones entériques du duodénum et du colon (334). Ces derniers seraient présents sur les neurones cholinergiques pour activer la nNOS qui induirait une diminution de l'excitation de ces neurones. Ces arguments sont donc en faveur d'une action locale du GLP-1 qui recruterait l'axe « intestin-cerveau » pour réguler la glycémie. L'utilisation d'une faible dose de sitagliptine nous a donc permis d'affiner le site

d'action du GLP-1 actif. A la dose minimale active de sitagliptine, 4 μ g, l'inhibition du récepteur au GLP-1 par un antagoniste, l'exendine 9, nous montrons que cette hormone est bien impliquée dans le contrôle de la glycémie et qu'elle est dépendante de l'activité de la DPP-IV. L'inhibition, uniquement entérique, de la DPP-IV pour cette dose de sitagliptine suggère donc que seuls les récepteurs au GLP-1 localisés dans l'intestin sont alors impliqués. D'autre part l'inhibition de la DPP-IV à très faible dose permet un contrôle de la glycémie qui induit un pic glycémique 15 minutes après la charge orale en glucose. Ainsi, en présence de l'agent pharmacologique et d'une perfusion intracérébroventriculaire d'exendine 9, nous constatons que le récepteur cérébral au GLP-1 est impliqué dans cette régulation de l'énergie métabolique. Nos résultats confirment donc qu'il existe une communication entre le sensor au glucose entérique et les centres intégrateurs du glucose qui permet le recrutement du GLP-1 cérébral (85). L'ensemble de ces résultats confirme donc le concept d'« arc réflexe métabolique anticipateur » pour lequel le GLP-1 agirait via l'axe « intestin-cerveau » pour activer le recrutement du GLP-1 cérébral. Ce dernier transmettrait alors un message nerveux efférent à la cellule B du pancréas pour favoriser la sécrétion d'insuline. La voie d'action directe du GLP-1 sur la cellule B du pancréas semble donc être une voie mineure de régulation de la glycémie. L'enregistrement de l'activité du nerf vague, sur l'animal anesthésié qui a reçu une forte charge orale en sitagliptine (pour maximiser la sensibilité à l'agent pharmacologique), montre qu'elle modifie la transmission du message nerveux déclenchée par une charge orale en glucose.

La DPP-IV est une enzyme qui a de nombreux substrats (220; 221) et dont la fonction est de scinder les peptides qui ont un acide aminé histidine ou tyrosine en position 8. Le GLP-1 (7-37) est donc dégradé en un peptide (9-37) inactif et un dipeptide, l'histidine alanine, dont les fonctions ne sont pas décrites. Les acides aminés sont reconnus pour faire sécréter le glucagon (25; 26). La dose minimale active de sitagliptine n'augmente pas l'insulinémie. En revanche, dès l'administration de 40 μ g la sécrétion d'insuline est augmentée suite à une charge orale en glucose. Ainsi, en ajoutant une administration intraveineuse d'histidine-alanine à ce protocole la sécrétion d'insuline est diminuée alors que la sécrétion de glucagon est augmentée. Le mode d'action de dipeptide reste à élucider. Les transporteurs de di-tripeptide recensés sont PEPT1 et PEPT2 (335; 336). PEPT 1 est présent sur la bordure en brosse des entérocytes alors que PEPT2 est localisé sur les cellules rénales. Ces transporteurs sont dépendants d'un gradient de protons, ce qui est favorable à son activité dans l'environnement acide de

l'intestin (38). Ces transporteurs ne seraient pas présents sur la cellule B du pancréas. Une action directe de l'His-Ala sur la cellule B est donc peu probable. La localisation de transporteur sur la cellule A du pancréas est non décrite. La littérature offre peu d'argument pour comprendre le mode d'action du dipeptide His-Ala. Nos résultats sur les îlots murins et humains montrent tout de même que l'effet de ce dipeptide est dépendant d'une stimulation par le glucose. D'autre part, une étude démontre que le transporteur PEPT2 serait aussi localisé sur les cellules gliales du système nerveux entérique (337). Par l'importance du système entéro-portal et la rapidité d'action de la DPP-IV, nous pouvons donc supposer que l'His-Ala agirait sur les cellules nerveuses du nerf vague pour agir indirectement sur le pancréas, via l'arc « intestin-cerveau- pancréas ». Ainsi, la dégradation du GLP-1 par la DPP-IV permettrait de rétrocontrôler la glycémie en modulant les taux d'insuline et de glucagon. En effet, le GLP-1 entérique et central sont connus pour être hyperinsulinémiants. Si l'action insulinothrompique de ces hormones n'était pas contrôlée, l'organisme tendrait vers une hypoglycémie. Ainsi, la DPP-IV serait nécessaire pour anticiper les désordres métaboliques (Figure 1).

La littérature suggère que les patients atteints d'un diabète de type II auraient une diminution de l'activité de la DPP-IV (279; 280) ce qui favoriserait donc l'effet hypoglycémiant du GLP-1. Une étude physiologique obtenue avec une forte dose de sitagliptine a donc pu nous renseigner sur les mécanismes impliqués lorsque la concentration plasmatique de GLP-1 portal est augmentée.

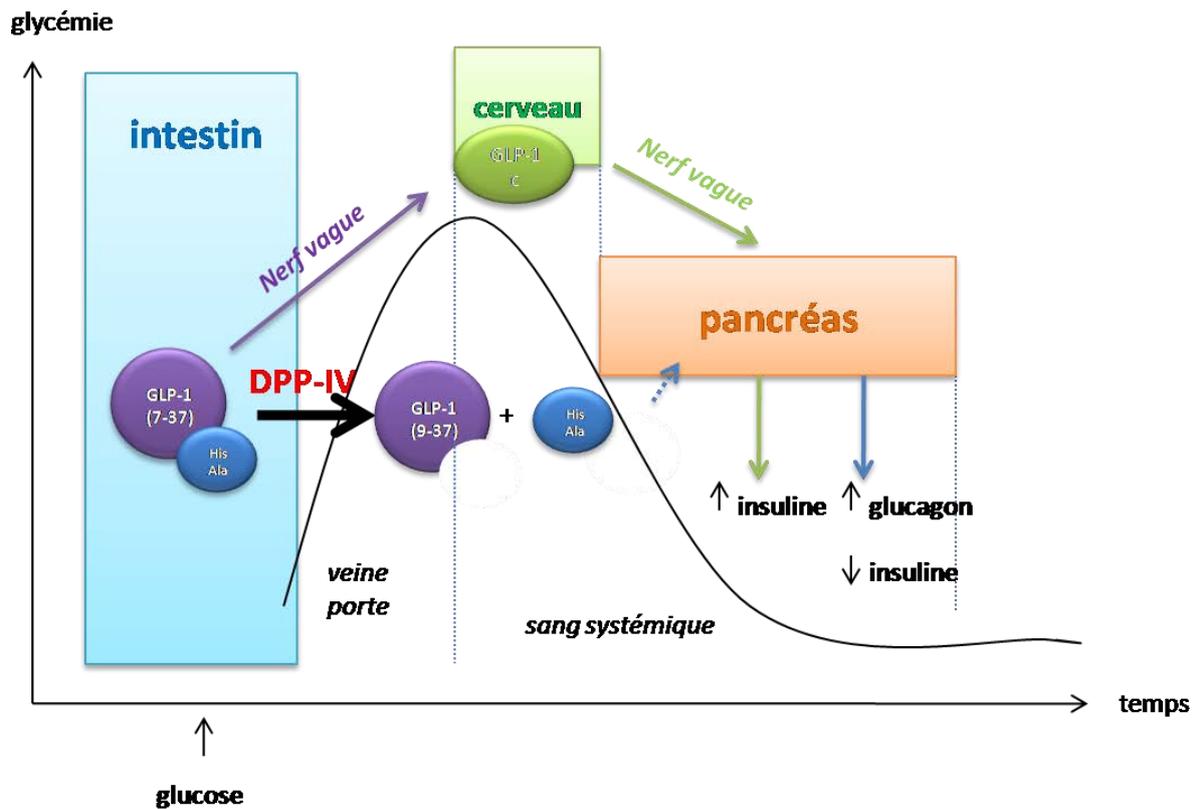


Figure 1 : schéma synthétisant l'interprétation des résultats obtenus avec une faible dose de sitagliptine (4µg). Le profil de la glycémie (trait noir) dans le temps en réponse à une charge orale en glucose est corrélé à la dégradation du GLP-1(7-37) par la DPP-IV dans la sphère entéro-portale. Le GLP-1 (7-37) régule la glycémie mais permet un pic glycémique qui permet le recrutement du GLP-1 cérébral (GLP-1c). Ce dernier active alors la sécrétion d'insuline. La dégradation du GLP-1(7-37) génère le GLP-1(9-37) et le dipeptide his-ala (rond bleu). Il augmente la sécrétion de glucagon et diminue la sécrétion d'insuline.

L'étude faite avec l'administration d'une forte dose de sitagliptine (40mg) pourrait être interprétée d'un œil pharmacologique. Néanmoins, elle peut aussi nous orienter sur ce qui se passerait si la sécrétion de GLP-1 n'était plus contrôlée. Ainsi, les résultats obtenus avec cette dose élevée de sitagliptine nous montrent qu'une forte inhibition de la DPP-IV dans la lumière intestinale, le sang portal et systémique augmente la concentration et l'effet du GLP-1 sur le contrôle de la glycémie. La glycémie est alors fortement diminuée en réponse à la sitagliptine. Nous concluons aussi que malgré l'augmentation notable du GLP-1 qui pourrait alors avoir une action directe sur les tissus cibles, celui-ci est toujours dépendant des sensors

entéro-portaux du glucose, lié à l' « axe intestin-cerveau » et au gradient artériovoineux du glucose.

Ainsi, des souris traitées par une administration orale de 40mg de sitagliptine, ne présentent pas de pic hyperglycémique en réponse à une charge orale en glucose. En effet, l'activité de la DPP-IV est inhibée à 50% dans la lumière intestinale, le sang portal et systémique par rapport aux souris témoins ce qui représenterait une inhibition maximale. A cet effet, la concentration plasmatique de GLP-1 actif est alors élevée. Néanmoins, la sécrétion d'insuline n'est pas augmentée ; elle serait même diminuée pour des temps précoces. Les clamps hyperglycémiques réalisés par voie intragastrique nous montrent que pour une même hyperglycémie, la concentration plasmatique de GLP-1 dans le sang portal est augmentée chez les souris traitées à la sitagliptine bien que la sécrétion d'insuline ne soit toujours pas augmentée. L'absence de différence dans le flux de glucose administré chez les souris traitées à la sitagliptine enlève donc l'hypothèse d'un retard gastrique induit par le GLP-1. Cette absence d'effet incrétine serait donc due au traitement à la sitagliptine. L'utilisation de l'antagoniste au récepteur au GLP-1, l'exendine 9, montre que le GLP-1 est bien impliqué dans le contrôle de la glycémie en présence de sitagliptine. Le test de tolérance au glucose réalisé par voie intraveineuse, alors que l'agent pharmacologique est toujours administré par voie orale, nous prouve que le récepteur au GLP-1 présent dans la veine porte est largement impliqué dans le contrôle de la glycémie même en condition de forte dose de sitagliptine. En effet, selon ce protocole la sitagliptine est tout de même associée une sécrétion inattendue de GLP-1. Néanmoins, cette dernière a été inefficace pour réguler la glycémie car par l'administration intraveineuse de glucose le gradient artériovoineux physiologique de glucose n'est pas respecté. Or, le sensor portal du glucose dépendant du récepteur au GLP-1 est dépendant du sens de ce gradient de glucose (101; 102). D'autre part, le sensor portal du glucose en présence d'exendine 4 induit une hypoglycémie sans modifier la sécrétion des hormones pancréatiques (101). Ceci suggère que même à forte dose de sitagliptine qui induit une augmentation de la concentration portale de GLP-1, le contrôle de la glycémie par cette hormone est dépendant de l'axe « intestin-cerveau » et du système porte qui induit une hypoglycémie indépendamment de la sécrétion d'insuline (Figure 2).

D'autre part, la perfusion cérébrale d'exendine 9 montre que l'antagoniste ne réverse pas l'effet non hyperglycémiant de la sitagliptine administrée à 40mg par voie orale. Le GLP-1 cérébral ne serait donc pas recruté ou aurait une action non décelable dans ce protocole. Ce

résultat est donc conforme avec les travaux de Knauf et coll. qui démontrent que le GLP-1 cérébral est actif qu'en condition hyperglycémique (214). Ainsi, le rôle insulinosécrétagogue du GLP-1 cérébral et sa capacité à favorise le stockage hépatique de glucose aux dépends des muscles sont évités. Physiologiquement, cette absence de recrutement du GLP-1 cérébral serait nécessaire pour que l'organisme ne tombe pas en hypoglycémie.

