

Université de Sherbrooke

Rôle du facteur de transcription HNF1 α dans la promotion du diabète par l'intermédiaire
d'hormones intestinales

Par
François Brial
Département d'anatomie et de biologie cellulaire

Thèse présentée à la Faculté de médecine et des sciences de la santé
en vue de l'obtention du grade de philosophiae doctor (Ph.D.)
en Biologie Cellulaire

Sherbrooke, Québec, Canada
Mai, 2014

Membres du jury d'évaluation
Pr. François Boudreau, Département d'anatomie et de biologie cellulaire
Pr. Nathalie Rivard, Département d'anatomie et de biologie cellulaire
Pr. Brendan Bell, Département d'infectiologie et de microbiologie
Pr Vincent Poitout, Département de biochimie et de médecine moléculaire, Université de
Montréal

© François Brial/2014

*à Josette et Michel, mes parents,
et à tout ceux qui ont toujours cru en moi*

à coeur vaillant, rien d'impossible

Résumé

Rôle du facteur de transcription HNF1 α dans la promotion du diabète par l'intermédiaire d'hormones intestinales

Par

François Brial

Département d'anatomie et de biologie cellulaire

Thèse présentée à la Faculté de médecine et des sciences de la santé en vue de l'obtention du diplôme de philosophiae doctor (Ph.D.) en biologie cellulaire, Faculté de médecine et des sciences de la santé, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada, J1H 5N4

HNF1 α (*hepatocyte nuclear factor-1 α*) est un facteur de transcription exprimé dans le foie, le pancréas, les reins, l'estomac, l'intestin grêle et le côlon. Il a été démontré que des mutations du gène codant pour cette protéine sont associées à un diabète non insulino-dépendant MODY3. De plus, les souris déficientes pour l'expression de Hnf1 α souffrent d'hyperglycémie. Ces animaux mutants semblent produire de l'insuline mais présentent cependant une altération de la sécrétion de cette hormone au niveau du pancréas. Dans une précédente étude, nous avons démontré que certains marqueurs de cellules endocrines impliqués dans l'homéostasie du glucose étaient modulés chez les animaux mutants comparativement aux animaux contrôles notamment la ghréline, le Gip, la somatostatine. Notre hypothèse de recherche est que la perte de Hnf1 α conditionne la promotion du diabète par l'intermédiaire d'hormones intestinales. Nous avons observé, chez les animaux mutants, une augmentation de l'expression du transcrit, du nombre de cellules positives ainsi que des taux plasmatiques de ghréline. Cette hormone étant reliée à l'homéostasie du glucose, nous avons suivi les variations de la glycémie et des taux d'insuline chez nos animaux. Nous avons observé une hyperglycémie accompagnée d'une diminution des taux d'insuline chez nos animaux mutants. Ces souris présentent une prise alimentaire augmentée, une polyurie et une polydipsie élevées, symptômes connus du diabète. Le traitement de 6 jours sur les souris Hnf1 α ^{-/-} avec un antagoniste commercial du récepteur à la ghréline GHSR1a, le (D-Lys3)-GHRP-6 de BACHEM®, montre un rétablissement de la glycémie proche des valeurs normales, de même qu'une augmentation significative des taux d'insuline plasmatiques des souris traitées, une diminution de la polyurie, de la polydipsie et de la glycosurie. Les souris mutantes traitées avec cet antagoniste voient leur tolérance au glucose améliorée même en cas de choc glycémique. Nous avons, enfin, documenté la régulation possible de Hnf1 α vis-à-vis du gène codant pour la ghréline. Des infections lentivirales, réalisées sur des cellules MIN6 avec un shARN dirigé contre le transcrit Hnf1 α , montrent une augmentation des taux d'expression du transcrit ghréline. Nous avons également mis en évidence l'interaction physique entre Hnf1 α et le promoteur ghréline en plusieurs sites par des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine. L'ensemble de ces résultats suggère que la perte de Hnf1 α chez la souris joue un rôle dans la promotion de l'hyperglycémie par l'intermédiaire d'une dérégulation de la production de ghréline.

Mots clés : HNF1 α , diabète, ghréline, Gip, somatostatine, antagoniste, GHSR1a

Table des matières

Résumé.....	iv
Table des matières	v
Liste des tableaux.....	ix
Liste des figures.....	x
Liste des abréviations	xii
Introduction.....	1
1 L'appareil digestif.....	1
1.1 Formation du tube digestif	2
1.2 Le pancréas	4
1.3 L'épithélium intestinal	5
1.3.1 L'axe crypte-villosité	5
1.3.2 Les différents types cellulaires.....	5
2 La transcription des gènes et la protéine HNF1α	13
2.1 La transcription des gènes et la chromatine	13
2.2 Le facteur de transcription HNF1 α	15
3 Rôles cellulaires de HNF1α.....	17
3.1 Le foie	17
3.2 Les reins	18
3.3 Le pancréas	19
3.4 L'intestin	21
3.5 Autres anomalies rencontrées chez les souris Hnf1 α ^{-/-}	22
4 L'homéostasie du glucose et pathologies associées	23
4.1 Diabète de type 1 ou diabète insulino-dépendant ou juvénile	24
4.2 Le diabète de type 2 ou diabète non insulino-dépendant ou mature.....	25
4.3 Diabète gestationnel.....	25
4.4 Les diabètes MODY.....	26
4.5 Le MODY3	27
5 Les hormones intervenant dans l'homéostasie du glucose.....	28
5.1 L'insuline	28
5.1.1 Le mécanisme de libération de l'insuline par les cellules β pancréatiques.....	29
5.1.2 Actions de l'insuline.....	31
5.2 Le glucagon.....	32
5.3 Les incrétines	33
5.3.1 Le GIP	33
5.3.2 Le GLP-1.....	37
5.4 La DPP4	41

5.5	La leptine.....	42
5.6	La ghréline	45
5.7	La Somatostatine.....	50
6	Hypothèse et objectifs du projet de recherche	51
Matériel et Méthodes		53
1	Le modèle de souris mutantes Hnf1α^{-/-}	53
1.1	Sacrifice des souris.....	53
1.2	Génotypage des souris	54
1.3	Extraction d'ARN totaux à partir de tissus	55
1.4	Réaction de rétro transcription (RT)	56
1.5	PCR quantitatif (qPCR)	57
1.6	Extraction de protéines totales à partir de tissus	59
1.7	Fixation des tissus pour coupes histologiques	59
1.8	Immunofluorescences	60
1.9	Prise de la glycémie sanguine	61
1.10	Prise de la glycosurie	61
1.11	Traitement des souris avec l'antagoniste au récepteur à la ghréline GHSR1a ..	62
1.12	Récolte du sérum et stockage.....	62
2	Test immuno-enzymatique ELISA.....	62
3	Culture cellulaire	64
3.1	Cellules MIN6.....	64
3.2	Cellules HEK293T.....	64
3.3	Production lentivirale.....	65
3.4	Infection lentivirale.....	66
3.5	Extraction des ARN totaux et transcription inverse	66
3.6	Extraction des protéines totales.....	66
3.7	Immunobuvardages.....	67
4	Immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) sur cellules MIN6	68
5	Statistiques	70
Résultats.....		71
1	La perte de Hnf1α affecte les niveaux d'expression de marqueurs de cellules entéroendocrines	71
2	Impact de la perte de Hnf1α sur l'hormone ghréline.....	72
2.1	La perte de Hnf1 α module la population de cellules entéroendocrines produisant la ghréline	73
2.2	La perte de Hnf1 α module la production de ghréline circulante	74
3	Impact de la perte de Hnf1α sur l'hormone Gip et son inhibiteur Dpp4	77
4	Impact de la perte de Hnf1α sur l'hormone Sst.....	79
5	Impact de la perte de Hnf1α sur l'hormone leptine	81
6	Impact de la perte de Hnf1α sur les hormones pancréatiques insuline et glucagon	82
6.1	Modulations de l'insuline.....	82
6.2	Impact de la perte de Hnf1 α sur le glucagon	84
7	Étude du métabolisme glucidique des souris Hnf1α^{-/-} et de l'impact du traitement avec un antagoniste du récepteur à la ghréline GHSR1a.....	84

7.1	Le traitement avec un antagoniste du récepteur à la ghréline permet une diminution de la glycémie chez les souris $Hnf1\alpha^{-/-}$	85
7.2	Les souris $Hnf1\alpha^{-/-}$ ont une prise alimentaire qui augmente et présentent des symptômes diabétiques	88
7.3	Test de tolérance au glucose par injection intrapéritonéale après traitement à l'antagoniste du récepteur à la ghréline	92
7.4	La glycosurie des animaux $Hnf1\alpha^{-/-}$ est rétablie après le traitement à l'antagoniste au récepteur à la ghréline	96
8	La régulation potentielle du gène de la ghréline par $Hnf1\alpha$	97
8.1	Validation du modèle et des outils cellulaires	97
8.2	Le facteur de transcription $Hnf1\alpha$ interagit physiquement avec le promoteur du gène ghréline <i>in cellulo</i> et est associé à un état réprimé de la chromatine	100
	Discussion	104
	Conclusion	135
	Listes des références	140
	Annexe	192
	Remerciements	197

Liste des tableaux

Tableau 1 : Les hormones gastro-intestinales, leurs sécrétions et leurs rôles.....	12
Tableau 2 : Mélange réactionnel de PCR.	54
Tableau 3 : Amorces utilisées pour le génotypage des souris mutantes.	54
Tableau 4 : Programme PCR.	55
Tableau 5 : Mélange réactionnel de RT.....	56
Tableau 6 : Mélange réactionnel de qPCR.....	57
Tableau 7 : Séquences des amorces utilisées pour les réactions de qPCR.....	57
Tableau 8 : Tampon de lyse.	59
Tableau 9 : Anticorps et dilutions utilisés lors des expériences d'immunofluorescences.	61
Tableau 10 : Kits ELISA utilisés	63
Tableau 11 : Anticorps utilisés pour les expériences d'immunoprécipitation de la chromatine.....	69

Liste des figures

Figure 1: Schéma de l'appareil digestif.	1
Figure 2: Étapes du développement de l'endoderme.	3
Figure 3: Les différents types de cellules épithéliales intestinales.....	8
Figure 4: Production des hormones gastro-intestinales chez l'humain.....	11
Figure 5 : Structure de HNF1α. Représentation schématique de la protéine HNF1α humaine.....	16
Figure 6 : Localisation des mutations du gène humain <i>HNF1α</i>.....	28
Figure 7: Mécanisme de libération de l'insuline.	30
Figure 9 : Expression des transcrits de Glp-1, Gip, Ghréline et Sst dans le jéjunum des souris Hnf1α^{-/-}.....	72
Figure 10: Modulation du nombre de cellules ghréline positives dans le jéjunum proximal des souris Hnf1α^{-/-} et contrôles.	73
Figure 11: Modulation des taux sérologiques de ghréline totale et de ghréline active chez les souris Hnf1α^{-/-}.....	75
Figure 12 : Expression du transcrit du gène de la ghréline dans l'estomac et le pancréas des souris Hnf1α^{-/-} et contrôles.	77
Figure 13 : Modulations de la production de Gip et de son inhibiteur Dpp4 chez les souris Hnf1α^{-/-} et contrôles.	78
Figure 14 : Quantification de la Sst circulante et des niveaux d'expression du transcrit de la Sst dans le pancréas des animaux mutants et contrôles.....	80
Figure 15 : Impact de la perte de Hnf1α sur l'hormone leptine.....	81
Figure 16 : Mesure de la glycémie et de l'insuline chez les animaux Hnf1α^{-/-}.....	83
Figure 17 : Modulation de la glycémie, des taux circulants d'insuline et de GIP au cours du traitement à l'antagoniste du récepteur à la ghréline GHSR1a.	87
Figure 18 : Détermination de la prise alimentaire, de la prise de boisson et des quantités de fèces et d'urines chez les souris mutantes et contrôles.	89

Figure 19 : Suivi de la prise alimentaire, de la quantité de fèces, de la prise de boisson et du volume des urines avant et en fin de traitement à l'antagoniste du récepteur à la ghréline GHSR1a.	91
Figure 20 : Tolérance au glucose après traitement avec l'antagoniste du récepteur à la ghréline GHSR1a.	94
Figure 21 : Détermination de la glycosurie chez les souris $Hnf1\alpha^{-/-}$ avant et après traitement à l'antagoniste du récepteur à la ghréline.	96
Figure 22 : Réduction du transcrit et de la protéine $Hnf1\alpha$ par l'utilisation de shRNA dans les cellules MIN6 et impacts de la réduction de l'expression de $Hnf1\alpha$ sur les transcrits de la ghréline, de la somatostatine et de l'insuline.	99
Figure 23 : Le facteur de transcription $Hnf1\alpha$ interagit physiquement avec le promoteur du gène ghréline <i>in cellulo</i> et réprime la transcription du gène en modifiant l'état de la chromatine.	102
Figure 24 : la présence de $Hnf1\alpha$ permet la régulation de la sécrétion d'insuline par la répression de la transcription du gène ghréline.	137
Figure 25 : La perte de $Hnf1\alpha$ entraîne la dérégulation de la sécrétion d'insuline par l'absence de répression de la transcription du gène ghréline.	138
Figure 26 : Le traitement à l'antagoniste du récepteur à la ghréline GHSR1a restaure une sécrétion d'insuline adéquate pour la régulation de l'homéostasie du glucose malgré l'absence du répresseur $Hnf1\alpha$.	139

Liste des abréviations

ACTH : adrénocorticotrophine
ADN : acide désoxyribonucléique
ADP : adénosine diphosphate
AMPc : adénosine monophosphate cyclique
ATP : adénosine triphosphate
ARN : acide ribonucléique
ARNm : acide ribonucléique messenger
BMP : *bone morphogenetic protein*
BLK : *B-lymphocyte kinase*
CART : *cocaine and amphetamine-regulated transcript*
CBC : *crypt base columnar*
CBP : *CREB-binding protein*
CCK : cholécystokinine
CCPA : conseil canadien de protection des animaux
CHD : *chromodomain, helicase, DNA binding*
DCoH : *dimerization co-factor of HNF1*
Dll4 : *delta like ligand 4*
DNMTs : DNA méthyltransferases
DPP4 : dipeptidyl-peptidase-4
EGF : *epidermal growth factor*
ELISA : *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*
Fabp1 : *fatty acid binding protein 1*
ERK : *extracellular signal-regulated kinases*
EZH2 : *enhancer of zeste homolog 2*
GATA-4 : *GATA binding protein 4*
GH : *growth hormone*
GHSR1a : *growth hormone secretagogue receptor 1a*
GIP : *gastric inhibitory polypeptide*
GIPR : *glucose inhibitory polypeptide receptor*
GLP-1 : *glucagon-like peptide-1*
GLP-1R : *glucagon-like peptide 1 receptor*
GLP-2 : *glucagon-like peptide-2*
GLUT1 : *glucose transporter 1*
GLUT2 : *glucose transporter 2*
GLUT4 : *glucose transporter 4*
GOAT : *ghrelin O-acyl transferase*
G6PC : *glucose-6-phosphate transporter, catalytic subunit*
HCl : acide chlorhydrique
Hh : *Hedgehog*
HNF1 α : *hepatocyte nuclear factor 1 α*
HNF1 β : *hepatocyte nuclear factor 1 β*
HNF4 α : *hepatocyte nuclear factor 4 α*

IDE : *insuline-degrading enzyme*
 IGF1 : *insulin-like growth factor I*
 INO80 : *inositol requiring 80*
 ISWI : *imitation switch*
 JAK-STAT : *janus kinases-signal transducers and activators of transcription*
 JMJD2 : *jumonji Domain Protein 2*
 kDa : *kilodalton*
 KMD6A : *lysine (K)-specific demethylase 6A*
 KLF11 : *Krueppel-like factor 11*
 lncRNAs : *long non-coding RNAs*
 LRCs : *labeled-retained cells*
 MAPK : *mitogen-activated kinases*
 MODY : *Maturity Onset Diabetes of the Young*
 miRNAs : *microRNAs*
 mTOR : *mammalian target of rapamycin*
 NPY : *neuropeptide Y*
 OAT1 : *organic anion transporter 1*
 PABP : *poly(A)-binding protein*
 PAH : *phénylalanine hydroxylase*
 PAX4 : *paired box gene 4*
 PcG : *polycomb group*
 PCR : *polymerase chain reaction*
 PC1 : *prohormone convertase 1*
 PC2 : *prohormone convertase 2*
 PEPCK : *phosphoenolpyruvate carboxykinase*
 PDI : *protein-disulfide isomerase*
 PI3K : *phosphatidyl-inositol 3 kinase*
 POMC : *proopiomelanocortine*
 PRMTs : *peptidylarginine methyltransferases*
 PTBP : *polypyrimidine tract-binding protein*
 PYY : *peptide tyrosine tyrosine*
 qPCR : *quantitative polymerase chain reaction*
 RBPs : *RNA-binding proteins*
 SGLT1 : *sodium-glucose linked transporter 1*
 SGLT2 : *sodium-glucose linked transporter 2*
 SLC2A1 : *solute carrier 2 (facilitated glucose transporter), member1*
 SST : *somatostatine*
 SSTRs : *somatostatin receptors*
 STATs : *signal transducer and activator of transcription*
 SWI/SNF : *switching defective/sucrose nonfermenting*
 TGF : *transforming growth factor*
 TNF- α : *tumor necrosis factor alpha*
 TR : *taste receptor*
 TSH : *thyroid-stimulating hormone*
 Ucp2 : *uncoupling protein-2*
 VIP : *Vasoactive Intestinal Polypeptide*

Introduction

1 L'appareil digestif

L'alimentation apporte une grande partie de l'énergie indispensable à la vie. L'appareil digestif permet aux organismes d'effectuer la dégradation des aliments transformés en nutriments qui traverseront alors la paroi de l'intestin et seront assimilés, assurant ainsi une distribution à tout l'organisme (Bornhorst et Paul Singh, 2014). Les organes du tube digestif sont la bouche, le pharynx, l'œsophage, l'estomac, l'intestin grêle, et le côlon se terminant par l'anus. Les organes annexes sont les dents, la langue, la vésicule biliaire et un ensemble de glandes digestives que sont les glandes salivaires, le foie et le pancréas (Cheng *et al*, 2010) (Figure 1).