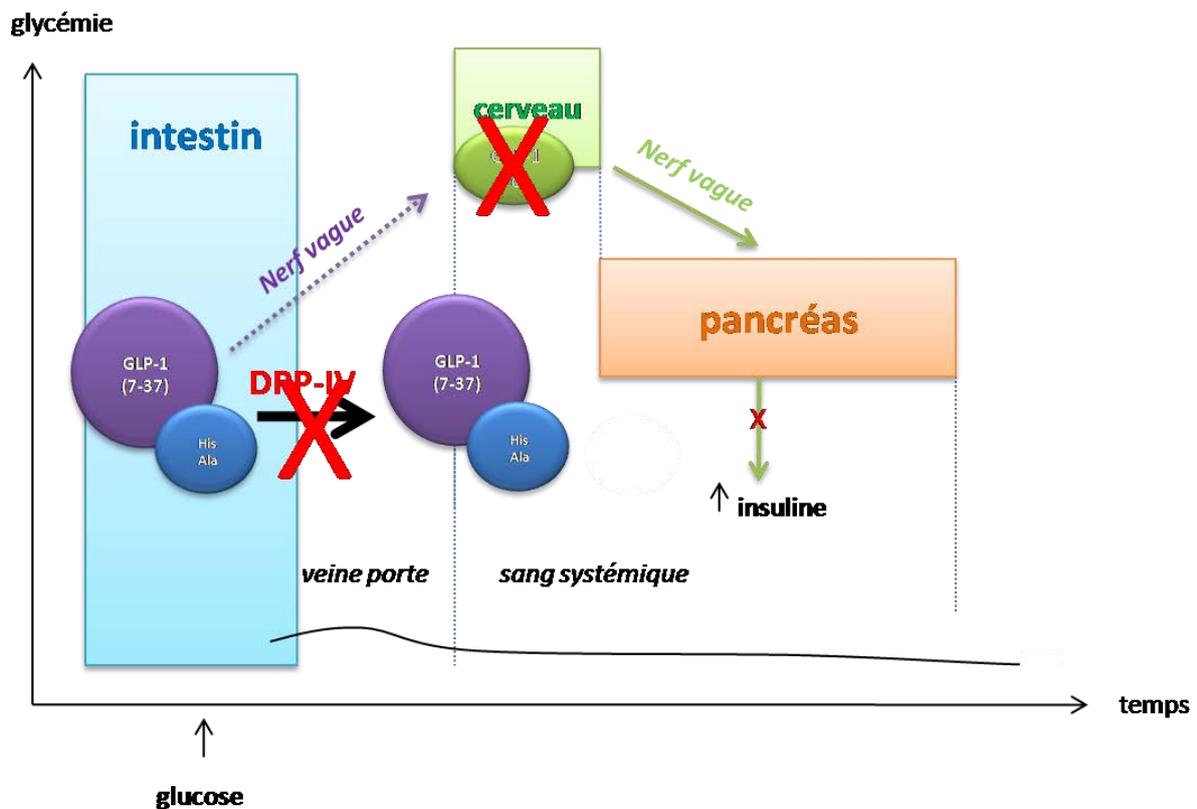


Figure 2 : Schématisation des résultats obtenus avec une forte dose de sitagliptine (40mg). L'activité de la DPP-IV est inhibée, la concentration de GLP-1(7-37) est alors fortement augmentée. Il active fortement les sensors au glucose de la veine porte qui diminue fortement la glycémie. Le GLP-1 cérébral ne peut donc pas être recruté pour stimuler la sécrétion d'insuline.

D'après ces deux études faites par différentes doses de sitagliptine, nous suggérons que l'axe « intestin-cerveau » posséderait différents points de contrôles qui anticipent une dérégulation de l'homéostasie glucidique (Figure 3). L'activité de la DPP-IV qui régule la

concentration et donc l'action hypoglycémiante du GLP-1 (7-37) semble donc être un premier point de contrôle dans l'axe « intestin-cerveau ». Cette régulation fine de l'effet du GLP-1 par la DPP-IV permettrait dans un premier temps de ne pas induire une concentration trop élevée de GLP-1 dans la veine porte qui alors induirait une amélioration trop efficace de la tolérance au glucose voir une hypoglycémie. D'autre part, le contrôle rapide de l'effet hypoglycémiant du GLP-1 (7-37) par la DPP-IV permet une détection systémique et/ou centrale d'hyperglycémie qui permettrait le recrutement du GLP-1 cérébral. Ce dernier favoriserait alors une sécrétion d'insuline et un stockage hépatique de glucose pour restaurer une glycémie de 7mM. Le « feu vert » qui permet le recrutement du GLP-1 cérébral serait donc un signe du bon fonctionnement de l'axe « intestin-cerveau » et de la régulation de la glycémie. Ainsi, même dans des situations de perte de contrôle de l'activité de la DPP-IV, il existerait ce second point de contrôle pour le maintien de la glycémie pour éviter la souffrance au moins métabolique de l'organisme.

En scindant au moins le GLP-1 actif, la DPP-IV stoppe l'efficacité de cette molécule ce qui permettrait d'éviter une hypoglycémie rapide dû à l'activation des sensors portaux au glucose dépendant du GLP-1. D'autre part, la dégradation de cette molécule par la DPP-IV génère le dipeptide histidine-alanine. Celui-ci diminue la sécrétion d'insuline et augmente la sécrétion de glucagon qui peut être considéré comme un rétrocontrôle de l'effet incrétine du GLP-1. Ce deuxième effet de la DPP-IV serait donc un autre point de contrôle pour le maintien de l'homéostasie glucidique. Le rôle « mécanistique » de la DPP-IV est donc un contrôle précoce dans la régulation de l'homéostasie glucidique.

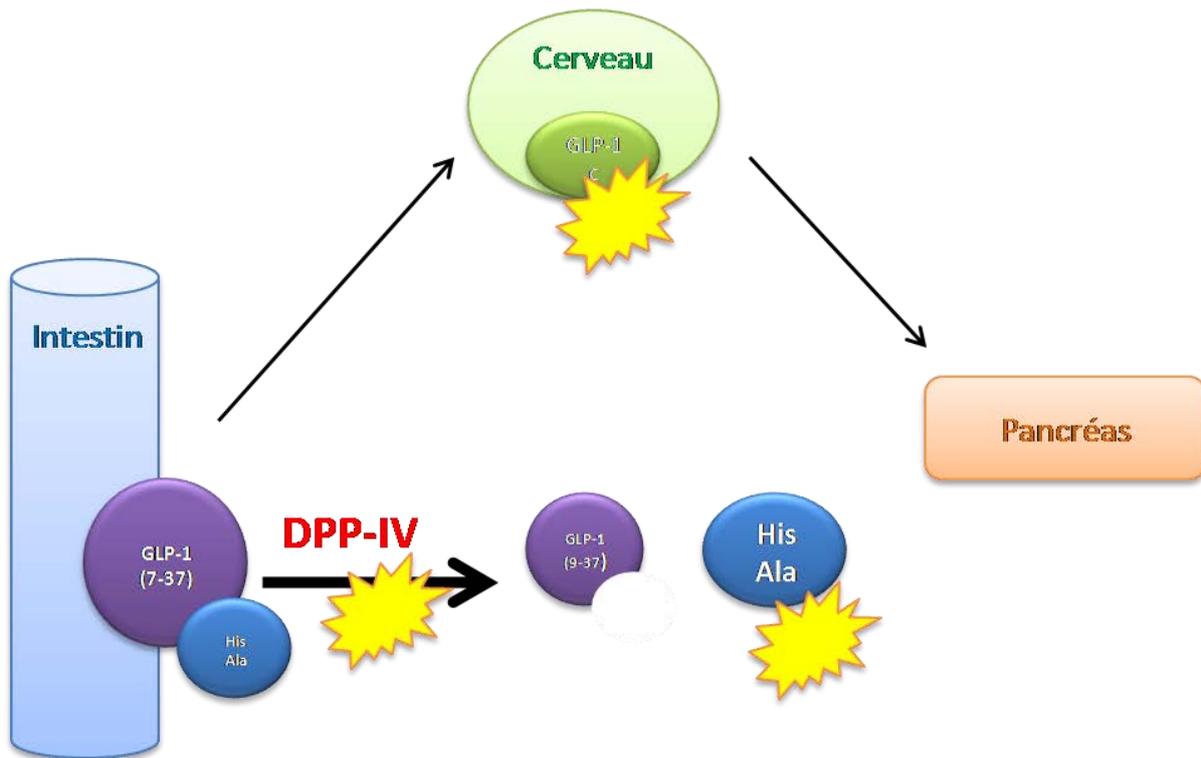


Figure 3 : Représentation des points de contrôle (étoile jaune) de l' « arc réflexe métabolique anticipateur » : La dégradation du GLP-1 (7-37) par la DPP-IV, la génération du dipeptide His-Ala, et le pic hyperglycémique qui permet ou non le recrutement du GLP-1 cérébral.

Les résultats avancés dans la seconde partie, montrent que les signaux provenant de l'axe « intestin-cerveau » conditionneraient l'intégration du message nerveux central qui est ensuite transmis aux organes périphériques. Ainsi, malgré une perfusion de 24 heures par une solution de lipides, détectés seulement par le cerveau, les souris n'ont pas été intolérantes au glucose lorsqu'il a été administré par voie orale. Ces souris ont aussi présenté une sensibilité à l'insuline identique aux souris contrôles. En revanche, lorsque les souris ont été perfusées pendant 24 heures par une solution de lipides, qui n'augmentent pas la concentration plasmatique d'acides gras, elles présentent une intolérance au glucose et une perte de sensibilité à l'insuline. L'insulinémie de ces souris est augmentée et associée à une augmentation de la concentration plasmatique de GLP-1. L'hyperinsulinémie de ces souris serait donc liée à une hypersécrétion de GLP-1 qui ne serait plus contrôlée par la DPP-IV car l'activité de cette dernière pourrait être inhibée par les lipides. Le phénotype diabétique de ces souris est donc en accord avec notre concept de point clé de l'axe « intestin-cerveau »

nécessaire à la régulation de la glycémie. Les lipides sont connus pour augmenter la sécrétion du GLP-1 (160) alors que dans des conditions de diabète celle-ci est diminuée (338). Notre protocole se place donc dans l'initiation d'un état d'insulinorésistance. L'intolérance au glucose et l'insulinorésistance périphérique en réponse à la charge orale en glucose des souris traitées aux lipides suggèrent que le sensor entérique au glucose est altéré.

Les mécanismes par lesquels les lipides créent ce désordre métabolique seraient le développement d'une inflammation et d'un stress oxydant. Or, après une perfusion intragastrique de lipides, le contenu en acides gras du jéjunum est augmenté et les entérocytes présentent de grosses gouttelettes lipidiques. Comme les adipocytes, les entérocytes semblent donc être capable de stocker les graisses. Les cellules intestinales ont déjà démontré des fonctions surprenantes. Les travaux de Mitthieux et coll. montrent que l'intestin proximal est capable de stocker du glucose par activation d'enzyme de la néoglucogenèse (87; 89-91) . Lors de la chirurgie bariatrique, qui ôte la partie proximomédiale de l'intestin, les cellules intestinales de l'iléon se « reprogrammeraient » pour suppléer cette fonction métabolique perdue. Les entérocytes semblent donc est capable de stocker de l'énergie et avoir une plasticité cellulaire qui lui permettrait de pouvoir aussi se comporter comme un adipocyte. Cette gouttelette lipidique suggère donc qu'à l'image de l'adipocyte capable d'induire une inflammation métabolique locale, l'entérocyte pourrait induire un état inflammatoire. Les analyses par PCR quantitative ne montrent pas d'augmentation des marqueurs de l'inflammation tels que $TNF\alpha$, $IL\beta$ et PAI1. De la même manière les marqueurs lymphocytaires comme CD3 et interféron γ n'ont pas été augmentés. Cependant l'intestin est un organe qui recrute 80% du système immunitaire. Le niveau basal de l'expression de ces gènes est peut être déjà élevé. L'effet de la perfusion des lipides ne serait donc pas visible. Par immunohistochimie, le marquage F4/80 montre que le jéjunum des souris perfusées par les lipides recrute moins de macrophages que les souris témoins. Ainsi, les lipides présents dans l'intestin affaibliraient le système immunitaire. Par l'importance physique des gouttelettes lipidiques, nous pouvons supposer que cette diminution du nombre de macrophages présents dans les cryptes intestinales serait du à un encombrement spatial.

On remarquera que l'effet des lipides est plus marqué dans le jéjunum que le duodénum alors que ce dernier est connu pour être aussi un segment intestinal qui est capable d'absorber des lipides. Ceci peut s'expliquer par des prélèvements de duodénum trop proche de l'estomac et où donc le microenvironnement peut être différent de l'intestin proprement dit. D'autre part,

la perfusion continue de lipides a pu modifier le pH de l'estomac et de l'intestin ce qui a pu modifier la solubilité des acides gras des micelles et donc l'absorption de ces derniers.

Le deuxième paramètre étudié est le stress oxydant induit par les lipides sur les cellules intestinales. L'expression des ARNm de l'enzyme pro-oxydant, la NADPH oxydase est augmentée par les lipides alors que l'expression de deux enzymes anti-oxydantes, la GST et la catalase n'est pas modifiée. De plus, les lipides ont induit une peroxydation lipidique dans le duodénum et le jéjunum de l'intestin alors que l'activité de l'enzyme anti-oxydante, la glutathion réductase est diminuée. La balance oxydante est donc positive pour un stress oxydant. Cependant des souris nourries pendant un mois par un régime riche en lipide n'a pas induit de peroxydation lipidique dans l'intestin, ni dans le foie et le tissu adipeux. L'augmentation de la vitamine E dans ces organes a permis de prévenir de l'installation d'un stress oxydant (339). Cette différence de résultat pourrait s'expliquer par le fait que la prise de lipides sur un mois a été lente et adaptative ce qui a permis le développement du système anti-oxydant. Le développement de la peroxydation lipidique dans notre protocole serait un évènement antérieur au développement de l'intolérance au glucose puisqu'après 6 heures de perfusion de lipides, les souris ont une réponse au test de tolérance au glucose similaire à celle des souris témoins. La sécrétion d'insuline a été augmentée. Celle-ci peut être interprétée, selon la théorie de l'évolution de l'insulinorésistance, comme une compensation de la cellule B du pancréas. Après 6 heures de perfusion, les souris développeraient donc un comportement métabolique propice à l'insulinorésistance. Le stress oxydant et la peroxydation lipidique pourraient donc être à l'origine de cette dérégulation de la glycémie. En effet, lorsque la peroxydation lipidique a été prévenue par le traitement par un anti-oxydant, l'aminoguanidine, les souris ont amélioré leur glycémie en réponse à l'administration orale de glucose. De plus, leur sécrétion d'insuline a été diminuée et, elles présentent une meilleure sensibilité à l'insuline. La peroxydation lipidique est donc une cause de la perte de contrôle de la glycémie induite par les sensors entériques au glucose. Le stress oxydatif est développé dans les neurones notamment dans les maladies neurodégénératives (295-297). Cependant, les mécanismes moléculaires par lesquels les lipides peroxydés altèrent les mécanismes de détection du glucose restent inconnus. Les neurones du nerf vagues qui communiquent avec les cellules qui détectent le glucose sont probablement peroxydés ce qui perturberait le message transmis par le nerf vague au cerveau. L'enregistrement de l'activité du nerf vague de souris perfusées par la solution d'intralipid nous révèle que le message nerveux est modifié

par rapport à celui des souris témoins. Le traitement à l'aminoguanidine améliore le message nerveux induit par le glucose. La peroxydation lipidique perturbe donc la transmission du signal qui se propage de l'intestin vers le cerveau.

En conclusion, la détection entérique de glucose semble être un mécanisme informatif primordial et anticipateur pour la régulation de l'homéostasie glucidique. Son maintien conditionnera le message nerveux que transmet le cerveau aux organes périphériques. Moléculairement, les cellules sensibles au glucose ou les cellules avec lesquelles elles communiquent peuvent être peroxydées ce qui perturbe la transmission du message nerveux afférent au cerveau. Des points de contrôles pour le bon fonctionnement de la détection de glucose dans l'intestin doivent donc être établis et permettre une anticipation à tout dérèglement métabolique.