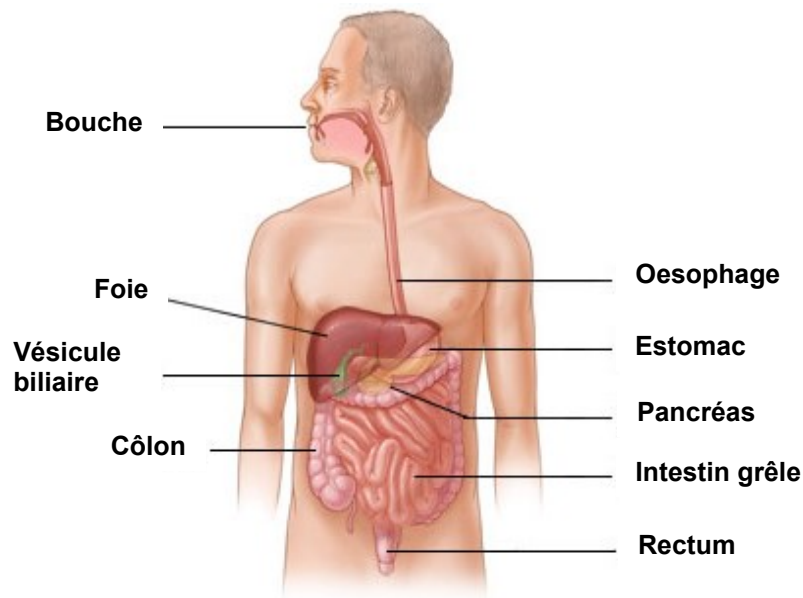


Figure 1: Schéma de l'appareil digestif. Adapté de ©2005-2014 WebMD, LLC. <http://www.webmd.com/digestive-disorders/digestive-tract-15375>, consulté le 20 décembre 2013.

1.1 Formation du tube digestif

L'organogenèse correspond au développement des organes, des systèmes. Chez les vertébrés, l'appareil digestif est constitué de plusieurs organes émanant d'un tube primitif commun. Les cellules de l'embryon qui constituent l'épiblaste sont des cellules indifférenciées, réparties en 3 groupes : l'ectoderme qui donnera la peau et le système nerveux central, le mésoderme, à partir duquel trouveront leur origine le sang, les os et les muscles, et enfin l'endoderme qui aboutira à la formation des systèmes respiratoires et digestifs (Wells et Melton, 1999). Cette répartition cellulaire intervient au cours de la gastrulation. L'endoderme est alors une monocouche de cellules qui donnera l'œsophage, les poumons, l'estomac, l'intestin grêle, le côlon et différentes glandes comme la thyroïde, le thymus, le pancréas et le foie. Chez la souris, l'organogenèse du tractus digestif débute peu après la gastrulation à 7,5 jours (E7,5) (Kiefer, 2003; Tam et Loebel, 2007). À ce moment, l'endoderme s'invagine à ses extrémités antérieures et postérieures pour prendre la forme d'une coupe (Figure 2). En moins de 24 heures, l'appareil digestif primitif consiste en un tube épithélial pluristratifié formé par différents processus morphogénétiques (Wells et Melton, 1999). Le tube digestif en tant que tel est formé au jour embryonnaire 8,5. Dès lors, on peut distinguer 3 segments : 1) l'intestin antérieur (Puri et Hebrok, 2010) qui s'étend de la membrane pharyngienne au bourgeon hépatique, 2) l'intestin moyen (*midgut*) faisant suite au précédent et se terminant à la jonction au niveau du colon transverse et 3) l'intestin postérieur (*hindgut*) s'étendant jusqu'à la membrane cloacale. Les principaux dérivés de l'intestin antérieur seront l'oreille moyenne, l'amygdale, le tractus thyroïdien, les glandes parathyroïdes, le thymus, l'appareil trachéobronchique, l'œsophage, l'estomac, le duodénum, le foie, les voies biliaires et le pancréas. Les dérivés pour l'intestin moyen seront l'intestin grêle et le colon alors que pour l'intestin postérieur, les dérivés seront le colon, le rectum et le canal anal.

Du jour embryonnaire 9 à 14,5, le tube digestif continue sa morphogénèse et l'endoderme devient alors une monocouche épithéliale reposant sur une lame basale. Au jour embryonnaire 10,5, on note l'apparition de bourgeons qui donneront naissance aux

organes (Figure 2). Les premières villosités, véritables protrusions en forme de doigt au contact de la lumière intestinale, apparaissent au niveau de l'intestin grêle au jour embryonnaire 14,5 en parallèle de la cytodifférenciation des organes (Figure 2) (Gregorieff et Clevers, 2005).

Les raisons selon lesquelles l'endoderme peut donner les différents types cellulaires des tractus digestifs et respiratoires ne sont pas encore élucidées. Il est possible que des cellules pluripotentes de l'endoderme, des cellules souches, reçoivent des signaux intercellulaires : *bone morphogenetic protein* (BMP), Notch, *transforming growth factor* (TGF), *Hedgehog* (Hh) et Wnt (Gregorieff et Clevers, 2005).

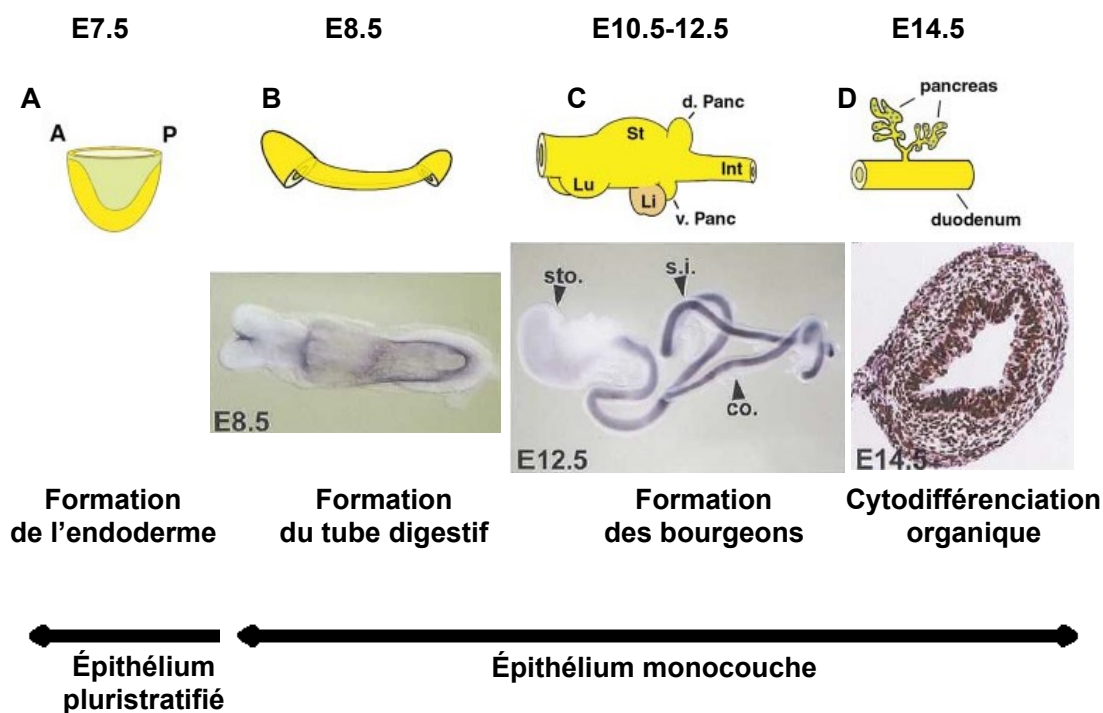


Figure 2: Étapes du développement de l'endoderme. Adapté de (Gregorieff et Clevers, 2005; Wells et Melton, 1999) après obtention de l'autorisation par l'éditeur.

A : Formation de l'endoderme, B : Formation du tube digestif, C : Formation des bourgeons donnant les organes, D : Cytodifférenciation organique.

(A : antérieur ; P : postérieur ; Lu : poumon ; St : estomac ; Li : foie ; Int : intestin ; d. Panc : bourgeon pancréatique dorsal ; v. Panc : bourgeon pancréatique ventral)

1.2 Le pancréas

Le pancréas est un organe abdominal situé en-dessous de l'estomac. Le pancréas provient de deux bourgeons aux jours embryonnaires 9,5-10 chez la souris, l'un dorsal et l'autre ventral (Jensen, 2004). Il est formé de deux glandes provenant de deux populations cellulaires fonctionnellement et morphologiquement distinctes dérivant de l'endoderme.

La portion exocrine du pancréas, représentant plus de 90% du pancréas (Puri et Hebrok, 2010; Slack, 1995), est constituée de deux types cellulaires : les cellules acinaires et les cellules ductales ou canalaire. Les cellules acinaires sont chargées de la sécrétion du suc pancréatique constitué d'enzymes. Ce suc pancréatique se déverse dans le duodénum et est indispensable à la digestion des lipides, des protéines et des hydrates de carbone en nutriments. Les cellules ductales formeront un réseau de canaux permettant le transport des sécrétions acineuses. Ces cellules canalaire vont aussi sécréter du bicarbonate qui permettra de tamponner le pH favorisant une activité enzymatique optimale (Shih *et al*, 2013).

La portion endocrine ne représente que de 2 à 4 % de la masse du pancréas. L'unité fonctionnelle de cette portion est représentée par les îlots de Langerhans, portant le nom de celui qui la découvrit, Paul Langerhans (Dittrich et Hahn von Dorsche, 1978; Merkwitz *et al*, 2013). Ces îlots sont dispersés dans le parenchyme exocrine. On retrouve au sein de ces îlots pancréatiques plusieurs types cellulaires comprenant les cellules β produisant l'insuline, les cellules α produisant le glucagon, les cellules δ produisant la somatostatine, les cellules PP produisant le polypeptide pancréatique. Un cinquième type cellulaire controversé serait également présent, il s'agit des cellules ϵ produisant la ghréline (Andralojc *et al*, 2009; Wierup *et al*, 2002; Wierup *et al*, 2004).

1.3 L'épithélium intestinal

1.3.1 L'axe crypte-villosité

Dès la naissance, on assiste à la formation d'invaginations de l'épithélium appelées cryptes de Lieberkühn. Ce compartiment prolifératif est nécessaire au renouvellement de l'épithélium intestinal qui varie de 3 à 5 jours. La villosité, quant à elle, sera définie comme le compartiment différencié, permettant d'accomplir les différentes fonctions de l'intestin soient, la digestion et l'absorption des nutriments, l'absorption de l'eau et la fonction de barrière contre les pathogènes. L'axe crypte-villosité regroupera ces 2 unités fonctionnelles que sont la crypte et la villosité (Crosnier *et al*, 2006; van der Flier et Clevers, 2009).

1.3.2 Les différents types cellulaires

L'épithélium intestinal se compose d'une monocouche de cellules qui constitue la plus grande et la plus importante barrière protégeant l'organisme de l'environnement externe (De Mey et Freund, 2013; Groschwitz et Hogan, 2009; Peterson et Artis, 2014). Il agit comme une barrière sélective perméable permettant l'absorption des nutriments, des électrolytes et de l'eau, tout en maintenant une défense efficace contre les toxines, les antigènes et la flore entérique contenus dans la lumière intestinale. L'épithélium maintient les propriétés de cette barrière sélective par l'intermédiaire de complexes protéine-protéine qui relient physiquement les cellules adjacentes. Le réseau de protéines connectant les cellules épithéliales forment 3 complexes d'adhésion : les jonctions adhérentes, les jonctions serrées et les desmosomes (Anderson et Van Itallie, 2009; Fanning *et al*, 2012; Nekrasova et Green, 2013; Peterson et Artis, 2014). Ces complexes sont constitués de protéines transmembranaires qui interagissent entre deux cellules adjacentes et qui sont reliées au cytosquelette (Groschwitz et Hogan, 2009).

La crypte renferme les cellules souches intestinales pluripotentes, localisées au niveau de la base de la crypte de Lieberkühn. Chaque crypte renfermerait de 4 à 6 cellules souches. Ces cellules souches vont se diviser et fourniront les cellules progénitrices, toujours dans le compartiment prolifératif (Figure 3) (Barker *et al*, 2008). Actuellement, deux modèles visant à identifier la nature des cellules souches responsables du renouvellement épithélial sont discutés au sein de la communauté scientifique. Le premier modèle affirme que les cellules souches seraient localisées à la position +4; on parle alors de cellules LRCs pour *labeled-retained cells* (Potten, 1977). Ce modèle suggère que tous les types cellulaires proviendraient des LRCs. La littérature actuelle ne permet pas de renseigner la nature de la descendance des LRCs en raison du manque de marqueurs cellulaires spécifiques. Par conséquent, le rôle de ces LRCs comme cellules souches servant au renouvellement de l'épithélium demeure incertain. Le deuxième modèle proposé soutient le rôle des cellules situées dans le fond de la crypte, soit le modèle CBC pour *crypt base columnar* originalement supporté par Leblond (Bjerknes et Cheng, 1999; Bjerknes et Cheng, 2002; Cheng et Leblond, 1974). Ces cellules sont situées dans le fond des cryptes et entourées en alternance par les cellules de Paneth (Bjerknes et Cheng, 2002; Cheng et Leblond, 1974). Des études révèlent que les cellules CBC se trouvent dans un environnement qui est propice à leur auto-renouvellement ainsi qu'à l'émission de cellules progénitrices. Au fil de la migration ascendante le long de la crypte, les cellules progénitrices ainsi produites seront sujettes à une succession rapide de modifications résultantes de l'action de divers régulateurs impliqués dans les processus de différenciation cellulaire. Une fois dans la villosité, les cellules épithéliales seront alors différenciées. Les cellules souches seront ainsi responsables de produire les 4 types majeurs de cellules différenciés de l'épithélium de l'intestin grêle soient, les cellules absorbantes, les cellules entéroendocrines, les cellules de Paneth et les cellules caliciformes (Figure 3). Trois jours après leur différenciation, les cellules subiront l'apoptose au niveau de l'apex de la villosité et seront éliminées dans la lumière intestinale (Crosnier *et al*, 2006; van der Flier et Clevers, 2009).

Les entérocytes ou cellules absorbantes représentent la majorité des cellules de l'épithélium intestinal, soit environ 80% des cellules épithéliales (Figure 3). Ces cellules

sont polarisées avec, à leur pôle apical, une bordure en brosse permettant l'absorption et le transport des nutriments.

Les cellules de Paneth sont les seules cellules différenciées de la crypte. Une fois leur processus de détermination achevé, celles-ci redescendent se positionner dans le fond de la crypte où elles terminent leur maturation (Figure 3). Ces cellules jouent un rôle au niveau de l'immunité innée. Ce sont des cellules sécrétrices contenant dans leurs granules du lysozyme, des cryptidines/défensines et des protéines antimicrobiennes (Bjerknes et Cheng, 1981). Par ailleurs, les cellules de Paneth pleinement différenciées entourent les cellules CBCs exprimant *Lgr5* dans le fond des cryptes. Les cellules de Paneth produisent également de l'EGF, du TGF- α , du Wnt3 et le ligand Dll4 de la voie Notch qui sont tous essentiels pour le maintien des cellules souches en culture.

Les cellules caliciformes sont des cellules sécrétoires libérant un mucus dans la lumière intestinale et nécessaire au mouvement du contenu alimentaire. Ce mucus protège des stress physiques et chimiques. Ces cellules possèdent un large pôle apical contenant le cytoplasme (Figure 3). La proportion de cellules caliciformes augmente du duodénum (4%) à l'iléon (16%), pour atteindre près de 50% dans l'épithélium colique (Karam, 1999; Noah *et al*, 2011).