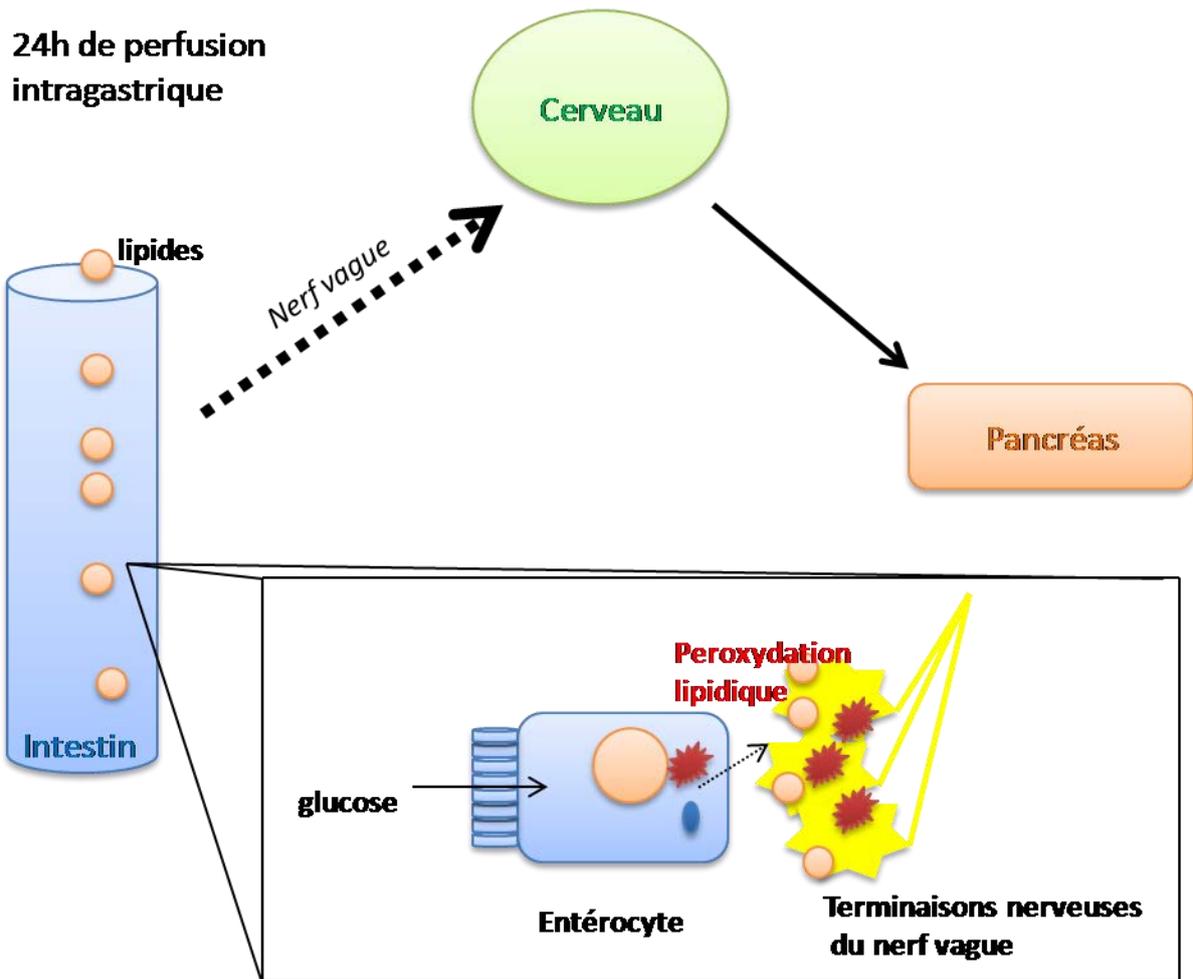


Figure 4 : Schématisation des résultats obtenus lors de perfusion de lipides. Les signaux de l'axe « intestin-cerveau » (trait haché gras) conditionnent les signaux de l'axe « cerveau-pancréas » (trait plein fin). Néanmoins, les lipides perturbent l'activité du nerf vague. Les lipides (rond orange) de l'intestin forment des gouttelettes dans les entérocytes. Ils pourraient induire la peroxydation lipidique (éclair rouge) dans ces derniers ainsi que les terminaisons nerveuses du nerf vague (étoile jaun

Bibliographie

1. Burcelin R, Cani PD, Knauf C: Glucagon-like peptide-1 and energy homeostasis. *J Nutr* 137:2534S-2538S, 2007
2. Migrenne S, Marsollier N, Cruciani-Guglielmacci C, Magnan C: Importance of the gut-brain axis in the control of glucose homeostasis. *Curr Opin Pharmacol* 6:592-597, 2006
3. O'Connor MD, Landahl HD, Grodsky GM: Role of rate of change of glucose concentration as a signal for insulin release. *Endocrinology* 101:85-88, 1977
4. Schuit FC, Huypens P, Heimberg H, Pipeleers DG: Glucose sensing in pancreatic beta-cells: a model for the study of other glucose-regulated cells in gut, pancreas, and hypothalamus. *Diabetes* 50:1-11, 2001
5. Raybould HE, Glatzle J, Freeman SL, Whited K, Darcel N, Liou A, Bohan D: Detection of macronutrients in the intestinal wall. *Auton Neurosci* 125:28-33, 2006
6. Burcelin R, Dolci W, Thorens B: Glucose sensing by the hepatoportal sensor is GLUT2-dependent: in vivo analysis in GLUT2-null mice. *Diabetes* 49:1643-1648, 2000
7. Thorens B: Molecular and cellular physiology of GLUT-2, a high-Km facilitated diffusion glucose transporter. *Int Rev Cytol* 137:209-238, 1992
8. Ashcroft SJ, Randle PJ: Enzymes of glucose metabolism in normal mouse pancreatic islets. *Biochem J* 119:5-15, 1970
9. Ashcroft FM: K(ATP) channels and insulin secretion: a key role in health and disease. *Biochem Soc Trans* 34:243-246, 2006
10. Fryirs M, Barter PJ, Rye KA: Cholesterol metabolism and pancreatic beta-cell function. *Curr Opin Lipidol* 20:159-164, 2009
11. Tatnell MA, Jones RH, Willey KP, Schuttler A, Brandenburg D: Evidence concerning the mechanism of insulin-receptor interaction and the structure of the insulin receptor from biological properties of covalently linked insulin dimers. *Biochem J* 216:687-694, 1983
12. Whittaker L, Hao C, Fu W, Whittaker J: High-affinity insulin binding: insulin interacts with two receptor ligand binding sites. *Biochemistry* 47:12900-12909, 2008
13. Saltiel AR, Kahn CR: Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature* 414:799-806, 2001
14. Capeau J: [Insulin signaling: mechanisms altered in insulin resistance]. *Med Sci (Paris)* 19:834-839, 2003
15. Kasuga M: Insulin resistance and pancreatic beta cell failure. *J Clin Invest* 116:1756-1760, 2006
16. Khan AH, Pessin JE: Insulin regulation of glucose uptake: a complex interplay of intracellular signalling pathways. *Diabetologia* 45:1475-1483, 2002
17. Thirone AC, Huang C, Klip A: Tissue-specific roles of IRS proteins in insulin signaling and glucose transport. *Trends Endocrinol Metab* 17:72-78, 2006
18. Postic C, Shiota M, Magnuson MA: Cell-specific roles of glucokinase in glucose homeostasis. *Recent Prog Horm Res* 56:195-217, 2001
19. Noguchi T: [Regulation of pyruvate kinase gene expression and its clinical application]. *Rinsho Byori* 38:868-875, 1990
20. O'Brien RM, Streeper RS, Ayala JE, Stadelmaier BT, Hornbuckle LA: Insulin-regulated gene expression. *Biochem Soc Trans* 29:552-558, 2001
21. Large V, Peroni O, Letexier D, Ray H, Beylot M: Metabolism of lipids in human white adipocyte. *Diabetes Metab* 30:294-309, 2004
22. Smith U, Axelsen M, Carvalho E, Eliasson B, Jansson PA, Wesslau C: Insulin signaling and action in fat cells: associations with insulin resistance and type 2 diabetes. *Ann N Y Acad Sci* 892:119-126, 1999
23. Weickert MO, Pfeiffer AF: Signalling mechanisms linking hepatic glucose and lipid metabolism. *Diabetologia* 49:1732-1741, 2006

24. Burcelin R, Knauf C, Cani PD: Pancreatic alpha-cell dysfunction in diabetes. *Diabetes Metab* 34 Suppl 2:S49-55, 2008
25. Gromada J, Franklin I, Wollheim CB: Alpha-cells of the endocrine pancreas: 35 years of research but the enigma remains. *Endocr Rev* 28:84-116, 2007
26. Quesada I, Tuduri E, Ripoll C, Nadal A: Physiology of the pancreatic alpha-cell and glucagon secretion: role in glucose homeostasis and diabetes. *J Endocrinol* 199:5-19, 2008
27. Reimann F, Habib AM, Tolhurst G, Parker HE, Rogers GJ, Gribble FM: Glucose sensing in L cells: a primary cell study. *Cell Metab* 8:532-539, 2008
28. Rorsman P, Salehi SA, Abdulkader F, Braun M, MacDonald PE: K(ATP)-channels and glucose-regulated glucagon secretion. *Trends Endocrinol Metab* 19:277-284, 2008
29. Marliss EB, Girardier L, Seydoux J, Wollheim CB, Kanazawa Y, Orci L, Renold AE, Porte D, Jr.: Glucagon release induced by pancreatic nerve stimulation in the dog. *J Clin Invest* 52:1246-1259, 1973
30. Bollheimer LC, Landauer HC, Troll S, Schweimer J, Wrede CE, Scholmerich J, Buettner R: Stimulatory short-term effects of free fatty acids on glucagon secretion at low to normal glucose concentrations. *Metabolism* 53:1443-1448, 2004
31. Hong J, Jeppesen PB, Nordentoft I, Hermansen K: Fatty acid-induced effect on glucagon secretion is mediated via fatty acid oxidation. *Diabetes Metab Res Rev* 23:202-210, 2007
32. Olofsson CS, Salehi A, Gopel SO, Holm C, Rorsman P: Palmitate stimulation of glucagon secretion in mouse pancreatic alpha-cells results from activation of L-type calcium channels and elevation of cytoplasmic calcium. *Diabetes* 53:2836-2843, 2004
33. Gromada J, Duttaroy A, Rorsman P: The insulin receptor talks to glucagon? *Cell Metab* 9:303-305, 2009
34. Kawamori D, Kurpad AJ, Hu J, Liew CW, Shih JL, Ford EL, Herrera PL, Polonsky KS, McGuinness OP, Kulkarni RN: Insulin signaling in alpha cells modulates glucagon secretion in vivo. *Cell Metab* 9:350-361, 2009
35. Authier F, Desbuquois B: Glucagon receptors. *Cell Mol Life Sci* 65:1880-1899, 2008
36. Tso P, Nauli A, Lo CM: Enterocyte fatty acid uptake and intestinal fatty acid-binding protein. *Biochem Soc Trans* 32:75-78, 2004
37. Kamp F, Zakim D, Zhang F, Noy N, Hamilton JA: Fatty acid flip-flop in phospholipid bilayers is extremely fast. *Biochemistry* 34:11928-11937, 1995
38. Thwaites DT, Anderson CM: H⁺-coupled nutrient, micronutrient and drug transporters in the mammalian small intestine. *Exp Physiol* 92:603-619, 2007
39. Suzuki R, Nourani MR, Saino-Saito S, Abe H, Nochi T, Kiyono H, Spener F, Kondo H, Owada Y: Localization of fatty acid binding protein of epidermal type common to dendritic cells and presumptive macrophages in Peyer's patches and epithelial M cells of mouse intestine. *Histochem Cell Biol*, 2009
40. Bonen A, Campbell SE, Benton CR, Chabowski A, Coort SL, Han XX, Koonen DP, Glatz JF, Luiken JJ: Regulation of fatty acid transport by fatty acid translocase/CD36. *Proc Nutr Soc* 63:245-249, 2004
41. Xie Y, Newberry EP, Young SG, Robine S, Hamilton RL, Wong JS, Luo J, Kennedy S, Davidson NO: Compensatory increase in hepatic lipogenesis in mice with conditional intestine-specific Mttp deficiency. *J Biol Chem* 281:4075-4086, 2006
42. Niot I, Poirier H, Tran TT, Besnard P: Intestinal absorption of long-chain fatty acids: evidence and uncertainties. *Prog Lipid Res* 48:101-115, 2009
43. Krusinova E, Pelikanova T: Fatty acid binding proteins in adipose tissue: a promising link between metabolic syndrome and atherosclerosis? *Diabetes Res Clin Pract* 82 Suppl 2:S127-134, 2008

44. Williams KJ: Molecular processes that handle -- and mishandle -- dietary lipids. *J Clin Invest* 118:3247-3259, 2008
45. Schenk S, Saberi M, Olefsky JM: Insulin sensitivity: modulation by nutrients and inflammation. *J Clin Invest* 118:2992-3002, 2008
46. Thompson BR, Lobo S, Bernlohr DA: Fatty acid flux in adipocytes: the in's and out's of fat cell lipid trafficking. *Mol Cell Endocrinol* 318:24-33
47. Ducharme NA, Bickel PE: Lipid droplets in lipogenesis and lipolysis. *Endocrinology* 149:942-949, 2008
48. Innis SM: Dietary (n-3) fatty acids and brain development. *J Nutr* 137:855-859, 2007
49. Bazan NG: Synaptic lipid signaling: significance of polyunsaturated fatty acids and platelet-activating factor. *J Lipid Res* 44:2221-2233, 2003
50. Sayre LM, Perry G, Smith MA: Oxidative stress and neurotoxicity. *Chem Res Toxicol* 21:172-188, 2008
51. Migrenne S, Magnan C, Cruciani-Guglielmacci C: Fatty acid sensing and nervous control of energy homeostasis. *Diabetes Metab* 33:177-182, 2007
52. Oomura Y, Nakamura T, Sugimori M, Yamada Y: Effect of free fatty acid on the rat lateral hypothalamic neurons. *Physiol Behav* 14:483-486, 1975
53. Wang R, Cruciani-Guglielmacci C, Migrenne S, Magnan C, Cotero VE, Routh VH: Effects of oleic acid on distinct populations of neurons in the hypothalamic arcuate nucleus are dependent on extracellular glucose levels. *J Neurophysiol* 95:1491-1498, 2006
54. Mulder H, Yang S, Winzell MS, Holm C, Ahren B: Inhibition of lipase activity and lipolysis in rat islets reduces insulin secretion. *Diabetes* 53:122-128, 2004
55. Stein DT, Esser V, Stevenson BE, Lane KE, Whiteside JH, Daniels MB, Chen S, McGarry JD: Essentiality of circulating fatty acids for glucose-stimulated insulin secretion in the fasted rat. *J Clin Invest* 97:2728-2735, 1996
56. Nolan CJ, Madiraju MS, Delghingaro-Augusto V, Peyot ML, Prentki M: Fatty acid signaling in the beta-cell and insulin secretion. *Diabetes* 55 Suppl 2:S16-23, 2006
57. Schnell S, Schaefer M, Schofl C: Free fatty acids increase cytosolic free calcium and stimulate insulin secretion from beta-cells through activation of GPR40. *Mol Cell Endocrinol* 263:173-180, 2007
58. Stein DT, Stevenson BE, Chester MW, Basit M, Daniels MB, Turley SD, McGarry JD: The insulinotropic potency of fatty acids is influenced profoundly by their chain length and degree of saturation. *J Clin Invest* 100:398-403, 1997
59. Obici S, Feng Z, Morgan K, Stein D, Karkanas G, Rossetti L: Central administration of oleic acid inhibits glucose production and food intake. *Diabetes* 51:271-275, 2002
60. Magnan C, Collins S, Berthault MF, Kassis N, Vincent M, Gilbert M, Penicaud L, Ktorza A, Assimacopoulos-Jeannet F: Lipid infusion lowers sympathetic nervous activity and leads to increased beta-cell responsiveness to glucose. *J Clin Invest* 103:413-419, 1999
61. Clement L, Cruciani-Guglielmacci C, Magnan C, Vincent M, Douared L, Orosco M, Assimacopoulos-Jeannet F, Penicaud L, Ktorza A: Intracerebroventricular infusion of a triglyceride emulsion leads to both altered insulin secretion and hepatic glucose production in rats. *Pflugers Arch* 445:375-380, 2002
62. Lam TK, Schwartz GJ, Rossetti L: Hypothalamic sensing of fatty acids. *Nat Neurosci* 8:579-584, 2005
63. Lam TK, Poci A, Gutierrez-Juarez R, Obici S, Bryan J, Aguilar-Bryan L, Schwartz GJ, Rossetti L: Hypothalamic sensing of circulating fatty acids is required for glucose homeostasis. *Nat Med* 11:320-327, 2005

64. Cruciani-Guglielmacci C, Hervalet A, Douared L, Sanders NM, Levin BE, Ktorza A, Magnan C: Beta oxidation in the brain is required for the effects of non-esterified fatty acids on glucose-induced insulin secretion in rats. *Diabetologia* 47:2032-2038, 2004
65. Wang PY, Caspi L, Lam CK, Chari M, Li X, Light PE, Gutierrez-Juarez R, Ang M, Schwartz GJ, Lam TK: Upper intestinal lipids trigger a gut-brain-liver axis to regulate glucose production. *Nature* 452:1012-1016, 2008
66. Lal S, Kirkup AJ, Brunsten AM, Thompson DG, Grundy D: Vagal afferent responses to fatty acids of different chain length in the rat. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 281:G907-915, 2001
67. Wang X, Miyares RL, Ahern GP: Oleoylethanolamide excites vagal sensory neurones, induces visceral pain and reduces short-term food intake in mice via capsaicin receptor TRPV1. *J Physiol* 564:541-547, 2005
68. Longuet C, Sinclair EM, Maida A, Baggio LL, Maziarz M, Charron MJ, Drucker DJ: The glucagon receptor is required for the adaptive metabolic response to fasting. *Cell Metab* 8:359-371, 2008
69. Okamoto R, Watanabe M: Molecular and clinical basis for the regeneration of human gastrointestinal epithelia. *J Gastroenterol* 39:1-6, 2004
70. Sancho E, Batlle E, Clevers H: Live and let die in the intestinal epithelium. *Curr Opin Cell Biol* 15:763-770, 2003
71. Snoeck V, Goddeeris B, Cox E: The role of enterocytes in the intestinal barrier function and antigen uptake. *Microbes Infect* 7:997-1004, 2005
72. Roth KA, Hertz JM, Gordon JI: Mapping enteroendocrine cell populations in transgenic mice reveals an unexpected degree of complexity in cellular differentiation within the gastrointestinal tract. *J Cell Biol* 110:1791-1801, 1990
73. Ou G, Baranov V, Lundmark E, Hammarstrom S, Hammarstrom ML: Contribution of intestinal epithelial cells to innate immunity of the human gut--studies on polarized monolayers of colon carcinoma cells. *Scand J Immunol* 69:150-161, 2009
74. Bry L, Falk P, Huttner K, Ouellette A, Midtvedt T, Gordon JI: Paneth cell differentiation in the developing intestine of normal and transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:10335-10339, 1994
75. Junt T, Scandella E, Ludewig B: Form follows function: lymphoid tissue microarchitecture in antimicrobial immune defence. *Nat Rev Immunol* 8:764-775, 2008
76. Singh V, Singh K, Amdekar S, Singh DD, Tripathi P, Sharma GL, Yadav H: Innate and specific gut-associated immunity and microbial interference. *FEMS Immunol Med Microbiol* 55:6-12, 2009
77. Phillips RJ, Powley TL: Innervation of the gastrointestinal tract: patterns of aging. *Auton Neurosci* 136:1-19, 2007
78. Liu M, Seino S, Kirchgessner AL: Identification and characterization of glucoresponsive neurons in the enteric nervous system. *J Neurosci* 19:10305-10317, 1999
79. Bassotti G, Villanacci V, Fisogni S, Rossi E, Baronio P, Clerici C, Maurer CA, Cathomas G, Antonelli E: Enteric glial cells and their role in gastrointestinal motor abnormalities: introducing the neuro-gliopathies. *World J Gastroenterol* 13:4035-4041, 2007
80. Chandrasekharan B, Srinivasan S: Diabetes and the enteric nervous system. *Neurogastroenterol Motil* 19:951-960, 2007
81. Cabarrocas J, Savidge TC, Liblau RS: Role of enteric glial cells in inflammatory bowel disease. *Glia* 41:81-93, 2003
82. Bassotti G, Villanacci V, Antonelli E, Morelli A, Salerni B: Enteric glial cells: new players in gastrointestinal motility? *Lab Invest* 87:628-632, 2007

83. Phillips RJ, Walter GC, Powley TL: Age-related changes in vagal afferents innervating the gastrointestinal tract. *Auton Neurosci*, 2009
84. Schwartz GJ: The role of gastrointestinal vagal afferents in the control of food intake: current prospects. *Nutrition* 16:866-873, 2000
85. Knauf C, Cani PD, Kim DH, Iglesias MA, Chabo C, Waget A, Colom A, Rastrelli S, Delzenne NM, Drucker DJ, Seeley RJ, Burcelin R: Role of central nervous system glucagon-like Peptide-1 receptors in enteric glucose sensing. *Diabetes* 57:2603-2612, 2008
86. Pories WJ: Diabetes: the evolution of a new paradigm. *Ann Surg* 239:12-13, 2004
87. Troy S, Soty M, Ribeiro L, Laval L, Migrenne S, Fioramonti X, Pillot B, Fauveau V, Aubert R, Viollet B, Foretz M, Leclerc J, Duchampt A, Zitoun C, Thorens B, Magnan C, Mithieux G, Andreelli F: Intestinal gluconeogenesis is a key factor for early metabolic changes after gastric bypass but not after gastric lap-band in mice. *Cell Metab* 8:201-211, 2008
88. Berthoud HR: The vagus nerve, food intake and obesity. *Regul Pept* 149:15-25, 2008
89. Mithieux G, Bady I, Gautier A, Croset M, Rajas F, Zitoun C: Induction of control genes in intestinal gluconeogenesis is sequential during fasting and maximal in diabetes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 286:E370-375, 2004
90. Rajas F, Bruni N, Montano S, Zitoun C, Mithieux G: The glucose-6 phosphatase gene is expressed in human and rat small intestine: regulation of expression in fasted and diabetic rats. *Gastroenterology* 117:132-139, 1999
91. Croset M, Rajas F, Zitoun C, Hurot JM, Montano S, Mithieux G: Rat small intestine is an insulin-sensitive gluconeogenic organ. *Diabetes* 50:740-746, 2001
92. Slama G, Klein N: Le Diabete maigre et le diabete gras. [Lean diabetes and obese diabetes. *Diabet Med* 7:651, 1990
93. Mayer J: Regulation of energy intake and the body weight: the glucostatic theory and the lipostatic hypothesis. *Ann N Y Acad Sci* 63:15-43, 1955
94. Oomura Y, Ono T, Ooyama H, Wayner MJ: Glucose and osmosensitive neurones of the rat hypothalamus. *Nature* 222:282-284, 1969
95. Ono T, Nishino H, Fukuda M, Sasaki K, Muramoto K, Oomura Y: Glucoresponsive neurons in rat ventromedial hypothalamic tissue slices in vitro. *Brain Res* 232:494-499, 1982
96. Shimizu N, Oomura Y, Novin D, Grijalva CV, Cooper PH: Functional correlations between lateral hypothalamic glucose-sensitive neurons and hepatic portal glucose-sensitive units in rat. *Brain Res* 265:49-54, 1983
97. Adachi A, Shimizu N, Oomura Y, Kobashi M: Convergence of hepatportal glucose-sensitive afferent signals to glucose-sensitive units within the nucleus of the solitary tract. *Neurosci Lett* 46:215-218, 1984
98. Hevener AL, Bergman RN, Donovan CM: Novel glucosensor for hypoglycemic detection localized to the portal vein. *Diabetes* 46:1521-1525, 1997
99. Nijima A: The effect of D-glucose on the firing rate of glucose-sensitive vagal afferents in the liver in comparison with the effect of 2-deoxy-D-glucose. *J Auton Nerv Syst* 10:255-260, 1984
100. Thorens B: GLUT2 in pancreatic and extra-pancreatic gluco-detection (review). *Mol Membr Biol* 18:265-273, 2001
101. Burcelin R, Da Costa A, Drucker D, Thorens B: Glucose competence of the hepatportal vein sensor requires the presence of an activated glucagon-like peptide-1 receptor. *Diabetes* 50:1720-1728, 2001
102. Gardemann A, Strulik H, Jungermann K: A portal-arterial glucose concentration gradient as a signal for an insulin-dependent net glucose uptake in perfused rat liver. *FEBS Lett* 202:255-259, 1986

103. Hsieh PS, Moore MC, Neal DW, Cherrington AD: Hepatic glucose uptake rapidly decreases after removal of the portal signal in conscious dogs. *Am J Physiol* 275:E987-992, 1998
104. Burcelin R, Dolci W, Thorens B: Portal glucose infusion in the mouse induces hypoglycemia: evidence that the hepatportal glucose sensor stimulates glucose utilization. *Diabetes* 49:1635-1642, 2000
105. Holst JJ: The physiology of glucagon-like peptide 1. *Physiol Rev* 87:1409-1439, 2007
106. Engelstoft MS, Egerod KL, Holst B, Schwartz TW: A gut feeling for obesity: 7TM sensors on enteroendocrine cells. *Cell Metab* 8:447-449, 2008
107. Dyer J, Vayro S, Shirazi-Beechey SP: Mechanism of glucose sensing in the small intestine. *Biochem Soc Trans* 31:1140-1142, 2003
108. Stumpel F, Burcelin R, Jungermann K, Thorens B: Normal kinetics of intestinal glucose absorption in the absence of GLUT2: evidence for a transport pathway requiring glucose phosphorylation and transfer into the endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:11330-11335, 2001
109. Kokrashvili Z, Mosinger B, Margolskee RF: Taste signaling elements expressed in gut enteroendocrine cells regulate nutrient-responsive secretion of gut hormones. *Am J Clin Nutr* 90:822S-825S, 2009
110. Sternini C: Taste receptors in the gastrointestinal tract. IV. Functional implications of bitter taste receptors in gastrointestinal chemosensing. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 292:G457-461, 2007
111. Sternini C, Anselmi L, Rozengurt E: Enteroendocrine cells: a site of 'taste' in gastrointestinal chemosensing. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 15:73-78, 2008
112. Jang HJ, Kokrashvili Z, Theodorakis MJ, Carlson OD, Kim BJ, 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. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:15069-15074, 2007
113. Kokrashvili Z, Mosinger B, Margolskee RF: T1r3 and alpha-gustducin in gut regulate secretion of glucagon-like peptide-1. *Ann N Y Acad Sci* 1170:91-94, 2009
114. Cummings DE, Overduin J: Gastrointestinal regulation of food intake. *J Clin Invest* 117:13-23, 2007
115. Covington DK, Briscoe CA, Brown AJ, Jayawickreme CK: The G-protein-coupled receptor 40 family (GPR40-GPR43) and its role in nutrient sensing. *Biochem Soc Trans* 34:770-773, 2006
116. Swaminath G: Fatty acid binding receptors and their physiological role in type 2 diabetes. *Arch Pharm (Weinheim)* 341:753-761, 2008
117. Briscoe CP, Tadayyon M, Andrews JL, Benson WG, Chambers JK, Eilert MM, Ellis C, Elshourbagy NA, Goetz AS, Minnick DT, Murdock PR, Sauls HR, Jr., Shabon U, Spinage LD, Strum JC, Szekeres PG, Tan KB, Way JM, Ignar DM, Wilson S, Muir AI: The orphan G protein-coupled receptor GPR40 is activated by medium and long chain fatty acids. *J Biol Chem* 278:11303-11311, 2003
118. Edfalk S, Steneberg P, Edlund H: Gpr40 is expressed in enteroendocrine cells and mediates free fatty acid stimulation of incretin secretion. *Diabetes* 57:2280-2287, 2008
119. Lauffer LM, Iakoubov R, Brubaker PL: GPR119 is essential for oleoylethanolamide-induced glucagon-like peptide-1 secretion from the intestinal enteroendocrine L-cell. *Diabetes* 58:1058-1066, 2009
120. Youngs G: Hormonal control of pancreatic endocrine and exocrine secretion. *Gut* 13:154-161, 1972