Les cellules entéroendocrines sont elles aussi des cellules de la lignée sécrétoire (Figures 3 et 4). Elles sont présentes de l'estomac au côlon et sont spécialisées dans la sécrétion d'hormones jouant différentes fonctions au niveau intestinal, mais aussi systémique et métabolique. Ces cellules sont dispersées au niveau de l'épithélium et représentent seulement 1% des cellules épithéliales intestinales. Néanmoins, les cellules entéroendocrines constituent le plus grand système endocrinien de l'organisme (Schonhoff *et al*, 2004). Les cellules, tout le long du tractus gastro-intestinal, reçoivent des informations sous différentes formes incluant des messagers chimiques provenant d'autres cellules. L'ingestion de nourriture est le stimulus initial pour activer la sécrétion d'hormones. Les aliments vont fournir une information à l'organisme par la pensée, la sensation de faim, la satiété et la vue, par l'intermédiaire du système nerveux central. Le

goût et l'odeur entraînent une stimulation chimique. Les différents composants nutritifs sont ainsi perçus par les cellules épithéliales et il y a également stimulation mécanique pour assurer la progression du bol alimentaire. Toutes ces stimulations vont entraîner la libération de peptides et d'hormones par les cellules entéroendocrines de la muqueuse soit dans l'espace proche pour une action locale, soit dans le sang pour une action à distance (Farre et Tack, 2013; Schonhoff *et al*, 2004).

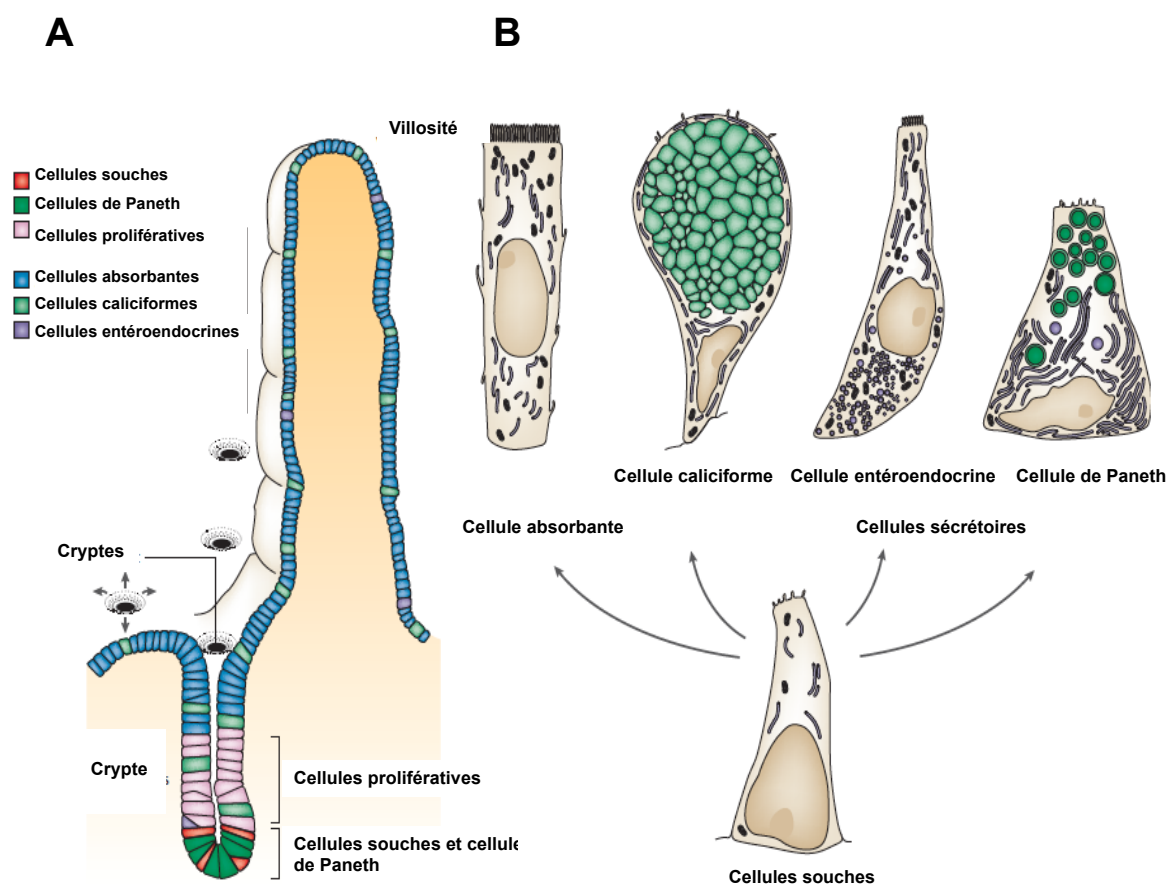


Figure 3: Les différents types de cellules épithéliales intestinales. A : Représentation schématique de la répartition des cellules épithéliales intestinales le long de l'axe crypte/villosité. Au niveau du côlon. Il n'y a pas de villosité mais l'organisation des cellules reste similaire. B : Représentation schématique des différents types de cellules

épithéliales intestinales. Adapté de (Crosnier *et al*, 2006) après obtention de l'autorisation par l'éditeur.

Ainsi les messagers chimiques du tractus gastro-intestinal peuvent avoir des effets sur l'ensemble de l'organisme. Ces messagers sont appelés hormones. Ce sont des molécules sécrétées par une glande ou une cellule, véhiculées par le sang, et qui agissent sur des cellules cibles spécifiques (Figure 4). Si l'hormone agit directement sur la cellule qui la synthétise, on parlera d'action autocrine. Si elle agit localement, dans le liquide extracellulaire au voisinage de la cellule qui la produit, on parle d'une action paracrine. Dans le cas où l'hormone agit à distance, transportée par le sang, ce qui se produit dans la majorité des cas, on aura une action endocrine. Il existe 15 à 19 types d'hormones gastro-intestinales (Hocker et Wiedenmann, 1998). Parmi elles se trouve la gastrine sécrétée par les cellules G de l'antra gastrique. Cette hormone stimule la sécrétion acide de l'estomac (Chu et Schubert, 2012). La ghréline est une hormone produite par l'estomac, l'intestin et le pancréas, qui joue un rôle sur la sécrétion de l'hormone de croissance, le contrôle de la prise alimentaire et le métabolisme énergétique (Andralojc *et al*, 2009; Granata et Ghigo, 2013; Kojima et Kangawa, 2005). Le *gastric inhibitory polypeptide* (GIP) est produit par les cellules K du duodénum et du jéjunum. Celui-ci stimule la sécrétion d'insuline et inhibe la sécrétion de HCl par l'estomac (Kim et Egan, 2008; Martinez-Rodriguez et Gil, 2012). On trouve également le *glucagon-like peptide-1* (GLP-1) qui est produit par les cellules L de l'iléon et du côlon et qui stimule la sécrétion d'insuline (Martinez-Rodriguez et Gil, 2012). Le *glucagon-like peptide-2* (GLP-2) est produit par ces mêmes cellules mais intervient dans la prolifération et la croissance cellulaire des cellules intestinales ainsi que la régulation de l'appétit (Baldassano *et al*, 2012; Janssen *et al*, 2013). La glicentine et l'oxyntomoduline, autrefois regroupées sous le terme d'entéroglucagon, proviennent du clivage du proglucagon dans l'intestin grêle. Les actions de la glicentine sont encore méconnues et peu étudiées mais elle stimulerait la sécrétion d'insuline et diminuerait l'acidité gastrique alors que l'oxyntomoduline jouerait un rôle sur la sécrétion d'insuline comme GLP-1, mais de manière moins importante (Holst, 1997). La motiline est une hormone produite par le duodénum qui favorise la vidange gastrique en fonction du pH (Deloose *et al*, 2012). Le peptide tyrosine tyrosine PYY est produit au niveau de l'iléon et

du côlon et joue un rôle dans la réduction de l'appétit (Holzer *et al*, 2012; Lancha *et al*, 2012). La sécrétine est une hormone intestinale produite par les cellules S au niveau du duodénum et active essentiellement la sécrétion des enzymes pancréatiques et de bicarbonates pour neutraliser l'acidité gastrique (Sekar et Chow, 2013). La cholécystokinine, ou CCK, est produite par le duodénum et libérée dans le sang lors de l'arrivée du bol alimentaire. La CCK stimule fortement la sécrétion d'enzymes pancréatiques, la contraction de la vésicule biliaire et agit comme une hormone anorexigénique (Cote *et al*, 2014; Simpson *et al*, 2012). La leptine est également une hormone produite par le tube digestif. En plus de sa production par les adipocytes, des études relatent sa production par l'estomac (Bado *et al*, 1998; Yarandi *et al*, 2011). Cette hormone est impliquée dans la satiété. Le peptide vasoactif intestinal VIP possède un rôle sur l'activité vasculaire intestinale et permet notamment la relaxation des couches musculaires qui composent l'intestin et la sécrétion d'eau et d'électrolytes (Delgado et Ganea, 2013; Fahrenkrug, 2010). On peut trouver également une monoamine produite par les cellules entérochromaffines de l'antra gastrique et du duodénum essentiellement, la sérotonine. Celle-ci peut agir sur la motilité intestinale. Au niveau du cerveau elle participe à la thermorégulation, agit sur les comportements alimentaires et sexuels, le contrôle moteur, les rythmes circadiens et l'anxiété (Gershon, 2013; Hale *et al*, 2013; Myers, 1981). La neurotensine est produite par les cellules N du jéjunum à l'iléon. Au niveau du cerveau, la neurotensine joue un rôle sur l'hypothermie et sur les voies cholinergiques et dopaminergiques. Elle stimule les sécrétions pancréatiques et biliaires, inhibe la sécrétion acide de l'estomac et stimule la motilité du côlon. La neurotensine joue aussi un rôle sur la libération de prolactine, de thyrotropine, d'hormone lutéinisante et d'hormone de croissance (Tableau 1) (Mustain *et al*, 2011).

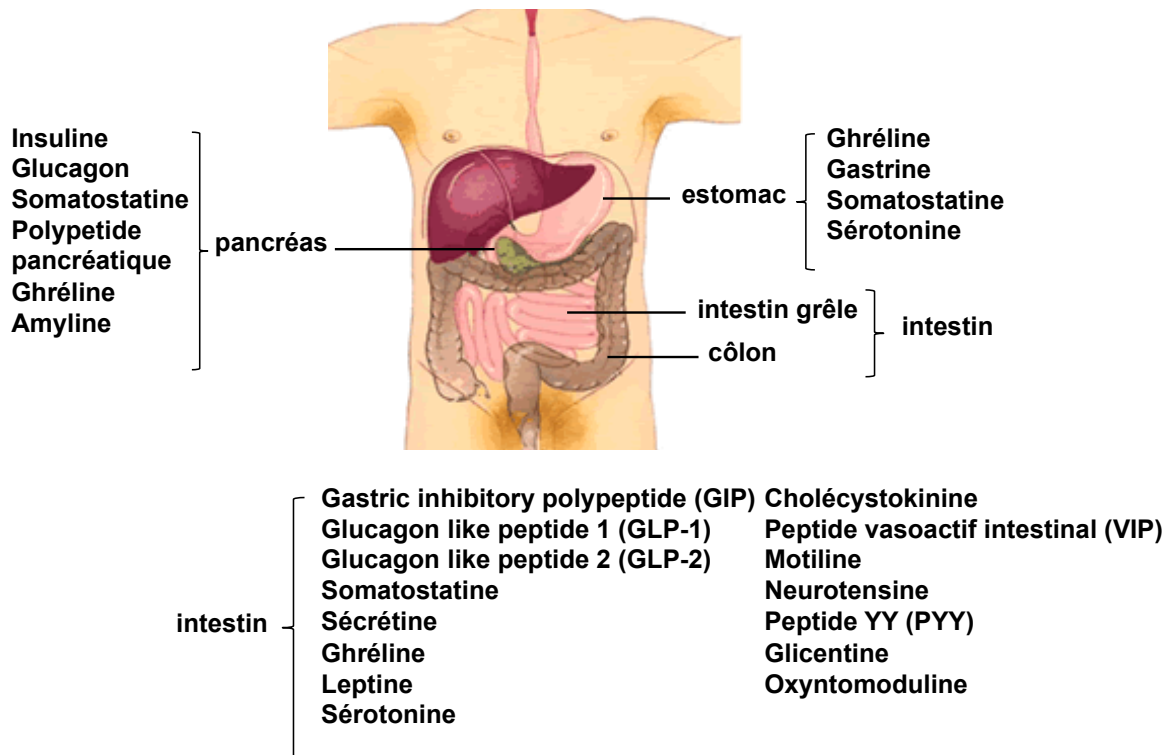


Figure 4: Production des hormones gastro-intestinales chez l'humain. Adapté de doctissimo.fr (<http://www.doctissimo.fr/html/sante/atlas/niv2/appareil-digestif.htm> consulté le 29 juillet 2013).

Hormones	Provenance	Régulation de la sécrétion	Rôles
Gastrine	Cellules G: antre gastrique	↑distension de l'estomac, acides aminés, stimulation du nerf vagal ↓acidité	↑la motilité, les sécrétions acides
Ghréline	Cellules P/D1: estomac, intestin, pancréas	↑jeûne, faible concentration en glucose	↑sécrétion l'hormone de croissance, l'appétit ↓sécrétion insuline
GIP	Cellules K: duodénum, jéjunum	↑glucose, acides gras, acides aminés	↑sécrétion d'insuline ↓acidité
GLP-1	Cellules L: iléon, côlon	↑macronutriments, glucose ↓somatostatine, restriction calorique	↑satiété, sécrétion d'insuline
GLP-2	Cellules L: iléon, côlon	↑macronutriments, glucose	↑prolifération, croissance cellulaire ↑satiété,
Glicentine	Cellules L: iléon, côlon	↑macronutriments, glucose	↑sécrétion d'insuline ↓acidité
Oxyntomoduline	Cellules L: iléon, côlon	↑macronutriments	↑satiété
Motiline	Intestin grêle	↑jeûne	↑ la motilité
PYY	Iléon, côlon	↑macronutriments, exercice	↑satiété, dépense énergétique
Sécrétine	Cellules S: duodénum	↑acidité, acides gras	↑ HCO_3^- ↓acidité, sécrétions biliaires
CCK	Cellules I: Duodénum	↑acides aminés, acides gras	↑sécrétion enzymes, contraction vésicule biliaire ↓motilité
Leptine	Tissu adipeux, estomac	↑suralimentation, insuline, glucose ↓jeûne, somatostatine, froid	↑satiété, GLP-1 ↓sécrétion d'insuline
VIP	Ganglions parasymphatiques, Intestin, pancréas	↑distension de l'estomac, stimulation vagale	↑motilité
Sérotonine	cellules entérochromaffines, antre gastrique,	↑distension de l'estomac	↑contraction de l'estomac, motilité
Neurotensine	Cellules N: jéjunum, iléon	↑acidité	↑sécrétions pancréatiques et biliaires, motilité du côlon
Somatostatine	Cellules δ : pancréas, muqueuse intestinale	↑acidité ↓stimulation vagale	↓acidité, sécrétion enzymes, HCO_3^- , pepsinogène, insuline, glucagon

Tableau 1 : Les hormones gastro-intestinales, leurs sécrétions et leurs rôles.

2 La transcription des gènes et la protéine HNF1 α

2.1 La transcription des gènes et la chromatine

On peut définir un facteur de transcription comme une protéine nécessaire à la régulation de la transcription. Ces protéines sont capables d'interagir avec l'ADN de manière séquence spécifique grâce à un domaine de liaison à l'ADN qui reconnaîtra directement des séquences cis-régulatrices sur les régions promotrices des gènes. Néanmoins, l'action des facteurs de transcription peut également avoir lieu sans impliquer de liaison directe à l'ADN. Les facteurs de transcription agissent de manière combinée en interagissant avec d'autres facteurs comme des coactivateurs, des corépresseurs, des agents pouvant modeler la chromatine, des histones acétylases, des histones désacétylases, des méthylases, pour activer ou réprimer la transcription de gènes. Ces protéines possèdent également un domaine de transactivation.

L'ADN génomique est structuré en une chromatine ordonnée dans le noyau des cellules eucaryotes. L'ADN est enroulé autour de complexes protéiques formant les nucléosomes. Le nucléosome est un octamère constitué de deux molécules d'histone H2A, H2B, H3 et H4. Les histones sont des protéines spécialisées dans la compaction de l'ADN. Chaque nucléosome permet l'enroulement de 147 paires de bases d'ADN autour de lui-même (Clapier et Cairns, 2009; Swygart et Peterson, 2014b). Les résidus d'histones chargés positivement sont connectés avec les groupements phosphates de la molécule d'ADN. La chromatine peut se présenter sous forme d'euchromatine, correspondant à la forme décondensée et active de la chromatine permettant ainsi l'expression génique par l'accès de la machinerie transcriptionnelle. L'autre forme de chromatine est l'hétérochromatine qui correspond à la forme compacte et inactive de la chromatine. La chromatine sera ainsi la cible de remodelages permettant la régulation de la transcription, la ségrégation des chromosomes, la réplication de l'ADN et sa réparation. Des remodeleurs de la chromatine agiront alors pour assembler et mettre en place les nucléosomes, les repositionner, les éjecter de la chromatine, assurer l'accessibilité des éléments *cis* et ajouter des variants d'histone comme H2AZ (Coleman-Derr et Zilberman, 2012; Eriksson *et al*,

2012). Quatre familles de remodeleurs de la chromatine, conservées de la levure à l'homme, ont été identifiées : SWI/SNF (*switching defective/sucrose nonfermenting*), ISWI (*imitation switch*), CHD (*chromodomain, helicase, DNA binding*) et INO80 (*inositol requiring 80*) (Erdel *et al*, 2011; Euskirchen *et al*, 2012; Falbo et Shen, 2012; Petty et Pillus, 2013; Stanley *et al*, 2013). Ces 4 familles de remodeleurs utilisent l'hydrolyse de l'ATP pour altérer les contacts histone-ADN.