121. Bayliss WM, Starling EH: The mechanism of pancreatic secretion. *J Physiol* 28:325-353, 1902
122. Badman MK, Flier JS: The gut and energy balance: visceral allies in the obesity wars. *Science* 307:1909-1914, 2005
123. Capasso R, Izzo AA: Gastrointestinal regulation of food intake: general aspects and focus on anandamide and oleoylethanolamide. *J Neuroendocrinol* 20 Suppl 1:39-46, 2008
124. Cummings DE: Ghrelin and the short- and long-term regulation of appetite and body weight. *Physiol Behav* 89:71-84, 2006
125. Naslund E, Hellstrom PM: Appetite signaling: from gut peptides and enteric nerves to brain. *Physiol Behav* 92:256-262, 2007
126. Baggio LL, Drucker DJ: Biology of incretins: GLP-1 and GIP. *Gastroenterology* 132:2131-2157, 2007
127. Kim W, Egan JM: The role of incretins in glucose homeostasis and diabetes treatment. *Pharmacol Rev* 60:470-512, 2008
128. Nauck MA: Unraveling the science of incretin biology. *Eur J Intern Med* 20 Suppl 2:S303-308, 2009
129. Ding WG, Gromada J: Protein kinase A-dependent stimulation of exocytosis in mouse pancreatic beta-cells by glucose-dependent insulinotropic polypeptide. *Diabetes* 46:615-621, 1997
130. Kim SJ, Winter K, Nian C, Tsuneoka M, Koda Y, McIntosh CH: Glucose-dependent insulinotropic polypeptide (GIP) stimulation of pancreatic beta-cell survival is dependent upon phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/protein kinase B (PKB) signaling, inactivation of the forkhead transcription factor Foxo1, and down-regulation of bax expression. *J Biol Chem* 280:22297-22307, 2005
131. Kieffer TJ, McIntosh CH, Pederson RA: Degradation of glucose-dependent insulinotropic polypeptide and truncated glucagon-like peptide 1 in vitro and in vivo by dipeptidyl peptidase IV. *Endocrinology* 136:3585-3596, 1995
132. Drucker DJ: Biologic actions and therapeutic potential of the proglucagon-derived peptides. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* 1:22-31, 2005
133. Hsieh J, Longuet C, Maida A, Bahrami J, Xu E, Baker CL, Brubaker PL, Drucker DJ, Adeli K: Glucagon-like peptide-2 increases intestinal lipid absorption and chylomicron production via CD36. *Gastroenterology* 137:997-1005, 1005 e1001-1004, 2009
134. Cani PD, Possemiers S, Van de Wiele T, Guiot Y, Everard A, Rottier O, Geurts L, Naslain D, Neyrinck A, Lambert DM, Muccioli GG, Delzenne NM: Changes in gut microbiota control inflammation in obese mice through a mechanism involving GLP-2-driven improvement of gut permeability. *Gut* 58:1091-1103, 2009
135. Bojanowska E: Physiology and pathophysiology of glucagon-like peptide-1 (GLP-1): the role of GLP-1 in the pathogenesis of diabetes mellitus, obesity, and stress. *Med Sci Monit* 11:RA271-278, 2005
136. Franek E, Gajos G, Gumprecht J, Kretowski A, Zahorska-Markiewicz B, Malecki MT: The role of glucagon-like peptide 1 in glucose homeostasis and in other aspects of human physiology. *Pol Arch Med Wewn* 119:743-751, 2009
137. Creutzfeldt W: The [pre-] history of the incretin concept. *Regul Pept* 128:87-91, 2005
138. Chisholm DJ, Young JD, Lazarus L: The gastrointestinal stimulus to insulin release. I. Secretin. *J Clin Invest* 48:1453-1460, 1969
139. Kraegen EW, Chisholm DJ, Young JD, Lazarus L: The gastrointestinal stimulus to insulin release. II. A dual action of secretin. *J Clin Invest* 49:524-529, 1970
140. Perley MJ, Kipnis DM: Plasma insulin responses to oral and intravenous glucose: studies in normal and diabetic subjects. *J Clin Invest* 46:1954-1962, 1967

141. Nauck MA, Homberger E, Siegel EG, Allen RC, Eaton RP, Ebert R, Creutzfeldt W: Incretin effects of increasing glucose loads in man calculated from venous insulin and C-peptide responses. *J Clin Endocrinol Metab* 63:492-498, 1986
142. Nauck M, Stockmann F, Ebert R, Creutzfeldt W: Reduced incretin effect in type 2 (non-insulin-dependent) diabetes. *Diabetologia* 29:46-52, 1986
143. Sutherland EW, De Duve C: Origin and distribution of the hyperglycemic-glycogenolytic factor of the pancreas. *J Biol Chem* 175:663-674, 1948
144. Webb GC, Dey A, Wang J, Stein J, Milewski M, Steiner DF: Altered proglucagon processing in an alpha-cell line derived from prohormone convertase 2 null mouse islets. *J Biol Chem* 279:31068-31075, 2004
145. Rouille Y, Martin S, Steiner DF: Differential processing of proglucagon by the subtilisin-like prohormone convertases PC2 and PC3 to generate either glucagon or glucagon-like peptide. *J Biol Chem* 270:26488-26496, 1995
146. Gallwitz B, Witt M, Paetzold G, Morys-Wortmann C, Zimmermann B, Eckart K, Folsch UR, Schmidt WE: Structure/activity characterization of glucagon-like peptide-1. *Eur J Biochem* 225:1151-1156, 1994
147. Mojsov S, Kopczynski MG, Habener JF: Both amidated and nonamidated forms of glucagon-like peptide I are synthesized in the rat intestine and the pancreas. *J Biol Chem* 265:8001-8008, 1990
148. Gallwitz B, Schmidt WE, Conlon JM, Creutzfeldt W: Glucagon-like peptide-1(7-36)amide: characterization of the domain responsible for binding to its receptor on rat insulinoma RINm5F cells. *J Mol Endocrinol* 5:33-39, 1990
149. Merchenthaler I, Lane M, Shughrue P: Distribution of pre-pro-glucagon and glucagon-like peptide-1 receptor messenger RNAs in the rat central nervous system. *J Comp Neurol* 403:261-280, 1999
150. Navarro M, Rodriguez de Fonseca F, Alvarez E, Chowen JA, Zueco JA, Gomez R, Eng J, Blazquez E: Colocalization of glucagon-like peptide-1 (GLP-1) receptors, glucose transporter GLUT-2, and glucokinase mRNAs in rat hypothalamic cells: evidence for a role of GLP-1 receptor agonists as an inhibitory signal for food and water intake. *J Neurochem* 67:1982-1991, 1996
151. Shughrue PJ, Lane MV, Merchenthaler I: Glucagon-like peptide-1 receptor (GLP1-R) mRNA in the rat hypothalamus. *Endocrinology* 137:5159-5162, 1996
152. Alvarez E, Roncero I, Chowen JA, Thorens B, Blazquez E: Expression of the glucagon-like peptide-1 receptor gene in rat brain. *J Neurochem* 66:920-927, 1996
153. Reimann F, Gribble FM: Glucose-sensing in glucagon-like peptide-1-secreting cells. *Diabetes* 51:2757-2763, 2002
154. Brubaker PL: The glucagon-like peptides: pleiotropic regulators of nutrient homeostasis. *Ann N Y Acad Sci* 1070:10-26, 2006
155. Vilsboll T, Krarup T, Sonne J, Madsbad S, Volund A, Juul AG, Holst JJ: Incretin secretion in relation to meal size and body weight in healthy subjects and people with type 1 and type 2 diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* 88:2706-2713, 2003
156. Brubaker PL, Anini Y: Direct and indirect mechanisms regulating secretion of glucagon-like peptide-1 and glucagon-like peptide-2. *Can J Physiol Pharmacol* 81:1005-1012, 2003
157. Zhang X, Renehan WE, Fogel R: Vagal innervation of the rat duodenum. *J Auton Nerv Syst* 79:8-18, 2000
158. Anini Y, Brubaker PL: Muscarinic receptors control glucagon-like peptide 1 secretion by human endocrine L cells. *Endocrinology* 144:3244-3250, 2003
159. Hansen L, Lampert S, Mineo H, Holst JJ: Neural regulation of glucagon-like peptide-1 secretion in pigs. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 287:E939-947, 2004

160. Rocca AS, Brubaker PL: Role of the vagus nerve in mediating proximal nutrient-induced glucagon-like peptide-1 secretion. *Endocrinology* 140:1687-1694, 1999
161. Nishizawa M, Nakabayashi H, Uchida K, Nakagawa A, Niiijima A: The hepatic vagal nerve is receptive to incretin hormone glucagon-like peptide-1, but not to glucose-dependent insulinotropic polypeptide, in the portal vein. *J Auton Nerv Syst* 61:149-154, 1996
162. Abello J, Ye F, Bosshard A, Bernard C, Cuber JC, Chayvialle JA: Stimulation of glucagon-like peptide-1 secretion by muscarinic agonist in a murine intestinal endocrine cell line. *Endocrinology* 134:2011-2017, 1994
163. Drucker DJ, Jin T, Asa SL, Young TA, Brubaker PL: Activation of proglucagon gene transcription by protein kinase-A in a novel mouse enteroendocrine cell line. *Mol Endocrinol* 8:1646-1655, 1994
164. Reimer RA, Darimont C, Gremlich S, Nicolas-Metral V, Ruegg UT, Mace K: A human cellular model for studying the regulation of glucagon-like peptide-1 secretion. *Endocrinology* 142:4522-4528, 2001
165. Tolhurst G, Reimann F, Gribble FM: Nutritional regulation of glucagon-like peptide-1 secretion. *J Physiol* 587:27-32, 2009
166. Gribble FM, Williams L, Simpson AK, Reimann F: A novel glucose-sensing mechanism contributing to glucagon-like peptide-1 secretion from the GLUTag cell line. *Diabetes* 52:1147-1154, 2003
167. Margolskee RF, Dyer J, Kokrashvili Z, Salmon KS, Ilegems E, Daly K, Maillet EL, Ninomiya Y, Mosinger B, Shirazi-Beechey SP: T1R3 and gustducin in gut sense sugars to regulate expression of Na⁺-glucose cotransporter 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:15075-15080, 2007
168. Reimann F: Molecular mechanisms underlying nutrient detection by incretin-secreting cells. *Int Dairy J* 20:236-242
169. Parker HE, Reimann F, Gribble FM: Molecular mechanisms underlying nutrient-stimulated incretin secretion. *Expert Rev Mol Med* 12:e1
170. Cani PD, Holst JJ, Drucker DJ, Delzenne NM, Thorens B, Burcelin R, Knauf C: GLUT2 and the incretin receptors are involved in glucose-induced incretin secretion. *Mol Cell Endocrinol* 276:18-23, 2007
171. Deacon CF, Johnsen AH, Holst JJ: 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. *J Clin Endocrinol Metab* 80:952-957, 1995
172. Balks HJ, Holst JJ, von zur Muhlen A, Brabant G: Rapid oscillations in plasma glucagon-like peptide-1 (GLP-1) in humans: cholinergic control of GLP-1 secretion via muscarinic receptors. *J Clin Endocrinol Metab* 82:786-790, 1997
173. Deacon CF, Pridal L, Klarskov L, Olesen M, Holst JJ: Glucagon-like peptide 1 undergoes differential tissue-specific metabolism in the anesthetized pig. *Am J Physiol* 271:E458-464, 1996
174. Hansen L, Deacon CF, Orskov C, Holst JJ: Glucagon-like peptide-1-(7-36)amide is transformed to glucagon-like peptide-1-(9-36)amide by dipeptidyl peptidase IV in the capillaries supplying the L cells of the porcine intestine. *Endocrinology* 140:5356-5363, 1999
175. Deacon CF: What do we know about the secretion and degradation of incretin hormones? *Regul Pept* 128:117-124, 2005
176. Rolin B, Deacon CF, Carr RD, Ahren B: The major glucagon-like peptide-1 metabolite, GLP-1-(9-36)-amide, does not affect glucose or insulin levels in mice. *Eur J Pharmacol* 494:283-288, 2004

177. Zander M, Madsbad S, Deacon CF, Holst JJ: The metabolite generated by dipeptidyl-peptidase 4 metabolism of glucagon-like peptide-1 has no influence on plasma glucose levels in patients with type 2 diabetes. *Diabetologia* 49:369-374, 2006
178. Wettergren A, Wojdemann M, Holst JJ: The inhibitory effect of glucagon-like peptide-1 (7-36)amide on antral motility is antagonized by its N-terminally truncated primary metabolite GLP-1 (9-36)amide. *Peptides* 19:877-882, 1998
179. Deacon CF, Plamboeck A, Moller S, Holst JJ: GLP-1-(9-36) amide reduces blood glucose in anesthetized pigs by a mechanism that does not involve insulin secretion. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 282:E873-879, 2002
180. Ossum A, van Deurs U, Engstrom T, Jensen JS, Treiman M: The cardioprotective and inotropic components of the postconditioning effects of GLP-1 and GLP-1(9-36)a in an isolated rat heart. *Pharmacol Res* 60:411-417, 2009
181. Sonne DP, Engstrom T, Treiman M: Protective effects of GLP-1 analogues exendin-4 and GLP-1(9-36) amide against ischemia-reperfusion injury in rat heart. *Regul Pept* 146:243-249, 2008
182. Frimurer TM, Bywater RP: Structure of the integral membrane domain of the GLP1 receptor. *Proteins* 35:375-386, 1999
183. Mayo KE, Miller LJ, Bataille D, Dalle S, Goke B, Thorens B, Drucker DJ: International Union of Pharmacology. XXXV. The glucagon receptor family. *Pharmacol Rev* 55:167-194, 2003
184. Thorens B: Expression cloning of the pancreatic beta cell receptor for the gluco-incretin hormone glucagon-like peptide 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:8641-8645, 1992
185. Thorens B, Porret A, Buhler L, Deng SP, Morel P, Widmann C: Cloning and functional expression of the human islet GLP-1 receptor. Demonstration that exendin-4 is an agonist and exendin-(9-39) an antagonist of the receptor. *Diabetes* 42:1678-1682, 1993
186. Bullock BP, Heller RS, Habener JF: Tissue distribution of messenger ribonucleic acid encoding the rat glucagon-like peptide-1 receptor. *Endocrinology* 137:2968-2978, 1996
187. Nakagawa A, Satake H, Nakabayashi H, Nishizawa M, Furuya K, Nakano S, Kigoshi T, Nakayama K, Uchida K: Receptor gene expression of glucagon-like peptide-1, but not glucose-dependent insulinotropic polypeptide, in rat nodose ganglion cells. *Auton Neurosci* 110:36-43, 2004
188. Villanueva-Penacarrillo ML, Delgado E, Trapote MA, Alcantara A, Clemente F, Luque MA, Perea A, Valverde I: Glucagon-like peptide-1 binding to rat hepatic membranes. *J Endocrinol* 146:183-189, 1995
189. Delgado E, Luque MA, Alcantara A, Trapote MA, Clemente F, Galera C, Valverde I, Villanueva-Penacarrillo ML: Glucagon-like peptide-1 binding to rat skeletal muscle. *Peptides* 16:225-229, 1995
190. Qin X, Shen H, Liu M, Yang Q, Zheng S, Sabo M, D'Alessio DA, Tso P: GLP-1 reduces intestinal lymph flow, triglyceride absorption, and apolipoprotein production in rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 288:G943-949, 2005
191. Egan JM, Montrose-Rafizadeh C, Wang Y, Bernier M, Roth J: Glucagon-like peptide-1(7-36) amide (GLP-1) enhances insulin-stimulated glucose metabolism in 3T3-L1 adipocytes: one of several potential extrapancreatic sites of GLP-1 action. *Endocrinology* 135:2070-2075, 1994
192. Luque MA, Gonzalez N, Marquez L, Acitores A, Redondo A, Morales M, Valverde I, Villanueva-Penacarrillo ML: Glucagon-like peptide-1 (GLP-1) and glucose metabolism in human myocytes. *J Endocrinol* 173:465-473, 2002

193. Lopez-Delgado MI, Morales M, Villanueva-Penacarrillo ML, Malaisse WJ, Valverde I: Effects of glucagon-like peptide 1 on the kinetics of glycogen synthase a in hepatocytes from normal and diabetic rats. *Endocrinology* 139:2811-2817, 1998
194. Mommsen TP, Andrews PC, Plisetskaya EM: Glucagon-like peptides activate hepatic gluconeogenesis. *FEBS Lett* 219:227-232, 1987
195. Dardevet D, Moore MC, Neal D, DiCostanzo CA, Snead W, Cherrington AD: Insulin-independent effects of GLP-1 on canine liver glucose metabolism: duration of infusion and involvement of hepatoportal region. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 287:E75-81, 2004
196. Vilsboll T, Krarup T, Madsbad S, Holst JJ: Both GLP-1 and GIP are insulinotropic at basal and postprandial glucose levels and contribute nearly equally to the incretin effect of a meal in healthy subjects. *Regul Pept* 114:115-121, 2003
197. Vahl TP, Paty BW, Fuller BD, Prigeon RL, D'Alessio DA: Effects of GLP-1-(7-36)NH₂, GLP-1-(7-37), and GLP-1-(9-36)NH₂ on intravenous glucose tolerance and glucose-induced insulin secretion in healthy humans. *J Clin Endocrinol Metab* 88:1772-1779, 2003
198. Kolligs F, Fehmann HC, Goke R, Goke B: Reduction of the incretin effect in rats by the glucagon-like peptide 1 receptor antagonist exendin (9-39) amide. *Diabetes* 44:16-19, 1995
199. Cunningham BA, Richard AM, Dillon JS, Daley JT, Civelek VN, Deeney JT, Yaney GC, Corkey BE, Tornheim K: Glucagon-like peptide 1 and fatty acids amplify pulsatile insulin secretion from perfused rat islets. *Biochem J* 369:173-178, 2003
200. Drucker DJ, Philippe J, Mojsov S, Chick WL, Habener JF: Glucagon-like peptide I stimulates insulin gene expression and increases cyclic AMP levels in a rat islet cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84:3434-3438, 1987
201. Wang Y, Egan JM, Raygada M, Nadiv O, Roth J, Montrose-Rafizadeh C: Glucagon-like peptide-1 affects gene transcription and messenger ribonucleic acid stability of components of the insulin secretory system in RIN 1046-38 cells. *Endocrinology* 136:4910-4917, 1995
202. Dunning BE, Foley JE, Ahren B: Alpha cell function in health and disease: influence of glucagon-like peptide-1. *Diabetologia* 48:1700-1713, 2005
203. Ding WG, Renstrom E, Rorsman P, Buschard K, Gromada J: Glucagon-like peptide I and glucose-dependent insulinotropic polypeptide stimulate Ca²⁺-induced secretion in rat alpha-cells by a protein kinase A-mediated mechanism. *Diabetes* 46:792-800, 1997
204. Heller RS, Kieffer TJ, Habener JF: Insulinotropic glucagon-like peptide I receptor expression in glucagon-producing alpha-cells of the rat endocrine pancreas. *Diabetes* 46:785-791, 1997
205. de Heer J, Rasmussen C, Coy DH, Holst JJ: Glucagon-like peptide-1, but not glucose-dependent insulinotropic peptide, inhibits glucagon secretion via somatostatin (receptor subtype 2) in the perfused rat pancreas. *Diabetologia* 51:2263-2270, 2008
206. Creutzfeldt WO, Kleine N, Willms B, Orskov C, Holst JJ, Nauck MA: Glucagonostatic actions and reduction of fasting hyperglycemia by exogenous glucagon-like peptide I(7-36) amide in type I diabetic patients. *Diabetes Care* 19:580-586, 1996
207. Behme MT, Dupre J, McDonald TJ: Glucagon-like peptide 1 improved glycemic control in type 1 diabetes. *BMC Endocr Disord* 3:3, 2003
208. Buteau J: GLP-1 receptor signaling: effects on pancreatic beta-cell proliferation and survival. *Diabetes Metab* 34 Suppl 2:S73-77, 2008
209. Zhou J, Pineyro MA, Wang X, Doyle ME, Egan JM: Exendin-4 differentiation of a human pancreatic duct cell line into endocrine cells: involvement of PDX-1 and HNF3beta transcription factors. *J Cell Physiol* 192:304-314, 2002
210. Zhou J, Wang X, Pineyro MA, Egan JM: Glucagon-like peptide 1 and exendin-4 convert pancreatic AR42J cells into glucagon- and insulin-producing cells. *Diabetes* 48:2358-2366, 1999

211. Pospisilik JA, Martin J, Doty T, Ehses JA, Pamir N, Lynn FC, Piteau S, Demuth HU, McIntosh CH, Pederson RA: Dipeptidyl peptidase IV inhibitor treatment stimulates beta-cell survival and islet neogenesis in streptozotocin-induced diabetic rats. *Diabetes* 52:741-750, 2003
212. Tang-Christensen M, Larsen PJ, Goke R, Fink-Jensen A, Jessop DS, Moller M, Sheikh SP: Central administration of GLP-1-(7-36) amide inhibits food and water intake in rats. *Am J Physiol* 271:R848-856, 1996
213. Turton MD, O'Shea D, Gunn I, Beak SA, Edwards CM, Meeran K, Choi SJ, Taylor GM, Heath MM, Lambert PD, Wilding JP, Smith DM, Ghatei MA, Herbert J, Bloom SR: A role for glucagon-like peptide-1 in the central regulation of feeding. *Nature* 379:69-72, 1996
214. Knauf C, Cani PD, Perrin C, Iglesias MA, Maury JF, Bernard E, Benhamed F, Gremeaux T, Drucker DJ, Kahn CR, Girard J, Tanti JF, Delzenne NM, Postic C, Burcelin R: Brain glucagon-like peptide-1 increases insulin secretion and muscle insulin resistance to favor hepatic glycogen storage. *J Clin Invest* 115:3554-3563, 2005
215. Sandoval DA, Bagnol D, Woods SC, D'Alessio DA, Seeley RJ: Arcuate glucagon-like peptide 1 receptors regulate glucose homeostasis but not food intake. *Diabetes* 57:2046-2054, 2008
216. Andrews CN, Bharucha AE, Camilleri M, Low PA, Seide BM, Burton DD, Nickander KK, Baxter KL, Zinsmeister AR: Effects of glucagon-like peptide-1 and sympathetic stimulation on gastric accommodation in humans. *Neurogastroenterol Motil* 19:716-723, 2007
217. Tolessa T, Gutniak M, Holst JJ, Efendic S, Hellstrom PM: Glucagon-like peptide-1 retards gastric emptying and small bowel transit in the rat: effect mediated through central or enteric nervous mechanisms. *Dig Dis Sci* 43:2284-2290, 1998
218. Balkan B, Li X: Portal GLP-1 administration in rats augments the insulin response to glucose via neuronal mechanisms. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 279:R1449-1454, 2000
219. Serre V, Dolci W, Schaerer E, Scrocchi L, Drucker D, Efrat S, Thorens B: Exendin-(9-39) is an inverse agonist of the murine glucagon-like peptide-1 receptor: implications for basal intracellular cyclic adenosine 3',5'-monophosphate levels and beta-cell glucose competence. *Endocrinology* 139:4448-4454, 1998
220. Mentlein R: Dipeptidyl-peptidase IV (CD26)--role in the inactivation of regulatory peptides. *Regul Pept* 85:9-24, 1999
221. Scharpe S, De Meester I: Peptide truncation by dipeptidyl peptidase IV: a new pathway for drug discovery? *Verh K Acad Geneesk Belg* 63:5-32; discussion 32-33, 2001
222. Christopherson KW, 2nd, Cooper S, Broxmeyer HE: Cell surface peptidase CD26/DPPIV mediates G-CSF mobilization of mouse progenitor cells. *Blood* 101:4680-4686, 2003
223. Deacon CF, Holst JJ: Dipeptidyl peptidase IV inhibitors: a promising new therapeutic approach for the management of type 2 diabetes. *Int J Biochem Cell Biol* 38:831-844, 2006
224. Kim D, Wang L, Beconi M, Eiermann GJ, Fisher MH, He H, Hickey GJ, Kowalchick JE, Leiting B, Lyons K, Marsilio F, McCann ME, Patel RA, Petrov A, Scapin G, Patel SB, Roy RS, Wu JK, Wyvratt MJ, Zhang BB, Zhu L, Thornberry NA, Weber AE: (2R)-4-oxo-4-[3-(trifluoromethyl)-5,6-dihydro[1,2,4]triazolo[4,3-a]pyrazin-7(8H)-yl]-1-(2,4,5-trifluorophenyl)butan-2-amine: a potent, orally active dipeptidyl peptidase IV inhibitor for the treatment of type 2 diabetes. *J Med Chem* 48:141-151, 2005
225. Ahren B, Holst JJ, Martensson H, Balkan B: Improved glucose tolerance and insulin secretion by inhibition of dipeptidyl peptidase IV in mice. *Eur J Pharmacol* 404:239-245, 2000

226. Deacon CF, Hughes TE, Holst JJ: Dipeptidyl peptidase IV inhibition potentiates the insulinotropic effect of glucagon-like peptide 1 in the anesthetized pig. *Diabetes* 47:764-769, 1998
227. Marguet D, Baggio L, Kobayashi T, Bernard AM, Pierres M, Nielsen PF, Ribel U, Watanabe T, Drucker DJ, Wagtmann N: Enhanced insulin secretion and improved glucose tolerance in mice lacking CD26. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:6874-6879, 2000
228. Duez H, Smith AC, Xiao C, Giacca A, Szeto L, Drucker DJ, Lewis GF: Acute dipeptidyl peptidase-4 inhibition rapidly enhances insulin-mediated suppression of endogenous glucose production in mice. *Endocrinology* 150:56-62, 2009
229. Zimmet P, Alberti KG, Shaw J: Global and societal implications of the diabetes epidemic. *Nature* 414:782-787, 2001
230. Froguel P: [Genetics of type II diabetes]. *Arch Mal Coeur Vaiss* 93 Spec No 4:7-12, 2000
231. Gerich JE: The genetic basis of type 2 diabetes mellitus: impaired insulin secretion versus impaired insulin sensitivity. *Endocr Rev* 19:491-503, 1998
232. Morwessel NJ: The genetic basis of diabetes mellitus. *AACN Clin Issues* 9:539-554, 1998
233. Matschinsky FM: Regulation of pancreatic beta-cell glucokinase: from basics to therapeutics. *Diabetes* 51 Suppl 3:S394-404, 2002
234. Gloyn AL: Glucokinase (GCK) mutations in hyper- and hypoglycemia: maturity-onset diabetes of the young, permanent neonatal diabetes, and hyperinsulinemia of infancy. *Hum Mutat* 22:353-362, 2003
235. Backhed F, Ding H, Wang T, Hooper LV, Koh GY, Nagy A, Semenkovich CF, Gordon JI: The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:15718-15723, 2004
236. Backhed F, Manchester JK, Semenkovich CF, Gordon JI: Mechanisms underlying the resistance to diet-induced obesity in germ-free mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:979-984, 2007
237. Cani PD, Amar J, Iglesias MA, Poggi M, Knauf C, Bastelica D, Neyrinck AM, Fava F, Tuohy KM, Chabo C, Waget A, Delmee E, Cousin B, Sulpice T, Chamontin B, Ferrieres J, Tanti JF, Gibson GR, Casteilla L, Delzenne NM, Alessi MC, Burcelin R: Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes* 56:1761-1772, 2007
238. Delzenne NM, Cani PD: [Gut microflora is a key player in host energy homeostasis]. *Med Sci (Paris)* 24:505-510, 2008
239. Cani PD, Knauf C, Iglesias MA, Drucker DJ, Delzenne NM, Burcelin R: Improvement of glucose tolerance and hepatic insulin sensitivity by oligofructose requires a functional glucagon-like peptide 1 receptor. *Diabetes* 55:1484-1490, 2006
240. Cani PD, Daubioul CA, Reusens B, Remacle C, Catillon G, Delzenne NM: Involvement of endogenous glucagon-like peptide-1(7-36) amide on glycaemia-lowering effect of oligofructose in streptozotocin-treated rats. *J Endocrinol* 185:457-465, 2005
241. Cani PD, Neyrinck AM, Maton N, Delzenne NM: Oligofructose promotes satiety in rats fed a high-fat diet: involvement of glucagon-like Peptide-1. *Obes Res* 13:1000-1007, 2005
242. Ley RE, Turnbaugh PJ, Klein S, Gordon JI: Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. *Nature* 444:1022-1023, 2006
243. Michael MD, Kulkarni RN, Postic C, Previs SF, Shulman GI, Magnuson MA, Kahn CR: Loss of insulin signaling in hepatocytes leads to severe insulin resistance and progressive hepatic dysfunction. *Mol Cell* 6:87-97, 2000