La méthylation des histones joue un rôle important dans la régulation de l'expression des gènes (Liu *et al*, 2014). Cette modification épigénétique peut avoir lieu sur les résidus arginine ou lysine (Bedford et Clarke, 2009; Martin et Zhang, 2005). Chez les mammifères, la méthylation des arginines des histones est retrouvée sur les résidus 2, 8, 17 et 26 de l'histone H3 (H3R2, H3R8, H3R17 et H3R26) ainsi que sur le résidu 3 de l'histone H4 (H4R3) (Guo *et al*, 2013; Sengoku et Yokoyama, 2011; Zhang et Reinberg, 2001). Les arginines peuvent être méthylées une à deux fois par les *peptidylarginine methyltransferases* (PRMTs) (Bedford, 2007; Cha et Jho, 2012). La méthylation sur les résidus arginine peut avoir un rôle activateur ou répresseur de la transcription des gènes. La méthylation des histones sur les résidus lysine peut également influencer la régulation des gènes. Plus particulièrement, les méthylations d'histones H3K4, H3K36 et H3K79 sont associées à des régions actives de la chromatine, permettant le recrutement de la machinerie transcriptionnelle, alors que les méthylations H3K9, H3K27 et H4K20 seront associées à des régions de chromatine condensée donc favorisant la répression des gènes (Everitts *et al*, 2013; Klose et Zhang, 2007). La méthylation des lysines sera permise par l'action de lysine méthyltransférases et les résidus pourront alors être mono-, di- ou triméthylés. Ces méthylations sur les résidus arginines et lysines pourront être enlevées par l'action de déméthylases telles que *jumonji Domain Protein 2* (JMJD2) (Krishnan et Trievel, 2013; Whetstine *et al*, 2006). Les enzymes histones déméthylases des classes *lysine-specific histone demethylase 1* (LSD1) et *jumonji C* (JmjC) ont été identifiées pour retirer les méthylations H3K4, H3K9 et H3K36 (Rudolph *et al*, 2013; Shi et Tsukada, 2013). Chez les mammifères, la méthylation en H3K27 est associée à une répression de la transcription des gènes par les PcG (*polycomb group*). La protéine *enhancer of zeste homolog 2* (EZH2) du PcG complexe 2 et 3 (PRC2 et PRC3) ajoute des groupements méthyls à la lysine 27 de

l'histone H3 (Taghavi et van Lohuizen, 2006; Xiao, 2011). Il a été démontré également que cette protéine EZH2 interagit avec des ADN méthyltransférases (DNMTs) qui méthylent à leur tour l'ADN (Jeltsch et Jurkowska, 2014; Vire *et al*, 2006). Le recrutement de complexes répresseurs comme PRC1, d'histones déacétylases, et de remodeleurs de la chromatine comme SWI/SNF est également possible (Cao *et al*, 2002; Laugesen et Helin, 2014; Taghavi et van Lohuizen, 2006). La déméthylation H3K27 serait assurée par la famille de protéines *lysine (K)-specific demethylase 6A* (KMD6A).

2.2 Le facteur de transcription HNF1 α

HNF1 α , pour *Hepatocyte Nuclear Factor 1 α* aussi appelé TCF1, LF-B1 et MODY3, est une protéine à homéodomaine qui fut découverte à la fin des années 1980 (Baumhueter *et al*, 1990; Courtois *et al*, 1987; Tronche et Yaniv, 1992). Ce facteur de transcription est très conservé chez les vertébrés avec notamment 94% d'homologie entre les protéines de l'homme et du rat (Bach *et al.*, 1991). Cette protéine est exprimée dans le foie, les reins, l'estomac, le pancréas et l'intestin (Baumhueter *et al*, 1990; Blumenfeld *et al*, 1991). HNF1 α est codée par un gène de 23 kb comprenant 10 exons chez l'homme. La protéine est composée de 3 domaines majeurs.

HNF1 α est une protéine à homéodomaine. Un homéodomaine est un motif peptidique composé de 60 acides aminés codés par 180 paires de bases composant l'homéoboîte. Les protéines à homéodomaine sont fortement conservées au cours de l'évolution avec un degré de conservation de l'ordre de 90%. La structure se compose de trois hélices alpha se repliant autour d'un cœur hydrophobe, on parlera de motif hélice-tour-hélice (HTH). C'est grâce à ce motif que se fera l'interaction avec la molécule d'ADN. Cette partie s'insère dans le petit sillon de la double hélice de l'ADN et contribue à ouvrir celle-ci et ainsi permettre la transcription. Pour ce qui est de la structure de HNF1 α celle-ci a été déterminée par des essais de complémentation *in vitro*, en amino-terminal, on trouve un domaine de dimérisation composé de 33 acides aminés, suivi d'un domaine de liaison à l'ADN qui lie une séquence palindromique consensus GTTAATnATTAAC, et enfin en carboxy-terminal un domaine de transactivation (Figure 5) (Nicosia *et al*, 1990; Ryffel,

2001). HNF1 α peut s'homodimériser ou s'hétérodimériser avec HNF1 β (encore appelé LF-B3) qui a la même distribution tissulaire que HNF1 α , à l'exception de sa présence dans les poumons (Bach *et al*, 1992; Chouard *et al*, 1990; Rey-Campos *et al*, 1991). Néanmoins, HNF1 α semble être un meilleur transactivateur quand il est sous forme d'homodimère que lorsqu'il s'hétérodimérise avec HNF1 β (Mendel *et al*, 1991a). Une fois lié à l'ADN, HNF1 α pourra agir en synergie avec d'autres facteurs tels que CBP, p300, GATA-4, GATA-5, CDX-2 (Boudreau *et al*, 2002; Dohda *et al*, 2004; van Ooij *et al*, 1992; van Wering *et al*, 2002).

Il existe, par ailleurs, un cofacteur stabilisant la dimérisation de HNF1 α et HNF1 β nommé DCoH (Rho *et al*, 2010). Ce dernier se fixe sur l'extrémité amino-terminale des protéines, le domaine de dimérisation, et augmente le caractère transactivateur du complexe (Mendel *et al*, 1991b; Rho *et al*, 2010). Chez la souris, HNF1 α est exprimé dès le jour embryonnaire 10,5 dans l'endoderme du sac vitellin et au jour embryonnaire 11,5 dans l'endoderme intestinal. Au niveau de l'épithélium intestinal, son expression est perdue à la naissance puis retrouvée au moment du sevrage des souriceaux vers le 17^{ième} jour de vie post-natale (Boudreau *et al*, 2002).



Figure 5 : Structure de HNF1 α . Représentation schématique de la protéine HNF1 α humaine. Adapté de (Ryffel, 2001).

3 Rôles cellulaires de HNF1 α

Le facteur de transcription HNF1 α régule des gènes au sein de plusieurs tissus. Les sections suivantes feront état des fonctions connues pour HNF1 α dans un contexte tissus-spécifique.

3.1 Le foie

Les premières études montrant l'implication de HNF1 α dans la régulation transcriptionnelle des gènes remontent à la fin des années 80 et début des années 1990, avec la régulation de l' α 1-antitrypsine et du β -fibrinogène (Courtois *et al*, 1987; Tronche et Yaniv, 1992). Dès lors, la communauté scientifique a continué à répertorier les cibles potentielles de ce facteur de transcription dans le foie incluant l'albumine en collaborant notamment avec les coactivateurs CBP et p300 (Dohda *et al*, 2004), l' α -fétoprotéine, la transthyrétine (Courtois *et al*, 1988; Rollier *et al*, 1993), l'apolipoprotéine B (Brooks et Levy-Wilson, 1992), le CYP2E1 (Liu et Gonzalez, 1995), l'*insulin-like growth factor* I (IGF1) (Nolten *et al*, 1995) et la glucose-6-phosphatase (Lin *et al*, 1997). Il a également été démontré que HNF1 α pouvait interagir avec des coactivateurs, comme ceux des familles C/EBP et CDX, afin de transactiver le gène *Fatty acid binding protein 1* (Fabp1) (Staloch *et al*, 2005). HNF1 α interagit avec CDX2 pour activer le gène de la cadhérine-17 (Zhu *et al*, 2010) ou encore avec SP1 pour activer le gène du cotransporteur sodium-glucose SGLT1 (*sodium-glucose linked transporter 1*) (Kekuda *et al*, 2008). Chez les patients atteints de mutations au niveau du gène *HNF1A*, des cas d'adénomes hépatiques ont été répertoriés (Lerario *et al*, 2010). Récemment une étude a révélé le rôle de HNF1 α sur la régulation de microRNA-194 qui a son tour régulera l'expression de Frizzled-6 (Krutzfeldt *et al*, 2012).

L'équipe du Professeur Pontoglio a généré une souris Hnf1 α ^{-/-} par recombinaison homologue permettant de supprimer les 108 premiers acides aminés correspondant au domaine de dimérisation en entier et une partie du domaine de liaison à l'ADN de la protéine. Ces souris présentent un dysfonctionnement hépatique. Une organomégalie du

foie a été répertoriée. Des analyses biochimiques révèlent une hypercholestérolémie et hyperphénylalaninémie. La phénylalanine est un acide aminé essentiel et sa conversion par hydroxylation en tyrosine est essentielle. Cette hydroxylation nécessite la phénylalanine hydroxylase (PAH) produite par le foie. Les souris $Hnf1\alpha^{-/-}$ présentent des niveaux d'expression de PAH indétectables et une accumulation de phénylalanine dans le plasma. La perte de $Hnf1\alpha$ entraîne un remodelage de la chromatine au niveau du promoteur du gène de la PAH par méthylation (Pontoglio *et al*, 1997).

L'autre modèle murin disponible a été établi par l'équipe du Professeur Gonzalez, modèle dont notre laboratoire dispose. Cette souris a été obtenue par recombinaison homologue permettant la délétion du premier exon codant pour 108 acides aminés de la région N-terminale de la protéine et de la portion 5' du premier intron. Chez ces souris mutantes, on note également une organomégalie hépatique de l'ordre de 50% par rapport aux animaux contrôles. Des analyses biochimiques confortent ce dysfonctionnement hépatique avec une augmentation importante de certaines enzymes hépatiques dans le sérum des souris $Hnf1\alpha^{-/-}$, telles que l'aspartate aminotransférase et l'alanine aminotransférase. Les hépatocytes présentent également une hypertrophie à 5 semaines de vie postnatale, suivi d'une dégénération à 12 semaines. Les hépatocytes présentent de grosses vacuoles et sont gorgés de glycogène (Lee *et al*, 1998).

3.2 Les reins

$HNF1\alpha$ est impliqué dans la régulation du gène codant pour la phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) (Cassuto *et al*, 1997). On retrouvera aussi un rôle de $HNF1\alpha$ dans la régulation des gènes codant pour la transkétolase-like 1, l'alphagalactosidase, la kératine 19 (Senkel *et al*, 2005), l'UDP-glucuronosyltransferase 1A3 et 1A4 (Gardner-Stephen et Mackenzie, 2007). D'autres études révèlent que $HNF1\alpha$ transactive les gènes codant pour OAT1 (*organic anion transporter 1*), le cotransporteur SGLT2 (Freitas *et al*, 2008) ou encore un transporteur anionique (Saji *et al*, 2008), soit l'échangeur de chlore/proton ClC-5 (Tanaka *et al*, 2010).

Au niveau des reins, les souris $Hnf1\alpha^{-/-}$ générées par l'équipe de Pontoglio souffrent d'une réduction importante de la réabsorption de certains métabolites comme l'arginine, le phosphate et le glucose. Ces souris présentent une polyurie et une polydipsie, symptômes retrouvés chez les patients atteints de diabète de type 2 (Pontoglio *et al*, 1996; Pontoglio *et al*, 2000; Pontoglio *et al*, 1998). Les niveaux d'expression du cotransporteur de glucose SGLT2 sont diminués chez les souris mutantes (Pontoglio *et al*, 2000). Selon ce même groupe, les souris seraient sujettes au Syndrome de Fanconi qui est une pathologie rénale se caractérisant par un dysfonctionnement de la fonction tubulaire proximale rénale et par un défaut de réabsorption entraînant une polyurie, une glycosurie, une fuite de phosphates, de citrates et d'acides aminés (Pontoglio *et al*, 1996).

Dans le modèle murin mis au point par l'équipe de Gonzalez, les animaux $Hnf1\alpha^{-/-}$ développent une hyperglycémie 2 semaines après la naissance et celle-ci est maintenue dans le temps. De plus, la glycosurie est, elle aussi, augmentée de manière importante. Ces souris mutantes ne présentent pas de dysfonctionnement rénal tel que révélé par les analyses biochimiques et histologiques (Lee *et al*, 1998).

3.3 Le pancréas

Le facteur de transcription HNF1 α peut réguler les gènes en recrutant un coactivateur comme p300 sur le promoteur du gène codant pour GLUT2 (*glucose transporter 2*) (Ban *et al*, 2002). Il a également été démontré que HNF1 α intervenait dans la croissance des cellules β pancréatiques en régulant l'IGF-1 dans les cellules INS-1 (Yang *et al*, 2002). Une étude datant du début des années 1990 relate que la protéine Hnf1 α pouvait être produite dans les cellules HIT de hamster et que ce facteur de transcription pouvait alors transactiver le gène de rat *Insulin 1* (Emens *et al*, 1992). La suppression du facteur de transcription dans la lignée INS-1 amène également une diminution de la transcription du gène *Ins1* (Wang *et al*, 1998). La surexpression d'un mutant dominant-négatif de HNF1 α dans les cellules β pancréatiques modifie l'architecture des îlots, diminue l'expression de la E-cadhérine, réduit la prolifération des cellules et entraîne l'apparition du

diabète (Yamagata *et al*, 2002). HNF1 α et Neurogenine 3 peuvent également coopérer pour transactiver le gène *Pax4* (Smith *et al*, 2003). Il a également été démontré que HNF1 α pouvait réguler négativement le gène codant pour l'hormone pancréatique amyline (Green *et al*, 2003).

Au niveau pancréatique, les patients présentant des mutations du gène *HNF1 α* , les patients MODY3, sont caractérisés par un défaut de sécrétion d'insuline. Dans le cas des souris Hnf1 $\alpha^{-/-}$, on retrouve également ce problème de sécrétion d'insuline. Des analyses par buvardage de type Northern ont démontré la présence du transcrit *Ins1* chez les animaux mutants laissant supposer que cette hormone est tout de même produite. Cette donnée n'est pas quantitative et ne permettait pas de voir si les niveaux d'expression du transcrit correspondant étaient clairement modulés. *In situ*, des pancréas de souris mutantes perfusés avec du glucose montrent une altération de la réponse insulinique en présence de ce sucre (Pontoglio *et al*, 1998). Cependant, chez les souris Hnf1 $\alpha^{-/-}$, une dépolarisation de la membrane des cellules β pancréatiques, avec du KCL, permet la libération d'insuline en quantité comparable aux animaux contrôles renforçant ainsi le fait que ces cellules peuvent toujours produire de l'insuline et que l'hyperglycémie serait bien due à un défaut de sécrétion de l'insuline (Dukes *et al*, 1998).

Dans le modèle d'étude établi par l'équipe de Gonzalez, les niveaux d'insuline des souris Hnf1 $\alpha^{-/-}$ sont détectables mais diminués d'environ 40% en comparaison aux souris contrôles. Ces souris ayant subi un test de tolérance à l'insuline ne sont pas résistantes à l'insuline et il est intéressant de remarquer que les souris mutantes présentent une meilleure réponse au traitement à l'insuline que les souris contrôles ayant reçu la même quantité d'insuline. Le pancréas des souris Hnf1 $\alpha^{-/-}$ est plus petit mais ne diffère pas au niveau de la structure histologique de celui des contrôles et ce, même au niveau des îlots de Langerhans (Lee *et al*, 1998). Il a également été démontré, par des expériences d'immunofluorescence, que les souris mutantes présentaient des marquages d'insuline, de glucagon et de somatostatine comparables aux contrôles (Parrizas *et al*, 2001). La réexpression de Hnf1 α dans les cellules β pancréatiques des souris mutantes permet une augmentation des taux d'insuline circulante mais ne permet pas un retour à la normale des niveaux de glucose

sanguin laissant supposer que la sensibilité à l'insuline des organes périphériques tels que le foie et les muscles des souris mutantes est altérée (Lin *et al*, 2008).