244. Withers DJ, Gutierrez JS, Towery H, Burks DJ, Ren JM, Previs S, Zhang Y, Bernal D, Pons S, Shulman GI, Bonner-Weir S, White MF: Disruption of IRS-2 causes type 2 diabetes in mice. *Nature* 391:900-904, 1998
245. Miyake K, Ogawa W, Matsumoto M, Nakamura T, Sakaue H, Kasuga M: Hyperinsulinemia, glucose intolerance, and dyslipidemia induced by acute inhibition of phosphoinositide 3-kinase signaling in the liver. *J Clin Invest* 110:1483-1491, 2002
246. Bruning JC, Michael MD, Winnay JN, Hayashi T, Horsch D, Accili D, Goodyear LJ, Kahn CR: A muscle-specific insulin receptor knockout exhibits features of the metabolic syndrome of NIDDM without altering glucose tolerance. *Mol Cell* 2:559-569, 1998
247. Bluher M, Michael MD, Peroni OD, Ueki K, Carter N, Kahn BB, Kahn CR: Adipose tissue selective insulin receptor knockout protects against obesity and obesity-related glucose intolerance. *Dev Cell* 3:25-38, 2002
248. Trayhurn P: Endocrine and signalling role of adipose tissue: new perspectives on fat. *Acta Physiol Scand* 184:285-293, 2005
249. Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM: Adipose expression of tumor necrosis factor- α : direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science* 259:87-91, 1993
250. Ahren B, Simonsson E, Scheurink AJ, Mulder H, Myrsen U, Sundler F: Dissociated insulinotropic sensitivity to glucose and carbachol in high-fat diet-induced insulin resistance in C57BL/6J mice. *Metabolism* 46:97-106, 1997
251. Kiba T, Tanaka K, Numata K, Hoshino M, Misugi K, Inoue S: Ventromedial hypothalamic lesion-induced vagal hyperactivity stimulates rat pancreatic cell proliferation. *Gastroenterology* 110:885-893, 1996
252. van Citters GW, Kabir M, Kim SP, Mittelman SD, Dea MK, Brubaker PL, Bergman RN: Elevated glucagon-like peptide-1-(7-36)-amide, but not glucose, associated with hyperinsulinemic compensation for fat feeding. *J Clin Endocrinol Metab* 87:5191-5198, 2002
253. Egan JM, Bulotta A, Hui H, Perfetti R: GLP-1 receptor agonists are growth and differentiation factors for pancreatic islet beta cells. *Diabetes Metab Res Rev* 19:115-123, 2003
254. Xu G, Stoffers DA, Habener JF, Bonner-Weir S: Exendin-4 stimulates both beta-cell replication and neogenesis, resulting in increased beta-cell mass and improved glucose tolerance in diabetic rats. *Diabetes* 48:2270-2276, 1999
255. Randle PJ: Regulatory interactions between lipids and carbohydrates: the glucose fatty acid cycle after 35 years. *Diabetes Metab Rev* 14:263-283, 1998
256. Prentki M, Nolan CJ: Islet beta cell failure in type 2 diabetes. *J Clin Invest* 116:1802-1812, 2006
257. Wolfgang MJ, Lane MD: The role of hypothalamic malonyl-CoA in energy homeostasis. *J Biol Chem* 281:37265-37269, 2006
258. Oprescu AI, Bikopoulos G, Naassan A, Allister EM, Tang C, Park E, Uchino H, Lewis GF, Fantus IG, Rozakis-Adcock M, Wheeler MB, Giacca A: Free fatty acid-induced reduction in glucose-stimulated insulin secretion: evidence for a role of oxidative stress in vitro and in vivo. *Diabetes* 56:2927-2937, 2007
259. Christopherson KS, Bredt DS: Nitric oxide in excitable tissues: physiological roles and disease. *J Clin Invest* 100:2424-2429, 1997
260. Shimabukuro M, Zhou YT, Levi M, Unger RH: Fatty acid-induced beta cell apoptosis: a link between obesity and diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:2498-2502, 1998
261. Manco M, Calvani M, Mingrone G: Effects of dietary fatty acids on insulin sensitivity and secretion. *Diabetes Obes Metab* 6:402-413, 2004

262. Borsonelo EC, Galduroz JC: The role of polyunsaturated fatty acids (PUFAs) in development, aging and substance abuse disorders: review and propositions. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 78:237-245, 2008
263. Simopoulos AP: Omega-6/omega-3 essential fatty acids: biological effects. *World Rev Nutr Diet* 99:1-16, 2009
264. Chawla A, Repa JJ, Evans RM, Mangelsdorf DJ: Nuclear receptors and lipid physiology: opening the X-files. *Science* 294:1866-1870, 2001
265. Brookheart RT, Michel CI, Schaffer JE: As a matter of fat. *Cell Metab* 10:9-12, 2009
266. Kelley DE, Wing R, Buonocore C, Sturis J, Polonsky K, Fitzsimmons M: Relative effects of calorie restriction and weight loss in noninsulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* 77:1287-1293, 1993
267. Straczkowski M, Kowalska I: The role of skeletal muscle sphingolipids in the development of insulin resistance. *Rev Diabet Stud* 5:13-24, 2008
268. Stratford S, DeWald DB, Summers SA: Ceramide dissociates 3'-phosphoinositide production from pleckstrin homology domain translocation. *Biochem J* 354:359-368, 2001
269. Griffin ME, Marcucci MJ, Cline GW, Bell K, Barucci N, Lee D, Goodyear LJ, Kraegen EW, White MF, Shulman GI: Free fatty acid-induced insulin resistance is associated with activation of protein kinase C theta and alterations in the insulin signaling cascade. *Diabetes* 48:1270-1274, 1999
270. Girard J: [Contribution of free fatty acids to impairment of insulin secretion and action: mechanism of beta-cell lipotoxicity]. *Med Sci (Paris)* 19:827-833, 2003
271. Schrauwen P, Hesselink MK: Oxidative capacity, lipotoxicity, and mitochondrial damage in type 2 diabetes. *Diabetes* 53:1412-1417, 2004
272. Kelley DE, Mandarino LJ: Fuel selection in human skeletal muscle in insulin resistance: a reexamination. *Diabetes* 49:677-683, 2000
273. Lam TK, Yoshii H, Haber CA, Bogdanovic E, Lam L, Fantus IG, Giacca A: Free fatty acid-induced hepatic insulin resistance: a potential role for protein kinase C-delta. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 283:E682-691, 2002
274. Minassian C, Tarpin S, Mithieux G: Role of glucose-6 phosphatase, glucokinase, and glucose-6 phosphate in liver insulin resistance and its correction by metformin. *Biochem Pharmacol* 55:1213-1219, 1998
275. Clarke SD: Polyunsaturated fatty acid regulation of gene transcription: a mechanism to improve energy balance and insulin resistance. *Br J Nutr* 83 Suppl 1:S59-66, 2000
276. Nauck M: Therapeutic potential of glucagon-like peptide 1 in type 2 diabetes. *Diabet Med* 13:S39-43, 1996
277. Pratley RE, Gilbert M: Targeting Incretins in Type 2 Diabetes: Role of GLP-1 Receptor Agonists and DPP-4 Inhibitors. *Rev Diabet Stud* 5:73-94, 2008
278. Herman GA, Bergman A, Stevens C, Kotey P, Yi B, Zhao P, Dietrich B, Golor G, Schrodter A, Keymeulen B, Lasseter KC, Kipnes MS, Snyder K, Hilliard D, Tanen M, Cilissen C, De Smet M, de Lepeleire I, Van Dyck K, Wang AQ, Zeng W, Davies MJ, Tanaka W, Holst JJ, Deacon CF, Gottesdiener KM, Wagner JA: Effect of single oral doses of sitagliptin, a dipeptidyl peptidase-4 inhibitor, on incretin and plasma glucose levels after an oral glucose tolerance test in patients with type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 91:4612-4619, 2006
279. Yang J, Campitelli J, Hu G, Lin Y, Luo J, Xue C: Increase in DPP-IV in the intestine, liver and kidney of the rat treated with high fat diet and streptozotocin. *Life Sci* 81:272-279, 2007
280. Nagakura T, Yasuda N, Yamazaki K, Ikuta H, Tanaka I: Enteroinsular axis of db/db mice and efficacy of dipeptidyl peptidase IV inhibition. *Metabolism* 52:81-86, 2003

281. Mu J, Woods J, Zhou YP, Roy RS, Li Z, Zycband E, Feng Y, Zhu L, Li C, Howard AD, Moller DE, Thornberry NA, Zhang BB: Chronic inhibition of dipeptidyl peptidase-4 with a sitagliptin analog preserves pancreatic beta-cell mass and function in a rodent model of type 2 diabetes. *Diabetes* 55:1695-1704, 2006
282. Reimer MK, Holst JJ, Ahren B: Long-term inhibition of dipeptidyl peptidase IV improves glucose tolerance and preserves islet function in mice. *Eur J Endocrinol* 146:717-727, 2002
283. Ahren B, Simonsson E, Larsson H, Landin-Olsson M, Torgeirsson H, Jansson PA, Sandqvist M, Bavenholm P, Efendic S, Eriksson JW, Dickinson S, Holmes D: Inhibition of dipeptidyl peptidase IV improves metabolic control over a 4-week study period in type 2 diabetes. *Diabetes Care* 25:869-875, 2002
284. D'Alessio DA, Denney AM, Hermiller LM, Prigeon RL, Martin JM, Tharp WG, Saylan ML, He Y, Dunning BE, Foley JE, Pratley RE: Treatment with the dipeptidyl peptidase-4 inhibitor vildagliptin improves fasting islet-cell function in subjects with type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 94:81-88, 2009
285. Rosenstock J, Foley JE, Rendell M, Landin-Olsson M, Holst JJ, Deacon CF, Rochotte E, Baron MA: Effects of the dipeptidyl peptidase-IV inhibitor vildagliptin on incretin hormones, islet function, and postprandial glycemia in subjects with impaired glucose tolerance. *Diabetes Care* 31:30-35, 2008
286. Utzschneider KM, Tong J, Montgomery B, Udayasankar J, Gerchman F, Marcovina SM, Watson CE, Ligueros-Saylan MA, Foley JE, Holst JJ, Deacon CF, Kahn SE: The dipeptidyl peptidase-4 inhibitor vildagliptin improves beta-cell function and insulin sensitivity in subjects with impaired fasting glucose. *Diabetes Care* 31:108-113, 2008
287. Vella A, Bock G, Giesler PD, Burton DB, Serra DB, Saylan ML, Deacon CF, Foley JE, Rizza RA, Camilleri M: The effect of dipeptidyl peptidase-4 inhibition on gastric volume, satiation and enteroendocrine secretion in type 2 diabetes: a double-blind, placebo-controlled crossover study. *Clin Endocrinol (Oxf)* 69:737-744, 2008
288. Holst JJ, Deacon CF: Inhibition of the activity of dipeptidyl-peptidase IV as a treatment for type 2 diabetes. *Diabetes* 47:1663-1670, 1998
289. Balas B, Baig MR, Watson C, Dunning BE, Ligueros-Saylan M, Wang Y, He YL, Darland C, Holst JJ, Deacon CF, Cusi K, Mari A, Foley JE, DeFronzo RA: The dipeptidyl peptidase IV inhibitor vildagliptin suppresses endogenous glucose production and enhances islet function after single-dose administration in type 2 diabetic patients. *J Clin Endocrinol Metab* 92:1249-1255, 2007
290. Ahren B: Novel combination treatment of type 2 diabetes DPP-4 inhibition + metformin. *Vasc Health Risk Manag* 4:383-394, 2008
291. Charbonnel B, Karasik A, Liu J, Wu M, Meininger G: Efficacy and safety of the dipeptidyl peptidase-4 inhibitor sitagliptin added to ongoing metformin therapy in patients with type 2 diabetes inadequately controlled with metformin alone. *Diabetes Care* 29:2638-2643, 2006
292. Burcelin R, Cani PD, Knauf C: [GLP-1 and cerebral detection of glucose, a key mechanism for the regulation of glucose homeostasis]. *Med Sci (Paris)* 22:237-239, 2006
293. Burcelin R, Serino M, Cabou C: A role for the gut-to-brain GLP-1-dependent axis in the control of metabolism. *Curr Opin Pharmacol*, 2009
294. Thornalley PJ: Use of aminoguanidine (Pimagedine) to prevent the formation of advanced glycation endproducts. *Arch Biochem Biophys* 419:31-40, 2003
295. Pratico D: Evidence of oxidative stress in Alzheimer's disease brain and antioxidant therapy: lights and shadows. *Ann N Y Acad Sci* 1147:70-78, 2008

296. Stack EC, Matson WR, Ferrante RJ: Evidence of oxidant damage in Huntington's disease: translational strategies using antioxidants. *Ann N Y Acad Sci* 1147:79-92, 2008
297. Tsang AH, Chung KK: Oxidative and nitrosative stress in Parkinson's disease. *Biochim Biophys Acta* 1792:643-650, 2009
298. Burcelin R: The incretins: a link between nutrients and well-being. *Br J Nutr* 93 Suppl 1:S147-156, 2005
299. Weir GC, Mojsov S, Hendrick GK, Habener JF: Glucagonlike peptide I (7-37) actions on endocrine pancreas. *Diabetes* 38:338-342, 1989
300. Thorens B, Waeber G: Glucagon-like peptide-I and the control of insulin secretion in the normal state and in NIDDM. *Diabetes* 42:1219-1225, 1993
301. Creutzfeldt W: The incretin concept today. *Diabetologia* 16:75-85, 1979
302. Hansen L, Deacon C, Orskov C, Holst JJ: Glucagon like peptide-1-(7-36)amide is transformed to glucagon like peptide -1-(9-36)amide by dipeptidyl peptidase IV in the capillaries supplying the L cells of the porcine intestine. *Endocrinology* 140:5356-5363, 1999
303. Deacon CF: Circulation and degradation of GIP and GLP-1. *Horm Metab Res* 36:761-765, 2004
304. Nakabayashi H, Nishizawa M, Nakagawa A, Takeda R, Nijima A: Vagal hepatopancreatic reflex effect evoked by intraportal appearance of tGLP-1. *Am. J. Physiol.* 271:E808-813, 1996
305. Johnson KM, Edgerton DS, Rodewald T, Scott M, Farmer B, Neal D, Cherrington AD: Intraportal GLP-1 infusion increases nonhepatic glucose utilization without changing pancreatic hormone levels. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 293:E1085-1091, 2007
306. Johnson KM, Edgerton DS, Rodewald T, Scott M, Farmer B, Neal D, Cherrington AD: Intraportally delivered GLP-1, in the presence of hyperglycemia induced via peripheral glucose infusion, does not change whole body glucose utilization. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 294:E380-384, 2008
307. Knauf C, Cani P, Perrin C, Iglesias M, Maury J, Bernard E, Benhamed F, Grémeaux T, Drucker D, Kahn C, Girard J, Tanti J, Delzenne N, Postic C, Burcelin R: Brain Glucagon-Like Peptide-1 increases insulin secretion and muscle insulin resistance to favor hepatic glycogen storage. *J. Clin Invest* 115:3554-3563, 2005
308. Cabou C, Campistron G, Marsollier N, Leloup C, Cruciani-Guglielmacci C, Pénicaud L, Drucker DJ, Magnan C, Burcelin R: Brain GLP-1 regulates arterial blood flow, heart rate and insulin sensitivity. *Diabetes* In press, 2008
309. Sandoval DA, Bagnol D, Woods SC, D'Alessio DA, Seeley RJ: Arcuate GLP-1 receptors regulate glucose homeostasis but not food intake. *Diabetes* 57:2046-2054, 2008
310. Burcelin R, Dolci W, Thorens B: Glucose sensing by the hepatoportal sensor is GLUT-2 dependent. In vivo analysis in GLUT-2null mice. *Diabetes* 49, 2000
311. Burcelin R, Dolci W, Thorens B: Portal glucose infusion in the mouse induces hypoglycemia. Evidence that the hepatoportal glucose sensor stimulates glucose utilization. *Diabetes* 49:1635-1642, 2000
312. Perrin C, Knauf C, Burcelin R: Intracerebroventricular infusion of glucose, insulin, and the adenosine monophosphate-activated kinase activator, 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1-beta-D-ribofuranoside, controls muscle glycogen synthesis. *Endocrinology* 145:4025-4033, 2004
313. Cabou C, Cani PD, Campistron G, Knauf C, Mathieu C, Sartori C, Amar J, Scherrer U, Burcelin R: Central insulin regulates heart rate and arterial blood flow: an endothelial nitric oxide synthase-dependent mechanism altered during diabetes. *Diabetes* 56:2872-2877, 2007

314. Van De Winkel M, Pipeleers D: Autofluorescence-activated cell sorting of pancreatic islet cells: purification of insulin-containing B-cells according to glucose-induced changes in cellular redox state. *Biochem Biophys Res Commun* 114:835-842, 1983
315. Knauf C, Cani PD, Ait-Belgnaoui A, Benani A, Dray C, Cabou C, Colom A, Uldry M, Rastrelli S, Sabatier E, Godet N, Waget A, Penicaud L, Valet P, Burcelin R: Brain glucagon-like peptide 1 signaling controls the onset of high-fat diet-induced insulin resistance and reduces energy expenditure. *Endocrinology* 149:4768-4777, 2008
316. Hansotia T, Baggio LL, Delmeire D, Hinke SA, Yamada Y, Tsukiyama K, Seino Y, Holst JJ, Schuit F, Drucker DJ: Double incretin receptor knockout (DIRKO) mice reveal an essential role for the enteroinsular axis in transducing the glucoregulatory actions of DPP-IV inhibitors. *Diabetes* 53:1326-1335, 2004
317. Flock G, Baggio LL, Longuet C, Drucker DJ: Incretin receptors for glucagon-like peptide 1 and glucose-dependent insulinotropic polypeptide are essential for the sustained metabolic actions of vildagliptin in mice. *Diabetes* 56:3006-3013, 2007
318. Duffy NA, Green BD, Irwin N, Gault VA, McKillop AM, O'Harte FP, Flatt PR: Effects of antidiabetic drugs on dipeptidyl peptidase IV activity: nateglinide is an inhibitor of DPP IV and augments the antidiabetic activity of glucagon-like peptide-1. *Eur J Pharmacol* 568:278-286, 2007
319. Moritoh Y, Takeuchi K, Asakawa T, Kataoka O, Odaka H: Chronic administration of alogliptin, a novel, potent, and highly selective dipeptidyl peptidase-4 inhibitor, improves glycemic control and beta-cell function in obese diabetic ob/ob mice. *Eur J Pharmacol* 588:325-332, 2008
320. Dai H, Gustavson SM, Preston GM, Eskra JD, Calle R, Hirshberg B: Non-linear increase in GLP-1 levels in response to DPP-IV inhibition in healthy adult subjects. *Diabetes Obes Metab* 10:506-513, 2008
321. Nijijima A: Afferent impulse discharges from glucoreceptors in the liver of the guinea pig. *Ann N Y Acad Sci* 157:690-700, 1969
322. Berthoud HR, Kressel M, Neuhuber WL: An anterograde tracing study of the vagal innervation of rat liver, portal vein and biliary system. *Anat. Embryol.* 186:431-422, 1992
323. Berthoud HR, Nijijima A, Sauter JF, Jeanrenaud B: Evidence for a role of the gastric, coeliac and hepatic branches in vagally stimulated insulin secretion in the rat. *Journal of the Autonomic Nervous System* 7:97-110, 1983
324. Berthoud HR, Patterson LM, Neumann F, Neuhuber WL: Distribution and structure of vagal afferent intraganglionic laminar endings (IGLEs) in the rat gastrointestinal tract. *Anat Embryol (Berl)* 195:183-191, 1997
325. Nijijima A: Neurophysiological evidence for hepatic glucose-sensitive afferents. Commentary on "The current status of hepatic theory of food intake control". *Appetite* 2:151-152, 1981
326. Nijijima A: Glucose-sensitive afferent nerve fibres in the hepatic branch of the vagus nerve in the guinea-pig. *Journal of Physiology* 332:315-323, 1982
327. Ionut V, Hucking K, Liberty IF, Bergman RN: Synergistic effect of portal glucose and glucagon-like peptide-1 to lower systemic glucose and stimulate counter-regulatory hormones. *Diabetologia* 48:967-975, 2005
328. Vahl TP, Tauchi M, Durler TS, Elfers EE, Fernandes TM, Bitner RD, Ellis KS, Woods SC, Seeley RJ, Herman JP, D'Alessio DA: Glucagon-like peptide-1 (GLP-1) receptors expressed on nerve terminals in the portal vein mediate the effects of endogenous GLP-1 on glucose tolerance in rats. *Endocrinology* 148:4965-4973, 2007

329. Preitner F, Ibberson M, Franklin I, Binnert C, Pende M, Gjinovci A, Hansotia T, Drucker DJ, Wollheim C, Burcelin R, Thorens B: Gluco-incretins control insulin secretion at multiple levels as revealed in mice lacking GLP-1 and GIP receptors. *J Clin Invest* 113:635-645, 2004
330. Nielsen CU, Brodin B: Di/tri-peptide transporters as drug delivery targets: regulation of transport under physiological and patho-physiological conditions. *Curr Drug Targets* 4:373-388, 2003
331. Terada T, Sawada K, Saito H, Hashimoto Y, Inui K: Inhibitory effect of novel oral hypoglycemic agent nateglinide (AY4166) on peptide transporters PEPT1 and PEPT2. *Eur J Pharmacol* 392:11-17, 2000
332. Berthoud HR, Kressel M, Neuhuber WL: An anterograde tracing study of the vagal innervation of rat liver, portal vein and biliary system. *Anat Embryol (Berl)* 186:431-442, 1992
333. Berthoud HR, Nijima A, Sauter JF, Jeanrenaud B: Evidence for a role of the gastric, coeliac and hepatic branches in vagally stimulated insulin secretion in the rat. *J Auton Nerv Syst* 7:97-110, 1983
334. Amato A, Cinci L, Rotondo A, Serio R, Faussone-Pellegrini MS, Vannucchi MG, Mule F: Peripheral motor action of glucagon-like peptide-1 through enteric neuronal receptors. *Neurogastroenterol Motil*
335. Leibach FH, Ganapathy V: Peptide transporters in the intestine and the kidney. *Annu Rev Nutr* 16:99-119, 1996
336. Rubio-Aliaga I, Daniel H: Peptide transporters and their roles in physiological processes and drug disposition. *Xenobiotica* 38:1022-1042, 2008
337. Ruhl A, Hoppe S, Frey I, Daniel H, Schemann M: Functional expression of the peptide transporter PEPT2 in the mammalian enteric nervous system. *J Comp Neurol* 490:1-11, 2005
338. Walz HA, Harndahl L, Wierup N, Zmuda-Trzebiatowska E, Svannelid F, Manganiello VC, Ploug T, Sundler F, Degerman E, Ahren B, Holst LS: Early and rapid development of insulin resistance, islet dysfunction and glucose intolerance after high-fat feeding in mice overexpressing phosphodiesterase 3B. *J Endocrinol* 189:629-641, 2006
339. Sohet FM, Neyrinck AM, Dewulf EM, Bindels LB, Portois L, Malaisse WJ, Carpentier YA, Cani PD, Delzenne NM: Lipid peroxidation is not a prerequisite for the development of obesity and diabetes in high-fat-fed mice. *Br J Nutr* 102:462-469, 2009

summary

In response to a glucose load, the control the glucose homeostasis depends on a “metabolic reflex”. The secretion of intestinal hormones and the activation of the vagus nerve are the first events involved. The glucagon like peptide 1 (GLP-1), is secreted by the intestinal L cells in response to the glucose. This hormone stimulates glucose-induced insulin secretion. However, GLP-1 rapidly, within less than a minute, degraded by the dipeptidyl-peptidase-IV (DPP-IV) in the entero-portal circulation and in the systemic blood. Therefore, a physiological mechanism should be issued from such a short half life. To validate this hypothesis we used a DPP4 inhibitor sitagliptine in vivo. We here showed that the entero-portal secretion of GLP-1 induces a relative diminution of the glycemia in response to an oral glucose challenge. To use the antagonist of GLP-1 receptor, exendin 9, we have shown that the gut GLP-1-induced relative diminution of the glycemia permits the recruitment of the brain GLP-1 to favor the insulin secretion. The recording of the vagus nerve confirms the activation of the “gut-brain” axis and the implication of the sitagliptine. On other hand, the dipeptide, generated by the GLP-1 (7-37) degradation, histidine-alanine, decreases the insulin secretion and increases the glucagon secretion to regulate the GLP-1(7-37) effects. In second time, the utilization of a high oral dose of sitagliptine (40mg) increases the portal concentration of GLP-1 which induces an important diminution of the glycemia to not recruit the brain GLP-1, and not increase the insulin secretion. We have validated that the entero-portal GLP-1 receptors, no insulin dependent, are implicated in the regulation of the glycemia. So, the control of the levels of GLP-1 and DPP-IV seems to be necessary for the maintain of the glucose homeostasis.

On the other hand, in physiopathology, the nutritional lipids are a cause of the development of the type II diabetes. However, their role and signaling on the intestine are to define. Thus, mice are perfused with a lipid solution into the gut or through the carotid vein to compare the importance of the lipid signal from the intestine in relation to the lipid signal toward the brain. So, the intestinal lipids induce an insulin resistance state, associated to an intestinal oxidative stress. The former should be an early factor to impact on the “intestine-brain” axis to perturb the vagus nerve activity.

En réponse à une charge orale en glucose, la régulation de l'homéostasie glucidique est dépendante d'un « arc réflexe métabolique anticipateur » dont la sécrétion d'hormones intestinales et l'activation du nerf vague, sont les premières informations du statut énergétique de l'organisme alors transmises au cerveau. Le glucagon like peptide-1 (GLP-1), sécrété par l'intestin en réponse au glucose, est reconnu pour sa propriété insulinothrompique mais dont le mode d'action reste à définir. En effet, on observe paradoxalement que malgré son importance biologique sur la sécrétion d'insuline ce peptide est très rapidement (moins d'une minute) dégradé par la dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV) dans la sphère entéro-portale. Pour en étudier la signification physiologique nous avons utilisé dans un premier temps une faible dose d'un inhibiteur de la DPP-IV administrée par voie orale, la sitagliptine. Nous avons mis en évidence que seule la sécrétion entéro-portale du GLP-1 permettrait une diminution relative de la glycémie en réponse à une charge orale en glucose. Par utilisation de l'antagoniste du récepteur au GLP-1, l'exendine 9, nous avons constaté que cette diminution partielle de la glycémie par le GLP-1 intestinal permet alors le recrutement du GLP-1 cérébral insulinothrompique. La mesure de l'activité électrique du nerf vague démontre que l'axe « intestin-cerveau » est bien recruté. D'autre part, le dipeptide généré par la dégradation du GLP-1 actif, l'histidine-alanine, induirait un rétrocontrôle des effets du GLP-1 sur le pancréas en diminuant la sécrétion d'insuline et en augmentant la sécrétion de glucagon. Dans un second temps, l'utilisation d'une forte dose orale de sitagliptine (40mg) pour laquelle la concentration plasmatique de GLP-1 dans le sang portal est fortement augmentée, a induit une diminution accrue de la glycémie qui n'a donc pas permis le recrutement du GLP-1 cérébral et qui n'a pas favorisé la sécrétion d'insuline. Nous avons validé que les récepteurs entéro-portaux du GLP-1, qui agissent indépendamment de la sécrétion d'hormones pancréatiques, sont bien impliqués dans la régulation de la glycémie par la sitagliptine. Ainsi, le contrôle des taux de GLP-1 et de DPP-IV semblent nécessaire au maintien de l'homéostasie glucidique.

D'autre part, en physiopathologie, les lipides nutritionnels sont une cause de l'installation du diabète de type II. Néanmoins, leur rôle et leur mode d'action sur l'intestin, reste à élucider. Ainsi, sur des souris perfusées d'une solution riche en lipides par voie intragastrique ou intracarotidienne, nous avons montré l'importance de l'information provenant de l'intestin par rapport aux signaux qui arrivent au cerveau. Les lipides perfusés par voie entérale induisent alors un état d'insulinorésistance associé à un stress oxydant intestinal. Ce dernier semble être un facteur précoce dans l'installation du diabète de type II et qui perturbe l'activité nerveuse de l'axe « intestin-cerveau ».