3.4 L'intestin

HNF1 α est également présent au niveau de l'intestin et particulièrement exprimé dans l'épithélium (Lussier *et al*, 2010). Plusieurs études relatent son implication dans la régulation de gènes intestinaux. Il a été démontré que ce facteur de transcription permettait l'activation du gène codant pour l'aminopeptidase N dans les cellules intestinales Caco-2 (Olsen *et al*, 1994). HNF1 α et son partenaire HNF1 β transactivent le gène de la sucrase-isomaltase (Boudreau *et al*, 2001; Wu *et al*, 1994). HNF1 α agit en synergie avec d'autres facteurs de transcription comme GATA-4 et Cdx2 pour activer la transcription du gène codant pour la sucrase-isomaltase (Boudreau *et al*, 2002). HNF1 α peut également transactiver les gènes codant pour la guanyline (Hochman *et al*, 1997), la lactase-phlorizine-hydrolase (Mitchelmore *et al*, 2000; van Wering *et al*, 2002), le cotransporteur SGLT1 (Balakrishnan *et al*, 2008; Vayro *et al*, 2001), les UDP-glucuronosyltransferases 1A8, 1A9, 1A10, 1A6, 2B7 (Bock et Kohle, 2005; Gregory *et al*, 2006; Gregory *et al*, 2004), la *Fatty Acid Binding Protein* FABP (Divine *et al*, 2004; Staloch *et al*, 2005) et la dipeptidyl-peptidase-4 (DPP4) (Gu *et al*, 2008). HNF1 α peut également réguler le microRNA-194 durant la différenciation des cellules épithéliales intestinales Caco-2 (Hino *et al*, 2008).

Au sein de notre laboratoire, nous avons approfondi l'étude du rôle de HNF1 α dans la physiologie intestinale épithéliale par l'utilisation du modèle établi par l'équipe de Gonzalez (Lussier *et al*, 2010). Tout d'abord, nous avons observé que la perte de Hnf1 α chez les souris adultes entraînait une intestinalomégalie. Aussi, la taille des villosités diminue dans le jéjunum mais augmente dans l'iléon chez les souris mutantes. Les cryptes connaissent un allongement et une augmentation importante du processus de fission cryptale. Ce phénomène est connu pour se manifester durant les 3 premières semaines de vie après la naissance chez la souris pour diminuer par la suite progressivement (Wasan *et al*, 1998). Dans ce contexte, nous avons observé que la voie mTOR/S6K était fortement

activée au niveau de l'épithélium intestinal chez les souris adultes mutantes.

La barrière intestinale des souris $Hnfl\alpha^{-/-}$ se trouve également perturbée avec une augmentation de la perméabilité paracellulaire (Lussier *et al*, 2010). On note également une diminution du transport ionique, de même qu'une diminution du transport entérique du glucose correspondant à une diminution des transcrits G6PC (*glucose-6-phosphate transporter, catalytic subunit*) et le glucose-6-phosphate (Lussier *et al*, 2010).

Nous avons également rapporté un changement au niveau des différentes entités cellulaires constituant l'épithélium intestinal. En effet, la perte de $Hnfl\alpha$ entraîne une dérégulation au niveau du devenir cellulaire de la lignée sécrétoire. La proportion de cellules caliciformes est augmentée dans les cryptes du jéjunum des animaux $Hnfl\alpha^{-/-}$ et diminuée dans les villosités de l'iléon. Au niveau des cellules de Paneth, les souris mutantes présentent un marquage du lysozyme plus diffus. Cependant, le nombre de cellules Paneth est significativement augmenté par rapport aux souris contrôles. Cette dérégulation serait liée à un défaut de maturation des cellules de Paneth (Lussier *et al*, 2010).

Nous avons aussi observé des modifications au niveau d'une autre composante de la lignée sécrétoire, soit les cellules entéroendocrines. Les marqueurs endocriniens tels que la somatostatine, le *gastric inhibitory polypeptide* diminuent alors que la ghréline est augmentée dans le jéjunum des animaux $Hnfl\alpha^{-/-}$. Tel que mentionné auparavant, ces hormones interviennent dans l'homéostasie du glucose (Lussier *et al*, 2010).

3.5 Autres anomalies rencontrées chez les souris $Hnfl\alpha^{-/-}$

Les organes reproducteurs des souris mutantes sont atrophiés et les animaux sont stériles. Ces souris $Hnfl\alpha^{-/-}$ présentent un retard de croissance d'environ 50% en comparaison aux souris homozygotes $Hnfl\alpha^{+/+}$ et souris hétérozygotes $Hnfl\alpha^{+/-}$ et ce, 5 semaines après la naissance. Les animaux mutants sont caractérisés par une augmentation des taux circulants d'hormone de croissance (GH) mais présentent une diminution des taux

circulants de *l'insulin-like growth factor I* (IGF-I) laissant penser à une résistance à la GH (Lee *et al*, 1998).

4 L'homéostasie du glucose et pathologies associées

L'homéostasie peut être définie comme la capacité à conserver un équilibre de fonctionnement en dépit des contraintes extérieures. On trouvera par exemple le contrôle de la glycémie, de la température corporelle, du métabolisme énergétique et du pH. Chez l'homme adulte à jeun, la glycémie doit être comprise entre 4,4 et 5,6 mmol/L et est régulée par l'action d'hormones originaires de plusieurs organes tels que le foie, le pancréas, les reins, l'estomac et l'intestin.

Le foie va traiter le glucose en le transformant en glycogène ou en lipides permettant ainsi son stockage et sa libération lorsque cela est nécessaire. La synthèse du glycogène sera assurée par la glycogénogenèse. À l'inverse, l'hydrolyse du glycogène sera réalisée lors de la glycogénolyse. La néoglucogenèse servira quant à elle à la production de glucose à partir de composés non glucosidiques. La lipogenèse sera utilisée pour générer des acides gras à partir de glucose et l'inverse sera réalisé par lipolyse.

On retrouve au niveau du pancréas les cellules α qui produisent le glucagon, l'hormone hyperglycémiant en périphérie. Aussi, les cellules β , majoritaires au centre de l'îlot pancréatique, synthétisent l'insuline qui est l'hormone hypoglycémiant. Les cellules δ libèrent la somatostatine qui diminue la sécrétion de glucagon et d'insuline comme vu précédemment (Pan et Wright, 2011; Slack, 1995).

Les reins vont jouer un rôle dans l'homéostasie du glucose notamment au moment de sa réabsorption. Ainsi, le glucose produit dans l'urine primitive peut être réabsorbé activement vers le sang au niveau du tubule proximal.

L'estomac et l'intestin jouent également un rôle dans le maintien de la glycémie en produisant des hormones qui contribuent à cette régulation. En effet, l'estomac pourra

produire la leptine et la ghréline qui sont des régulateurs de la prise alimentaire d'une part et régulateurs de la glycémie par une action sur les cellules β pancréatiques pouvant influencer les quantités d'insuline circulante. L'intestin produira aussi de la ghréline ainsi que les incrétines également acteurs de l'homéostasie du glucose (Dezaki, 2013; Raucci *et al*, 2013; Sato *et al*, 2012; Sobhani *et al*, 2000).

Des déséquilibres de l'homéostasie du glucose peuvent subvenir et se traduire soit par une hypoglycémie ou par une hyperglycémie. Dans ce dernier cas, on parlera de diabète sucré.

Le diabète est défini par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) comme une maladie métabolique chronique incurable, caractérisée par une hyperglycémie non contrôlée, c'est-à-dire une concentration en glucose sanguine élevée. L'association américaine du diabète attribue cette maladie à un défaut de sécrétion d'insuline, un défaut d'action de cette hormone ou les deux à la fois (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, <http://www.diabetes.org>, consulté le 20 octobre 2013). Cette hyperglycémie prolongée entraîne des dommages sur plusieurs organes notamment les yeux, les reins, le système nerveux, le cœur. L'OMS estime que 347 millions de personnes sont diabétiques dans le monde. En 2004, le nombre de décès associés au diabète avoisinait 3,4 millions de personnes, et plus de 80% des décès liés au diabète sont recensés dans les pays à revenu faible (Roglic *et al*, 2005). Il existe plusieurs types de diabètes.

4.1 Diabète de type 1 ou diabète insulino-dépendant ou juvénile

Ce diabète représente environ 10% des personnes diabétiques. Il est caractérisé par un défaut de sécrétion de l'hormone hypoglycémisante, l'insuline. L'insuffisance de sécrétion d'insuline est liée à une maladie auto-immune qui détruit les cellules β des îlots de Langerhans du pancréas (Waldron-Lynch et Herold, 2011). Ce diabète de type 1 nécessite l'administration quotidienne d'insuline exogène pour réguler la glycémie. Cependant l'insulinothérapie n'est pas suffisante à long terme pour stopper l'évolution des complications débilantes qu'engendrera la maladie. Seule la greffe de tissu insulino-

sécrétant serait encore à ce jour la voie thérapeutique envisageable pour stopper la pathologie (Hatzivramidis *et al*, 2013). Les symptômes de cette maladie sont une polyurie et une polydipsie élevées, une sensation de faim permanente, une perte de poids importante, une altération de la vision ainsi qu'une sensation de fatigue (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, <http://www.diabetes.org/diabetes-basics/symptoms/>, consulté le 20 octobre 2013).

4.2 Le diabète de type 2 ou diabète non insulino-dépendant ou mature

Ce type de diabète représente 90% des diabétiques. En 2010, le nombre de patients atteints du diabète de type 2 était de 285 millions et il est estimé que ce nombre devrait passer à 439 millions en 2030 et ainsi représenter 7,7% de la population mondiale âgée de 20 à 79 ans (Chen *et al*, 2012). Il est lié à deux anomalies indépendantes : une insulino-résistance et une défaillance de la sécrétion d'insuline. Les symptômes peuvent être les mêmes que pour le diabète de type 1, mais dans le diabète non insulino-dépendant on voit souvent chez les patients une surcharge pondérale donnant ainsi le nom de diabète gras. Il existe des sous-types de diabète non insulino-dépendants, qui apparaissent chez le jeune avant 25 ans, à transmission autosomique dominante; ce sont les diabètes désignés *Maturity Onset Diabetes of the Young* (MODY) (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, <http://www.diabetes.org/diabetes-basics/symptoms/>, consulté le 20 octobre 2013).

4.3 Diabète gestationnel

Selon l'Organisation Mondiale de la Santé le diabète gestationnel est un trouble de la tolérance glucidique conduisant à une hyperglycémie de sévérité variable, débutant ou diagnostiqué pour la première fois pendant la grossesse. Les besoins en insuline sont augmentés chez la femme enceinte. Il touche de 3 à 5% des femmes enceintes (Ben-Haroush *et al*, 2004). Le diabète gestationnel est lié à une résistance à l'insuline et un défaut de sécrétion de l'insuline par les cellules β pancréatiques au cours de la grossesse. Les patientes atteintes par ce diabète gestationnel ont plus de risques de devenir obèses et

de développer un diabète non insulino-dépendant au cours de leur vie (Buchanan *et al*, 2012).

4.4 Les diabètes MODY

Il a été démontré que des mutations au niveau de certains gènes chez l'homme pouvaient conduire à un sous-type de diabète sucré non insulino-dépendant ou diabète de type 2, dont le symptôme premier est une hyperglycémie. Le diabète de sous-type MODY est un diabète héréditaire ou familial à transmission autosomique dominante et dans lequel les symptômes apparaissent avant l'âge de 25 ans avec une hyperglycémie non insulino-résistante et/ou un défaut de sécrétion d'insuline (McDonald et Ellard, 2013). La découverte des diabètes monogéniques s'est faite selon deux stratégies à la fin des années 1980 et début des années 1990. La première stratégie reposait sur l'étude de la séquence limitée à un groupe de gènes candidats susceptibles d'intervenir dans la synthèse ou la sécrétion de l'insuline, comme le gène codant pour la glucokinase par exemple (Stoffel *et al*, 1992). La deuxième stratégie visait à étudier les séquences de tous les gènes chez les patients diabétiques et a ainsi permis une mise en évidence de gènes insoupçonnés pouvant intervenir dans le maintien de l'homéostasie du glucose comme certains facteurs de transcription (Klupa *et al*, 2012; Thanabalasingham et Owen, 2011).

Les MODY représentent de 2 à 5% des diabètes de type 2. Actuellement, on dénombre 11 sous-types MODY numérotés de 1 à 11. Ces sous-types sont caractérisés par des mutations géniques parmi lesquels on retrouve le facteur de transcription HNF1 α . Ainsi, MODY1 est associé à HNF4 α (Bell *et al*, 1991; Fujiwara *et al*, 2013) ; MODY2 est associé à la GLUCOKINASE (Froguel *et al*, 1992; Shammas *et al*, 2013) ; MODY3 est associé à HNF1 α (Galan *et al*, 2011; Menzel *et al*, 1995) ; MODY4 est associé à IPF1 (Stoffers *et al*, 1997) ; MODY5 est associé à HNF1 β (Fujimoto *et al*, 2007; Horikawa *et al*, 1997) ; MODY6 est associé à NEUROD1 (Gu *et al*, 2010; Malecki *et al*, 1999) ; MODY7 à KLF11 (Lomberk *et al*, 2013; Neve *et al*, 2005) ; MODY8 est associé à CEL (Raeder *et al*, 2006; Torsvik *et al*, 2014) ; MODY9 est associé à PAX4 (Jo *et al*, 2011; Plengvidhya *et al*, 2007) ; MODY10 est associé à INS (Molven *et al*, 2008) et enfin MODY11 serait associé à

BLK (Borowiec *et al*, 2009).

4.5 Le MODY3

Dans le cas du MODY3, le plus commun des diabètes MODY, il a été rapporté de sévères anomalies d'insulinosécrétion avec une hyperglycémie très importante comparativement aux patients atteints de MODY1 ou de MODY2 (Byrne *et al*, 1996). Les patients atteints de ce diabète monogénique présentent un syndrome polyuro-polydipsique franc (Hattersley, 1998; Menzel *et al*, 1998; Ostoft *et al*, 2014). La physiopathologie du MODY3 demeure cependant encore mal connue.

Environ 70 mutations ont été répertoriées pour le gène *HNF1A* (Ellard, 2000; McDonald et Ellard, 2013; Yamagata, 2003; Yamagata *et al*, 1996). Ces mutations de nature non sens ou bien faux sens entraînent un changement du cadre de lecture. Elles sont réparties dans les domaines de dimérisation, de liaison à l'ADN et de transactivation de HNF1 α (Figure 6). La mutation la plus répandue est certainement l'insertion d'une cytosine au niveau du codon 291 associé à l'exon 4 (Tanaka *et al*, 2000). On parlera alors de la mutation P291fsinsC, aboutissant à la production d'une protéine tronquée (Yamagata *et al*, 1996). Il a été démontré *in vitro* que certains mutants ont un effet dominant négatif perturbant alors la fonction de la protéine normale (Tanaka *et al*, 2000; Wang *et al*, 1998; Yoshiuchi *et al*, 1999). Cela expliquerait la raison pour laquelle, chez l'homme, l'hétérozygotie pour la mutation est associée à une hyperglycémie. Les souris hétérozygotes pour l'allèle, les souris Hnf1 α ^{+/-}, ne présentent pas d'hyperglycémie (Lee *et al*, 1998; Pontoglio *et al*, 1996).

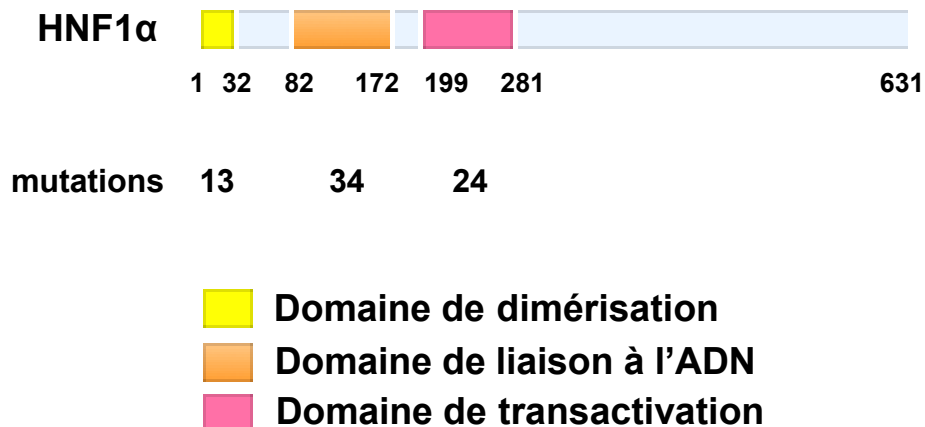


Figure 6 : Localisation des mutations du gène humain *HNF1 α*

Le traitement du MODY3 a été effectué premièrement par l'utilisation de composés chimiques sulfonyleurés encore appelés sulfamides hypoglycémiantes constitués d'un groupement sulfonyle relié à un groupement urée. Ces sulfonyleurés vont agir sur les cellules β pancréatiques en optimisant la fermeture des canaux K^+ /ATP-dépendants, entraînant une dépolarisation de la membrane plasmique puis une entrée de calcium dans la cellule par les canaux calciques, favorisant ainsi la sécrétion d'insuline. Les sulfonyleurés de première génération comme l'acétohexamide, le tolazamide ou le tolbutamide (Klupa *et al*, 2012) ont été remplacés par des composés plus puissants de deuxième génération tels que le glipizide et le glicazide (Hattersley et Pearson, 2006). Certaines études relatent l'utilisation d'autres composés comme la metformine, un biguanide dont le mécanisme d'action n'est pas encore élucidé (Pearson *et al*, 2003). Plus récemment d'autres voies thérapeutiques, pour traiter le MODY3, ont été explorées, notamment l'utilisation d'agonistes du récepteur au GLP-1 (Ostoft *et al*, 2014).

5 Les hormones intervenant dans l'homéostasie du glucose

5.1 L'insuline

Cette hormone a été découverte à Toronto en 1922 par Banting et MacLeod, aidés par Best puis Collip (Banting *et al*, 1922). L'insuline est une hormone polypeptidique de 51 acides aminés avec un poids moléculaire de 5,8 kDa (Baumhueter *et al*, 1990; Brown *et al*, 1955). L'insuline est codée par un seul gène chez les mammifères à l'exception du rat et de la souris qui comportent deux exemplaires alléliques (Melloul *et al*, 2002). La molécule d'insuline peut se polymériser jusqu'à former des hexamères. La formation d'hexamères requiert la participation d'atomes de zinc. Le mécanisme menant à la production de l'insuline mature requiert plusieurs étapes. L'ARNm donne tout d'abord la préproinsuline (11,5 kDa) qui est clivée en proinsuline comportant 3 chaînes : une chaîne A carboxy-terminale (21 acides aminés) et une chaîne B amino-terminale (30 acides aminés) toutes deux liées par le peptide C. Cette proinsuline sera clivée par les furines libérant l'insuline d'une part et le peptide C (31 acides aminés d'un poids moléculaire d'environ 3 kDa) d'autre part dont le rôle reste encore mal connu. L'insuline va être sécrétée lors de l'augmentation de la glycémie, à la suite d'un repas par exemple. D'autres stimuli comme la vue et le goût de la nourriture peuvent également initier la libération d'insuline. Des stimuli potentialisateurs peuvent amplifier la sécrétion comme des substrats énergétiques, des hormones digestives, l'acétylcholine et des molécules à visées anti-diabétiques (Docherty et Clark, 1994; Ferrer *et al*, 1993; Gerich, 1993).

5.1.1 Le mécanisme de libération de l'insuline par les cellules β pancréatiques

Lors de l'augmentation de la glycémie, le glucose pénètre dans la cellule β pancréatique par diffusion, facilitée au niveau du transporteur non saturable GLUT2, chez les rongeurs et GLUT1 (*glucose transporter 1*), chez l'homme. Il y a ainsi augmentation de la concentration de glucose dans la cellule (étape 1, Figure 7). Le glucose subit alors une phosphorylation par l'intermédiaire de la glucokinase pour donner du glucose-6-phosphate. Ainsi phosphorylé, le glucose va subir la glycolyse et la respiration oxydative au niveau mitochondrial qui va entraîner l'augmentation du ratio ATP/ADP (étape 2, Figure 7) et cela aura pour effet d'induire la fermeture des canaux K^+ /ATP-dépendants (étape 3, Figure 7), entraînant ainsi une dépolarisation de la membrane plasmique des cellules β pancréatiques (étape 4, Figure 7). Ceci permettra l'entrée importante d'ions calcium (Ca^{2+}) par

l'intermédiaire de canaux Ca^{2+} /voltage dépendants (étape 5, Figure 7), cette augmentation de calcium intracellulaire aura a son tour pour effet de provoquer l'exocytose des vésicules contenant l'insuline (étape 6, Figure 7) (De Leon et Stanley, 2007; Kahn *et al*, 2006).

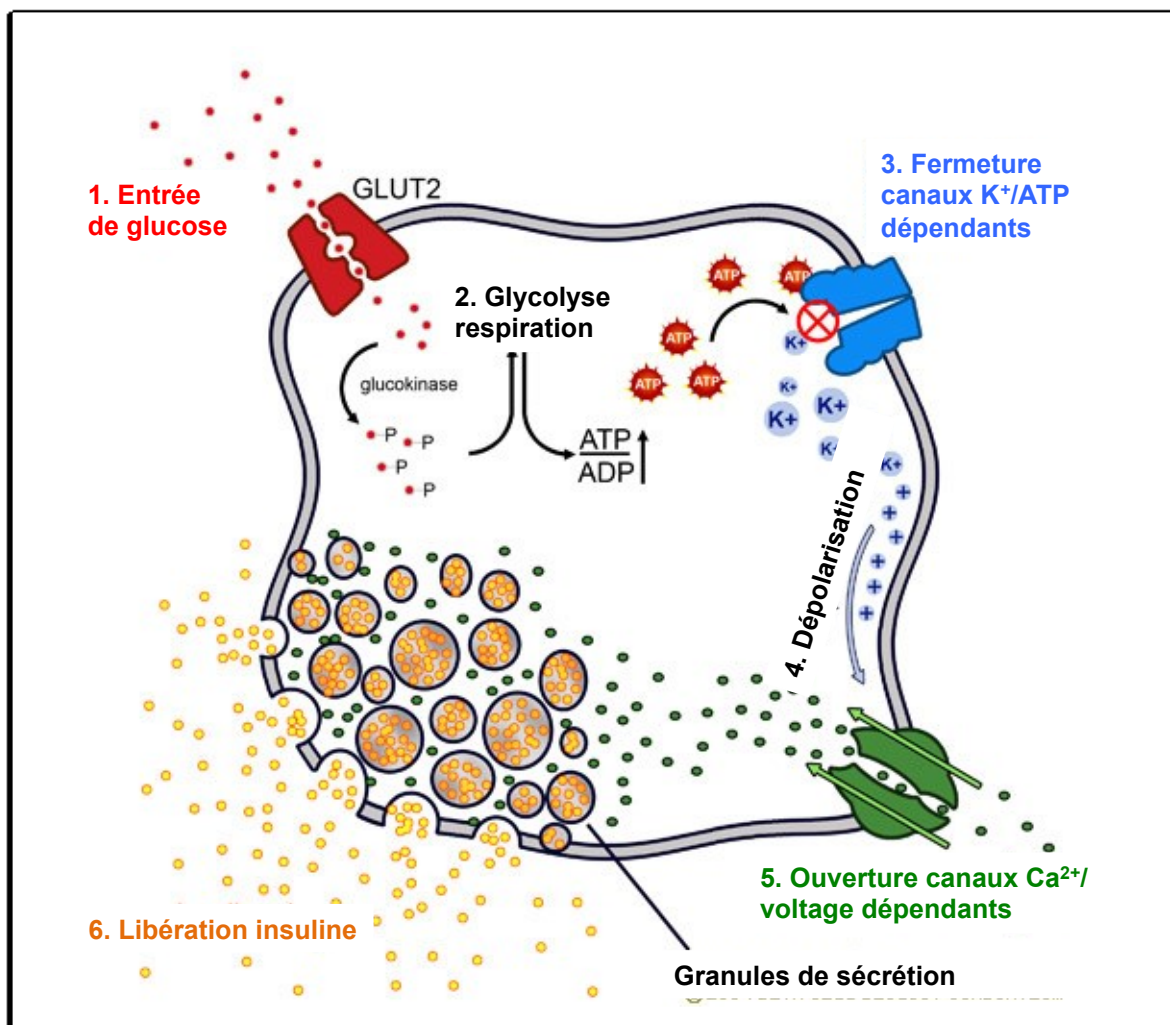


Figure 7: Mécanisme de libération de l'insuline. Cette illustration provient et a été adaptée de the Beta Cell Biology Consortium (www.betacell.org), fondé par NIDDK U01DK072473, http://www.betacell.org/content/articleview/article_id/1/, consulté le 3 août 2013).

5.1.2 Actions de l'insuline

L'action principale de cette hormone est le stockage des sucres et des acides gras. Elle peut également intervenir dans la synthèse des protéines, la croissance, le développement et l'apoptose. L'insuline va exercer ses actions par l'intermédiaire de récepteurs situés sur les cellules cibles de l'organisme incluant celles du foie (hépatocytes), du muscle (myocytes) et du tissu adipeux (adipocytes). Les récepteurs à l'insuline appartiennent à la sous-famille des récepteurs tyrosine kinase (Ward et Lawrence, 2009). Le rôle premier de l'insuline va être de diminuer la concentration de glucose, des acides aminés et des acides gras dans le sang et de permettre leur stockage. L'insuline va favoriser l'entrée de ces molécules dans les cellules et leur conversion en glycogène par la glycogénogenèse, protéines et triglycérides respectivement. Dans la majorité des organes non-hépatiques, l'entrée de glucose est augmentée par une augmentation du nombre de transporteurs de glucose GLUTs en perpétuel renouvellement. L'insuline peut favoriser l'augmentation du nombre de ces transporteurs et notamment GLUT4 au niveau de la membrane plasmique des cellules du muscle squelettique (Klip *et al*, 2014; Mann *et al*, 2013; Wang *et al*, 1997; Watson et Pessin, 2001).

L'insuline va pouvoir agir selon deux voies de signalisation. La première est la voie de signalisation *phosphatidyl-inositol 3 kinase* (PI3K) (Ahren *et al*, 2002; Guo, 2014). L'insuline va lier la portion extracellulaire de son récepteur, la sous-unité α , entraînant l'autophosphorylation du récepteur au niveau de sa sous-unité β et des IRS (insulin receptor substrate). Cela permet le recrutement de la PI3K constitué de 2 sous-unités : p85 sous-unité régulatrice et p110 sous-unité catalytique. PI3K phosphoryle à son tour le phosphatidylinositol-3,4-biphosphate (PIP2) en phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate (PIP3). PIP3 recrute la sérine/thréonine kinase Akt à proximité de la membrane plasmique où alors elle est phosphorylée par PDK1 (phosphatidylinositol 3-dependent kinase 1). Akt phosphorylera d'autres molécules cytoplasmiques jouant différents rôles comme la synthèse protéique par la voie mTOR (*mammalian target of rapamycin*) (Dreyer *et al*, 2009), l'apoptose (Franke *et al*, 1997), la réparation de l'ADN, le cycle cellulaire et la survie cellulaire (Saltiel et Pessin, 2002).

L'insuline peut également activer la voie des MAPKinases (*mitogen-activated protein kinases*) (Boulton *et al*, 1991; Cobb *et al*, 1991). Les MAPkinases sont des kinases qui phosphorylent les protéines MAP (Gehart *et al*, 2010). L'insuline se lie à son récepteur, ce qui provoque la phosphorylation du domaine cytosolique du récepteur et de l'IRS. Les groupes phosphotyrosines de l'IRS se lient aux domaines SH2 de GRB2, qui se fixe à son tour à Sos pour obtenir la forme activée de Ras, Ras-GTP. Ainsi activée la protéine Ras initie l'activation la cascade des kinases (Gehart *et al*, 2010). Ras se lie alors au domaine N-terminal de Raf permettant l'activation de ce dernier. Raf activera MEK1 qui activera à son tour ERK1 et ERK2. ERK1/2 transloqueront au noyau permettant la phosphorylation de facteurs de transcription qui agiront sur la prolifération et la différenciation cellulaire (Boulton *et al*, 1991; Cobb *et al*, 1991; Gehart *et al*, 2010; Moodie *et al*, 1993; Ray et Sturgill, 1987; Vojtek *et al*, 1993; Warne *et al*, 1993).

5.2 Le glucagon

Le glucagon est un peptide monocaténaire de 29 acides aminés pour un poids moléculaire de 3,5 kDa produit par les cellules α pancréatiques (Edgerton et Cherrington, 2011; Gromada *et al*, 2007). L'ARNm est traduit en préproglucagon et transféré dans le réticulum endoplasmique pour subir une série de clivages donnant le proglucagon. Ce dernier sera à son tour clivé et donnera selon les enzymes présentes dans les cellules le glucagon, la glicentine ou les GLP-1 et GLP-2 qui joueront, comme nous le verrons plus tard, un rôle dans l'homéostasie du glucose (Jespersen *et al*, 2013; Jiang et Zhang, 2003; Quesada *et al*, 2008). La prohormone convertase 2 (PC2), responsable du clivage donnant le glucagon, n'est retrouvée que dans les cellules α pancréatiques. Les cellules L de l'intestin contiennent la prohormone convertase PC1 qui permettra d'obtenir GLP-1 et GLP-2.

Chez un sujet sain, le glucagon est sécrété en réponse à un état hypoglycémique. Lors d'une hyperglycémie, la production et la sécrétion de glucagon seront freinées. Le glucagon agit principalement au niveau du foie où il augmente la glycogénolyse hépatique.

Il diminue la glycogénèse. Le glucagon inhibe la glycolyse. Il stimule la néoglucogénèse, la cétogénèse hépatique ainsi que la production d'insuline (Quesada *et al*, 2008).

La sécrétion de glucagon par les cellules α pancréatiques est glucose-dépendante. Le glucose sera incorporé au niveau des cellules par l'intermédiaire d'un transporteur SLC2A1 (*solute carrier 2 (facilitated glucose transporter), member1*). Lors d'une hypoglycémie, peu de glucose entre dans la cellule, le ratio ATP/ADP reste bas et permet le maintien de l'ouverture des canaux K^+ /ATP-dépendants. La dépolarisation de la membrane plasmique est alors telle, qu'elle permet l'ouverture des canaux Ca^{2+} /voltage-dépendants et Na^+ /voltage-dépendants. L'entrée de Ca^{2+} permettra l'exocytose des granules de sécrétion contenant les molécules de glucagon. Lors d'une hyperglycémie, le ratio ATP/ADP augmentera bloquant ainsi les canaux K^+ /ATP-dépendants et la dépolarisation de la membrane plasmique suivie d'une inactivation des différents canaux voltage dépendants. L'activité électrique sera donc abolie et cela aura pour effet d'inhiber l'entrée de Ca^{2+} dans la cellule et, par conséquent, la libération de glucagon dans la circulation sanguine (Gromada *et al*, 1997).

5.3 Les incrétines

Les incrétines sont des hormones gastro-intestinales qui stimuleront la sécrétion d'insuline en réponse à une augmentation de la glycémie. Elles sont au nombre de 2 : le GIP pour *gastric inhibitory polypeptide* ou *glucose-dependent insulintropic polypeptide*, et le GLP1 pour *glucagon-like peptide 1* (Yabe et Seino, 2013).

5.3.1 Le GIP

Première incrétine découverte en 1971, le GIP est un peptide de 42 acides aminés dérivant du proGIP après l'action de la prohormone convertase PC1/3 (Fehmann et Goke, 1995; Yabe et Seino, 2011). Il y a une grande conservation de la séquence en acides

aminés inter-espèce. GIP est synthétisé et sécrété par les cellules K de l'intestin grêle et de manière graduellement décroissante du duodénum vers l'iléon (Buffa *et al*, 1975).

La sécrétion de GIP par les cellules K est régulée par les taux de glucose circulant et par la prise alimentaire. L'administration orale de glucose agit de manière dose dépendante sur la sécrétion de GIP. Plus la concentration en glucose administrée est grande, plus la sécrétion de GIP sera importante (Schirra *et al*, 1996). La sécrétion de GIP peut également être activée par d'autres molécules comme le sucrose, le galactose et le fructose, alors que le mannose n'a aucun effet (Calanna *et al*, 2013b; Flatt *et al*, 1989).

Les mécanismes régissant la sécrétion du GIP sont peu connus mais tout comme la sécrétion d'insuline, celle-ci implique une augmentation de la concentration en ions Ca^{2+} permettant l'exocytose des granules de sécrétion contenant le GIP. Les cellules K sont des cellules entéroendocrines avec un pôle apical ouvert sur la lumière intestinale, donc au contact du bol alimentaire. Des récepteurs TR, pour *taste receptor*, pourraient jouer le rôle de senseur et permettraient d'affiner la réponse de la cellule K en fonction des concentrations en sucres (Egan et Margolskee, 2008; Martinez-Rodriguez et Gil, 2012).

Le GIP est dégradé par la dipeptidyl-peptidase 4 (DPP4) soluble (Seino et Yabe, 2013). Les 2 premiers acides aminés à l'extrémité amino-terminale de GIP (1-42) sont clivés en 1 à 2 minutes chez les rongeurs et 5 à 7 minutes chez l'humain par la DPP4 (Deacon *et al*, 2000). Le produit en résultant est le GIP (3-42) qui est très instable dans la circulation.

L'effet incrétine de GIP fait intervenir un récepteur spécifique, soit le GIPR pour *glucose inhibitory polypeptide receptor* (Maletti *et al*, 1984; Seino et Yabe, 2013; Yamada *et al*, 1995). On retrouve des GIPRs exprimés à la surface des cellules α et β pancréatiques (Moens *et al*, 1996; Seino et Yabe, 2013), de même qu'au niveau du tractus intestinal, du tissu adipeux, du cœur, des testicules, de la trachée, de la rate, du thymus, de la thyroïde et des reins (McIntosh *et al*, 1996; Yip *et al*, 1998). Les GIPRs sont des récepteurs couplés aux protéines G de classe II (Wheeler *et al*, 1995; Yabe et Seino, 2011), glycoprotéines à 7

passages transmembranaires. La partie carboxy-terminale intra-cytosolique s'associe avec la protéine Gs (Wheeler *et al*, 1999) qui active à son tour l'adénylate cyclase entraînant l'augmentation du messager secondaire AMPc, ce qui provoque l'activation de la PKA, point de départ d'autres cascades de signalisation pouvant concourir à l'exocytose des granules de sécrétion contenant l'insuline. Il a été démontré également que GIP pouvait stimuler la voie des MAPK avec notamment la phosphorylation des kinases Erk1/2 pouvant concourir au contrôle de la prolifération des cellules β pancréatiques (Ehses *et al*, 2001; Ehses *et al*, 2002; Gomez *et al*, 2002). Une autre voie a été mise en évidence et résiderait dans l'interaction de l'AMPc avec la protéine AMPc-GEF pour constituer un complexe stimulant alors l'activité d'une protéine G, Rab3 jouant un rôle dans la libération des granules d'insuline (Ozaki *et al*, 2000).

Au niveau des îlots de Langerhans, le GIP permet donc d'augmenter la sécrétion d'insuline mais aussi sa synthèse, de même que l'expression de la glucokinase et de GLUT2. GIP augmente aussi la sécrétion de glucagon et de somatostatine, la prolifération des cellules β pancréatiques et diminue leur apoptose. GIP diminue les sécrétions acides de l'estomac ainsi que la production de glucose au niveau du foie (Kim et Egan, 2008; Tan et Bloom, 2013). Au niveau extrapancréatique GIP a des effets anaboliques sur le tissu adipeux en stimulant l'import de glucose, la synthèse d'acides gras, la lipogenèse et en inhibant la lipolyse (Tan et Bloom, 2013; Vella et Rizza, 2004).

Il existe des modèles animaux pour étudier les rôles de l'hormone GIP (Yabe et Seino, 2013). Le gène *Gipr* a été invalidé chez la souris. Ces souris mutantes présentent une glycémie à jeun identique aux souris contrôles. De plus, l'administration de glucose par injection intrapéritonéale chez les souris mutantes résulte en une sécrétion normale de l'insuline (Kim et Egan, 2008). Il a été observé que des îlots de Langerhans isolés de souris *Gipr*^{-/-} ayant été stimulés avec du glucose ont une sécrétion d'insuline préservée (Miyawaki *et al*, 1999). Si ces souris mutantes reçoivent oralement une solution de glucose, la tolérance au glucose est altérée, avec une réduction de près de 50% de la sécrétion d'insuline comparativement aux souris contrôles (Miyawaki *et al*, 1999). Les taux

circulants de l'autre incrétine, Glp-1, ne sont pas altérés dans les souris $Gipr^{-/-}$, mais les îlots isolés de ces souris mutantes semblent avoir une meilleure réponse au Glp-1 (Pamir *et al*, 2003). Aucune différence de prise alimentaire entre les souris mutantes et contrôles n'a été rapportée (Kim et Egan, 2008).

De par son effet insulinothrompique, des essais thérapeutiques ont été entrepris visant à utiliser des analogues du GIP pour le traitement du diabète de type 2. En effet, la sécrétion d'insuline après une stimulation avec du glucose est augmentée par des infusions de GIP chez l'homme (Elahi *et al*, 1982). L'effet incrétine de GIP sur les cellules β pancréatiques apparaît être dose-dépendant et s'ajoute à ceux des autres facteurs favorisant la sécrétion d'insuline comme le glucose, le GLP-1, l'arginine et le glibenclamide (Meier et Nauck, 2004). Par ailleurs, certaines études relatent que le GIP aurait un effet anti-apoptotique sur les cellules β pancréatiques (Trumper *et al*, 2002; Trumper *et al*, 2001). Des essais ont été réalisés sur des souris hyperglycémiques ob/ob en administrant un analogue au GIP entraînant une amélioration de la régulation de la glycémie (Irwin *et al*, 2005).

Malgré un certain intérêt thérapeutique, l'utilisation de GIP dans un traitement pour lutter contre le diabète de type 2 se heurte à plusieurs inconvénients. Tout d'abord, la structure de ce peptide nécessite une injection intraveineuse ou sous-cutanée (Meier et Nauck, 2004). La forme active de GIP est rapidement clivée par la DPP4 en moins de 5 minutes. Il a également été rapporté que l'effet incrétine de GIP était altéré dans le diabète sucré de type 2 (Nauck *et al*, 1993). Des études relatent même une augmentation des taux circulants de GIP chez les patients atteints de diabète de type 2 (Theodorakis *et al*, 2004; Vollmer *et al*, 2008). Pour certains, la perte de l'effet insulinothrompique de GIP chez les diabétiques de type 2 serait due à une désensibilisation des GIPRs à la surface des cellules β pancréatiques (Tseng *et al*, 1996) ou encore, à une réduction de l'expression des GIPRs dans ces mêmes cellules (Holst *et al*, 1997; Zhou *et al*, 2007). Une étude relate également que l'utilisation de GIP exogène pourrait occasionner une diminution de la tolérance au glucose (Chia *et al*, 2009).

5.3.2 Le GLP-1

Le GLP-1 provient de la même prohormone que le glucagon, soit le proglucagon de 180 acides aminés, qui donnera également le GLP-2 (Yabe et Seino, 2011). L'obtention de GLP-1 est permise par le clivage par la prohormone convertase PC1/3 (Zhu *et al*, 2002) que l'on retrouve dans les cellules L intestinales (Doyle et Egan, 2007; Taing *et al*, 2014; Yabe et Seino, 2011). Bien que des traces de GLP-1 aient été retrouvées dans le cerveau, la majorité du GLP-1 trouve son origine au niveau de l'intestin grêle et du côlon en corrélation avec une grande quantité de cellules L situées dans l'iléon et le côlon (Eissele *et al*, 1992; Janssen *et al*, 2013).

La sécrétion de GLP-1 intervient lors de la prise alimentaire (Baggio et Drucker, 2007; Calanna *et al*, 2013a). Les taux plasmatiques de GLP-1 augmentent rapidement après la prise alimentaire et ce, en 2 phases : la première s'étale de 5 à 15 minutes et la deuxième de 30 à 60 minutes après l'ingestion de nourriture (Herrmann *et al*, 1995). Tout comme les cellules K, les cellules L sont en contact direct avec la lumière intestinale permettant ainsi à des TR de « percevoir » le contenu en sucres ou en lipides. Le signal sera relayé par une cascade d'activation permettant la libération des granules de sécrétion contenant le GLP-1 dans la circulation sanguine (Komatsu *et al*, 2013). Hormis les nutriments, des hormones comme l'insuline et la leptine peuvent stimuler la sécrétion de GLP-1 (Anini et Brubaker, 2003; Lim *et al*, 2009). La sécrétion de GLP-1 peut être inhibée par la somatostatine (Chisholm et Greenberg, 2002). Des acides gras peuvent également stimuler la libération de GLP-1 en se liant à des récepteurs couplés aux protéines G comme GPR120, GPR119 et GPR40 (Chu *et al*, 2008; Edfalk *et al*, 2008; Hirasawa *et al*, 2005).

La dégradation du GLP-1 se fait en quelques minutes, après sa sécrétion, par la DPP4 qui vient cliver les 2 premiers acides aminés, une histidine suivie d'une alanine. Il en résulte un peptide qui n'a plus de propriété insulinothropique (Hansen *et al*, 1999) et qui sera à son tour dégradé puis éliminé (Angeli et Shannon, 2014).

L'effet incrétine du GLP-1 fait intervenir les récepteurs GLP-1R pour *glucagon-like peptide 1 receptor* (Ishii *et al*, 2011). Ces récepteurs heptahéliques sont exprimés au niveau du pancréas, notamment des cellules β , au niveau du rein, du poumon, du cœur, du tractus gastrointestinal, de la peau et de l'hypothalamus (Janssen *et al*, 2013; Kim et Egan, 2008). Il est important de signaler que la localisation de l'expression de ce récepteur au sein de différents tissus est très controversée actuellement en raison des outils mis à disposition pour mettre en évidence l'expression de GLP-1R comme les anticorps, les techniques et traitements histologiques des différents tissus (Broide *et al*, 2013; Michel *et al*, 2009; Panjwani *et al*, 2013; Pyke *et al*, 2014; Pyke et Knudsen, 2013). Ainsi le foie a été dans un premier temps décrit comme un organe exprimant GLP-1R et cela a été remis en cause récemment (Panjwani *et al*, 2013; Pyke *et al*, 2014). Des variations d'expression du récepteur ont également été mises en évidence entre les espèces (Korner *et al*, 2007; Madsen *et al*, 2012; Tornehave *et al*, 2008). Comme les GIPRs, les GLP-1Rs sont des récepteurs couplés aux protéines G avec une portion amino-terminale reconnue par l'hormone, un domaine transmembranaire et un domaine carboxy-terminal cytosolique permettant le couplage avec des protéines G comme $G\alpha_q$, $G\alpha_0$ et $G\alpha_i$ (Hallbrink *et al*, 2001). Il y aura alors activation de l'adénylate cyclase, entraînant la production d'AMPc (Thorens *et al*, 1993). Tout comme pour la voie de signalisation faisant intervenir GIP, une voie dépendante de l'AMPc activera la protéine kinase A et une autre voie pourra impliquer l'interaction avec la protéine AMPc-GEF stimulant l'activité de Rab3 qui agira alors sur la libération de l'insuline (Ozaki *et al*, 2000). Il a également été démontré que la voie de l'AMPc pouvait activer la voies des MAPK, qui permettra la phosphorylation des kinases Erk1/2 participant au contrôle de la prolifération des cellules β pancréatiques (Ehse *et al*, 2001; Ehse *et al*, 2002; Gomez *et al*, 2002).

Au niveau du pancréas, GLP-1 va augmenter la sécrétion d'insuline mais aussi sa synthèse, l'expression également de la glucokinase, diminuer la sécrétion de glucagon, augmenter la sécrétion de somatostatine, augmenter la prolifération des cellules β et diminuer leur apoptose (Ding *et al*, 2011; Drucker, 2013; Farilla *et al*, 2003; Ishii *et al*, 2011; Komatsu *et al*, 2013; Lamont et Andrikopoulos, 2014; Lund *et al*, 2014). Les 2 dernières propriétés biologiques du GLP-1 citées, à savoir la prolifération et la diminution

de l'apoptose des cellules β pancréatiques présentent un intérêt thérapeutique pour lutter contre le diabète de type 2. En effet, il a été démontré que dans ce type de diabète il y avait une diminution de la masse des cellules β pancréatiques et une augmentation des marqueurs apoptotiques (Brubaker, 2010; Butler *et al*, 2003). Des auteurs ont démontré que GLP-1 avait pour effet d'accroître la prolifération des cellules β pancréatiques chez les rongeurs (Brubaker et Drucker, 2004; Perfetti *et al*, 2000; Rolin *et al*, 2002; Stoffers *et al*, 2000). Bien que ces découvertes soient prometteuses chez les rongeurs, chez l'humain nous ne disposons pas encore de données permettant d'établir un consensus. En ce qui concerne l'effet inhibiteur du GLP-1 sur l'apoptose des cellules β pancréatiques, une étude révèle que le traitement avec cette incrétine peut permettre l'inhibition de l'apoptose et une meilleure réponse vis à vis du glucose sur des pancréas isolés humains (Farilla *et al*, 2003). Néanmoins, à l'heure actuelle les données sont insuffisantes *in vivo* pour conclure quant à l'effet antiapoptotique de GLP-1 sur les cellules β pancréatiques.

Au niveau de l'estomac, cette hormone diminuera la vidange gastrique, la motilité ainsi que les sécrétions acides (Shah et Vella, 2014). Le GLP-1 a également une action anorexigénique : il va augmenter la sensation de satiété et diminuer la prise alimentaire (van Bloemendaal *et al*, 2014; Verdich *et al*, 2001). Au niveau du muscle, il stimulera l'entrée et le stockage du glucose et diminuera la production de glucose au niveau du foie (Kim et Egan, 2008).

Les premières études mettant en évidence le rôle du GLP-1 endogène dans la sécrétion d'insuline après stimulation par le glucose ont été menées par immunoneutralisation en utilisant un anticorps dirigé contre le GLP-1 ou l'antagoniste Ex-9-39. Ces études révèlent une augmentation de la glycémie à jeun de même qu'une diminution de la sécrétion d'insuline après stimulation par administration de glucose. Cette diminution est associée avec une perte de l'effet incrétine de l'ordre de 50 à 70% en utilisant l'antagoniste EX-9-39 (Baggio *et al*, 2000; Edwards *et al*, 1999; Kolligs *et al*, 1995; Schirra *et al*, 2006). Les souris mutantes pour *Glp-1r* présentent une hyperglycémie modérée à jeun et une augmentation de la concentration en glucose sanguine après administration orale ou intrapéritonéale de glucose. Cette augmentation est associée à une diminution des

niveaux d'insuline sécrétés en réponse aux stimuli glycémiques. Ces souris mutantes ont un poids, une prise alimentaire et des taux de glucagon comparables aux souris contrôles (Scrocchi *et al*, 1996; Scrocchi *et al*, 1998). Des essais réalisés sur des îlots de Langerhans isolés de souris *Glp-1r^{-/-}* et stimulés avec du glucose présentent une réponse sécrétoire d'insuline préservée (Flamez *et al*, 1998). Cela permettrait d'avancer que la signalisation faisant intervenir les GLP-1R n'est pas requise pour la réponse des cellules β pancréatiques à une stimulation par le glucose. De plus, les taux de Gip circulants sont augmentés chez les souris mutantes *Glp-1r* laissant ainsi penser à une compensation par cette incrétine (Pederson *et al*, 1998).

La génération d'un modèle murin dont l'expression des deux types de récepteurs *Gipr* et *Glp-1r* est abrogée a été effectuée afin de mesurer l'hypothèse qu'une compensation puisse s'opérer lors de la perte de fonction de l'un ou l'autre récepteur. Ce modèle de double invalidation ne montre qu'une modeste perturbation de l'homéostasie du glucose, laissant ainsi entrevoir que d'autres mécanismes sont capables de compenser les actions de GIP et de GLP-1 (Hansotia *et al*, 2004; Preitner *et al*, 2004).

Dans le diabète de type 2, des altérations dans la sécrétion de GLP-1 sont rapportées mais également critiquées quant à leur mode de prélèvement et de conservation. En effet le GLP-1 se dégradant très rapidement, le suivi des modulations des taux de GLP-1 demandent des précautions pour éviter la dégradation de l'hormone telles que l'emploi d'inhibiteurs de DPP4 et la manipulation au froid. Une partie des études suggèrent une réduction postprandiale des taux de GLP-1 (Vilsboll *et al*, 2001) alors que d'autres rapportent une augmentation de GLP-1 chez les patients diabétiques de type 2 (Nauck *et al*, 2004; Vollmer *et al*, 2008).

L'effet incrétine de GLP-1 dans le diabète sucré de type 2 est cependant conservé, contrairement au GIP, puisque des infusions de GLP-1 permettent un retour rapide à la glycémie normale, augmentant la sécrétion d'insuline et diminuant celle du glucagon (Gutniak *et al*, 1992; Holst et Gromada, 2004; Nauck *et al*, 1993). Des études chez l'homme laissent espérer à une nouvelle voie thérapeutique pour traiter les patients

diabétiques. Des composés agonistes du récepteur au GLP-1R sont disponibles pour traiter le diabète de type 2. Le premier agoniste du GLP-1R a été mis sur le marché fut l'exénatide en 2005 aux États-Unis et en 2007 en Europe, puis ce fut au tour du liraglutide, en 2009 en Europe et 2010 aux États-Unis (Baruah *et al*, 2012; Lund *et al*, 2014). Dernièrement, en Europe en 2013, le lixisénatide fut proposé pour le traitement du diabète de type 2 (Lund *et al*, 2014; Rigato et Fadini, 2014). D'autres agonistes du GLP-1R sont en essais cliniques comme l'albiglutide, le dulaglutide, le taspoglutide et le sémaglutide (Lorenz *et al*, 2013; Woodward et Anderson, 2014).

5.4 La DPP4

La DPP4 est une aminoprotéase de 766 acides aminés exprimée dans de nombreux tissus, en particulier les glandes exocrines et les épithéliums absorbants. Chez l'homme, on la trouve dans les bordures en brosse des cellules épithéliales de l'intestin grêle et du côlon, du rein, de la prostate et dans les hépatocytes du foie. La DPP4 peut exister sous 2 formes principales : sous forme de protéine rattachée à la membrane plasmique avec un domaine extracellulaire qui catalyse l'activité enzymatique ou alors sous forme de protéine soluble conservant son activité catalytique (Drucker, 2006). Cette enzyme catalyse le clivage de GIP et GLP-1 en molécules bio-inactives GIP (3-42) et GLP-1 (19-37) ou GLP-1 (19-36) (Juillerat-Jeanneret, 2014; Mentlein *et al*, 1993). Les rats chez qui la protéine Dpp4 n'est pas produite montrent des taux élevés de GIP-1 et une tolérance au glucose (Mitani *et al*, 2002). Les souris chez qui Dpp4 a été invalidé présentent une augmentation de GIP-1 et de GIP circulants, une augmentation de la sécrétion d'insuline et une tolérance au glucose accrue (Marguet *et al*, 2000).

Chez les diabétiques, les taux de DPP4 circulants sont équivalents aux sujets sains. L'utilisation d'inhibiteurs de DPP4 empêche la dégradation de GIP et de GLP-1 endogènes (Balkan *et al*, 1999; Deacon *et al*, 2002) et exogènes (Deacon *et al*, 1998). Ainsi, en préservant les incrétines de la dégradation, il y a potentialisation des effets anti-hyperglycémiques laissant entrevoir un moyen thérapeutique encourageant pour traiter les patients diabétiques (Ahren *et al*, 2004; Ahren *et al*, 2002) Actuellement, de nombreuses

molécules inhibant la DPP4 sont disponibles sur le marché : le sitagliptin, le vildagliptin, le saxagliptin, le linagliptin, l'alogliptin et le gemigliptin (Augeri *et al*, 2005; Eckhardt *et al*, 2007; Feng *et al*, 2007; Juillerat-Jeanneret, 2014; Kim *et al*, 2005; Verspohl, 2012; Villhauer *et al*, 2003; Yang *et al*, 2013). D'autres composés sont en phases d'essais cliniques : le dutogliptin, l'omarigliptin, le melogliptin, le tenegliptin, l'anagliptin, le gosogliptin, le carmegliptin et le TAK 100 (Akarte *et al*, 2012; Ervinna *et al*, 2013; Li *et al*, 2012; Miyamoto *et al*, 2011)

5.5 La leptine

La leptine a été découverte en 1994 (Denver *et al*, 2011; Raucci *et al*, 2013; Zhang *et al*, 1994). Le gène *OBESE (OB)* code pour la leptine constituée de 167 acides aminés avec une extrémité amino-terminale de 21 acides aminés permettant sa translocation dans les microsomes pour ensuite être excisée (Yadav *et al*, 2013). La leptine circulant dans le sang est constituée de 146 acides aminés, soit environ 16 kDa.

Les cellules produisant la majorité de la leptine sont les adipocytes de la graisse blanche. La graisse brune produit également de la leptine (Moinat *et al*, 1995). La leptine a aussi été détectée dans l'estomac des rats (Bado *et al*, 1998; Raucci *et al*, 2013; Sobhani *et al*, 2000). De nouvelles études rapportent la présence de leptine dans le muscle squelettique, l'hypophyse et les cellules épithéliales mammaires (Margetic *et al*, 2002).

Les niveaux d'expression du transcrit *OB* dans la graisse blanche sont fortement augmentés chez les patients obèses (Considine *et al*, 1996; Gautron et Elmquist, 2011; Maffei *et al*, 1995). La sécrétion de leptine par les cellules adipeuses, plus volumineuses et plus nombreuses chez les sujets obèses, est augmentée comparativement aux sujets sains (Fried *et al*, 2000; Lonnqvist *et al*, 1997). D'autres facteurs peuvent augmenter la synthèse de la leptine : la suralimentation, l'insuline, le glucose, les glucocorticoïdes, le TNF- α (*tumor necrosis factor alpha*), l'endotoxine, les estrogènes, l'interleukine-1 et l'alcool. Les femmes présentent des taux de leptine circulante plus élevés que les hommes (Licinio *et al*, 1998). Il a été démontré que les estrogènes augmentaient la production de leptine

(Casabiell *et al*, 1998). *In vitro*, l'ajout d'insuline augmente les niveaux d'expression du transcrit de la leptine (Russell *et al*, 1998). A l'inverse, des facteurs peuvent diminuer la synthèse de la leptine : le jeûne, la somatostatine, l'AMPc, la GH, l'exposition au froid et la fumée de cigarette (Margetic *et al*, 2002; Yadav *et al*, 2013).

Le récepteur de la leptine, Ob-R, a été identifié en 1995 (Tartaglia *et al*, 1995; Tucholski et Otto-Buczkowska, 2011). C'est un récepteur appartenant à la famille des récepteurs des cytokines de classe I. Il existe 6 isoformes du récepteur à la leptine : Ob-Ra, Ob-Rb, Ob-Rc, Ob-Rd, Ob-Re et Ob-Rf. L'isoforme longue, Ob-Rb, de 302 acides aminés comporte des motifs peptidiques nécessaires à l'activation de signaux de transduction et est présent au niveau des cellules β pancréatiques (Dunmore et Brown, 2013; Holz *et al*, 2013; Lee *et al*, 1996). L'isoforme Ob-Ra, courte, apparaît comme un transporteur de la leptine dans le sang. Ces récepteurs sont retrouvés au niveau du foie, du cœur, des reins, du poumon, de l'intestin grêle, des testicules, des ovaires, de la rate, du tissu adipeux et de l'hypothalamus (Margetic *et al*, 2002). Il existe également une forme circulante qui se comporte comme une protéine de transport de la leptine. Ces récepteurs transmettent l'information hormonale en se liant à des tyrosine-kinases qui, elles-mêmes, phosphorylent et activent des facteurs transcriptionnels cytoplasmiques, telles les protéines STATs (*signal transducer and activator of transcription*), ainsi la liaison de la leptine à son récepteur peut stimuler la phosphorylation de STAT1, STAT3 et STAT5 *in vitro* et de STAT3 *in vivo* (Harvey et Ashford, 2003). Une fois la leptine liée à son récepteur, la voie des *janus kinases-signal transducers and activators of transcription* (JAK-STAT) est activée. OB-Rb possède deux motifs, Box1 et Box2, qui interagissent classiquement avec les protéines JAK. L'isoforme Ob-Rb possède également un site Box3 permettant la liaison de STAT3 (Babon et Nicola, 2012). La leptine induit la phosphorylation des protéines JAK2. L'activation de JAK2 engendre la phosphorylation des IRS qui activent les phosphatidylinositol-3 kinases (Babon et Nicola, 2012; Kellerer *et al*, 1997). De plus, l'activation du récepteur Ob-R permet la stimulation des voies de signalisation PI3K et MAPK. La leptine peut également activer la voie des MAPK : la leptine peut activer deux classes de MAPK : ERK et JNK-SAPK (Bouloumie *et al*, 1998; Bouloumie *et al*, 1999; Harvey et Ashford, 2003; Wauman et Tavernier, 2011).

Le rôle premier de la leptine va être de diminuer l'appétit et de stimuler le métabolisme (Sobrino Crespo *et al*, 2014). Cette hormone va engendrer la perte de poids. Au niveau de l'hypothalamus, elle agira comme un antagoniste du neuropeptide Y (NPY), responsable de la sensation de faim (Stark *et al*, 2013). La leptine diminue alors la prise alimentaire et augmente les dépenses énergétiques, notamment grâce à une augmentation de la thermogénèse. La leptine stimule la synthèse et la sécrétion de la proopiomelanocortine (POMC) et du *cocaine and amphetamine-regulated transcript* (CART) qui ont des propriétés anorexigéniques (Aguilar *et al*, 2011). La leptine influence la reproduction, la fertilité et la puberté (Elias et Purohit, 2013). L'administration de leptine corrige les anomalies métaboliques des patients lipodystrophiques comme le diabète, la dyslipidémie et la stéatose hépatique (Gautron et Elmquist, 2011; Petersen *et al*, 2002)

Il existe une relation entre la leptine et l'insuline, deux acteurs essentiels du métabolisme énergétique. Tout d'abord, l'insuline joue un rôle dans la synthèse de la leptine (Barr *et al*, 1997; Tsai *et al*, 2012). L'hyperinsulinémie augmente les taux de leptine circulants (Utriainen *et al*, 1996). À l'inverse, une hypoinsulinémie diminuera les taux de leptine circulants (Havel *et al*, 1998). La leptine influence la sécrétion d'insuline mais deux écoles s'affrontent. On retrouve à la surface des cellules β pancréatiques humaines et murines la forme longue du récepteur à la leptine (Holz *et al*, 2013; Seufert, 2004; Seufert *et al*, 1999a; Seufert *et al*, 1999b). Certains prônent une action inhibitrice de la leptine sur la sécrétion d'insuline (Fehmann *et al*, 1997; Fu *et al*, 2013; Holz *et al*, 2013; Poitout *et al*, 1998; Seufert, 2004), d'autres, au contraire, voient une action stimulatrice (Ceddia *et al*, 1999). Néanmoins, l'effet physiologique majeur semble être l'inhibition de la synthèse et de la sécrétion de l'insuline. Il a été démontré qu'une carence en leptine entraînait une hyperinsulinémie (Montague *et al*, 1997). Comme nous l'avons précédemment vu, la sécrétion d'insuline par les cellules β pancréatiques fait intervenir des canaux K_{ATP} . La leptine, quant à elle, par sa liaison à son récepteur Ob-Rb, augmente l'activité des canaux K_{ATP} suite à une stimulation de l'AMPK (Holz *et al*, 2013). Il a été documenté, chez des souris dépourvues du récepteur Ob-Rb à la surface des cellules β pancréatiques, que les fluctuations du Ca^{2+} intracellulaire en fonction de la concentration en

glucose étaient altérées (Tuduri *et al*, 2013). Récemment, une étude révèle que l'administration de leptine à faibles doses permet de diminuer le nombre d'îlots pancréatiques transplantés pour rétablir la glycémie chez des souris diabétiques (Denroche *et al*, 2013). La leptine serait ainsi un régulateur négatif de la production d'insuline aidant à la prévention de l'accumulation de triglycérides. Par ailleurs, l'insuline apparaissant comme un stimulateur de la production de leptine, l'interaction de ces deux hormones est essentielle dans l'axe adipo-insulinaire.

De forts taux de leptine ont été rapportés chez des patients obèses atteints de diabète de type 2 (Segal *et al*, 1996). Pour certains, il existe un lien entre l'hyperleptinémie et l'insulinorésistance (Li *et al*, 2013). Cette adipokine régule la sensibilité à l'insuline par l'intermédiaire de la voie PI3K (Steppan *et al*, 2001). La leptine jouerait aussi un rôle sur les niveaux de GH et d'IGF1 circulants, en diminuant ces derniers (Liu *et al*, 2009).

Les souris où le gène *Obese* a été invalidé (les souris ob/ob) développent une obésité et une hyperinsulinémie dans les deux semaines suivant la naissance, puis une hyperglycémie à quatre semaines (Lindstrom, 2007). Cette hyperglycémie est liée à l'instauration d'une résistance à l'insuline (Lindstrom, 2007).

5.6 La ghréline

La ghréline est une hormone de 28 acides aminés, isolée la première fois dans un estomac de rat (Delporte, 2013; Kojima *et al*, 1999) en tant que ligand endogène du récepteur sécrétagogue de l'hormone de croissance GHSR1a (Howard *et al*, 1996). Ce peptide peut être présent sous deux formes : d'une forme acylée, bioactive, qui réside dans l'ajout en amino-terminal sur la sérine en position 3 d'un groupement acyl (Kojima *et al*, 1999; Sato *et al*, 2012) par une enzyme nommée *ghrelin O-acyl transferase* (Maletti *et al*) (Gutierrez *et al*, 2008; Kirchner *et al*, 2009; Maletti *et al*, 1984; Taylor *et al*, 2012) et d'une autre forme non-acylée.

Cette hormone provient d'un précurseur de 117 acides aminés, la préproghréline qui une fois clivée, donnera la proghréline de 94 acides aminés qui subira à son tour l'action de la prohormone convertase 1/3 pour donner la ghréline de 28 acides aminés (Delporte, 2013; Romero *et al*, 2010). La ghréline est produite par l'estomac, l'intestin, le pancréas, les reins, les testicules, les poumons, le cerveau, le cœur tout comme la GOAT, nécessaire à son acylation donc à son activation (Dezaki *et al*, 2008; Sato *et al*, 2012; Yang *et al*, 2008).

La sécrétion de ghréline se fait par les cellules P/D1 au niveau de l'estomac et de l'intestin mais également par les cellules ϵ du pancréas (Andralojc *et al*, 2009; Arnes *et al*, 2012; Assmann *et al*, 2009; Heller *et al*, 2005; Raghay *et al*, 2013; Wierup *et al*, 2014). Cependant, le nombre de cellules ϵ décroît de façon importante chez l'adulte (Wierup *et al*, 2014; Wierup *et al*, 2002; Wierup *et al*, 2004). Il est à noter qu'au niveau pancréatique, des études relatent une expression de ghréline dans les cellules α pancréatiques (Date *et al*, 2002).

Les taux plasmatiques de ghréline varient en fonction des repas. Ainsi, juste avant chaque repas, les taux circulants de l'hormone augmentent de près de 2 fois, puis se normalisent une heure après le repas (Cummings *et al*, 2001; Pradhan *et al*, 2013). La nette augmentation de ghréline active circulante avant chaque repas et la chute après les repas supporte une implication de la ghréline dans la prise alimentaire. C'est donc une hormone orexigénique.

Les mécanismes qui régissent la sécrétion de la ghréline restent encore mal définis hormis le fait qu'elle serait rythmée par la prise alimentaire. L'hypothèse selon laquelle la libération de ghréline obéirait à une action mécanique, notamment par la distension de l'estomac, a été infirmée par des expériences dans lesquelles l'estomac était rempli d'eau ou avec des infusions de nutriments. La sécrétion de ghréline serait plutôt liée à la composition en carbohydrates du bol alimentaire (Williams *et al*, 2003).

Le récepteur à la ghréline GHSR1a est un récepteur couplé aux protéines G. Il est présent dans bon nombre de tissus comme les noyaux arqués de l'hypothalamus, mais aussi

le cœur, les poumons, les reins, le pancréas, l'estomac, l'intestin grêle, le côlon, le tissu adipeux et les cellules immunitaires (Gahete *et al*, 2014; Kojima et Kangawa, 2005). Ceci suggère que la ghréline pourrait jouer plusieurs fonctions dans ces tissus.

Ainsi, la ghréline joue un rôle dans la libération de l'hormone de croissance en la stimulant, augmente la libération de l'adrénocorticotrophine (ACTH), du cortisol, de la prolactine et diminue la sécrétion d'insuline. La ghréline joue sur la régulation de l'appétit en augmentant la sensation de faim et par conséquent la prise alimentaire. Elle augmente également la glycémie et l'adiposité. Au niveau de l'estomac, la ghréline augmente les sécrétions acides, la motilité et le renouvellement de la muqueuse gastrique. Au niveau cardiaque, cette hormone diminue la pression sanguine (Gahete *et al*, 2014; Kojima et Kangawa, 2005).

La ghréline intervient dans l'homéostasie du glucose. Des études chez les rongeurs et l'humain ont montré que la ghréline inhibe la sécrétion d'insuline (Broglio *et al*, 2001; Dezaki, 2013; Dezaki *et al*, 2004; Reimer *et al*, 2003). Chez des souris mises à jeun, la veille, l'administration de ghréline exogène par injection intrapéritonéale a permis d'augmenter la glycémie dans les 30 minutes après injection (Dezaki *et al*, 2004).

Les traitements avec des inhibiteurs du récepteur GHSR1a entraînent une augmentation de la sécrétion d'insuline et une diminution de la glycémie (Dezaki *et al*, 2004). Les mêmes observations ont été recueillies en utilisant des inhibiteurs de la GOAT (Barnett *et al*, 2010). Dans ces études, on peut voir que l'effet hyperglycémique de la ghréline est aboli par l'utilisation d'un antagoniste du récepteur à cette hormone, le [D-Lys³]-GHRP6, confirmant que l'action de la ghréline sur l'homéostasie du glucose se fait par l'intermédiaire de ce récepteur situé à la surface des cellules β pancréatiques. Ainsi, le mécanisme proposé pour expliquer la signalisation initiée par la ghréline au niveau des cellules β pancréatiques est le suivant. La ghréline se fixe sur son récepteur GHSR1a à la surface des cellules β . Le récepteur GHSR1a, couplé aux protéines G, va utiliser la sous unité $G\alpha_{12}$ (Dezaki *et al*, 2007). Il s'en suit l'ouverture des canaux K^+ /voltage dépendants (KV2.1), ce qui a pour effet d'atténuer la dépolarisation de la membrane plasmique,

empêchant ainsi l'entrée de Ca^{2+} par les canaux calciques. La concentration en Ca^{2+} restant faible, elle ne permet pas l'exocytose des granules de sécrétion contenant l'insuline (Figure 8) (Dezaki *et al*, 2007; Dezaki *et al*, 2008).

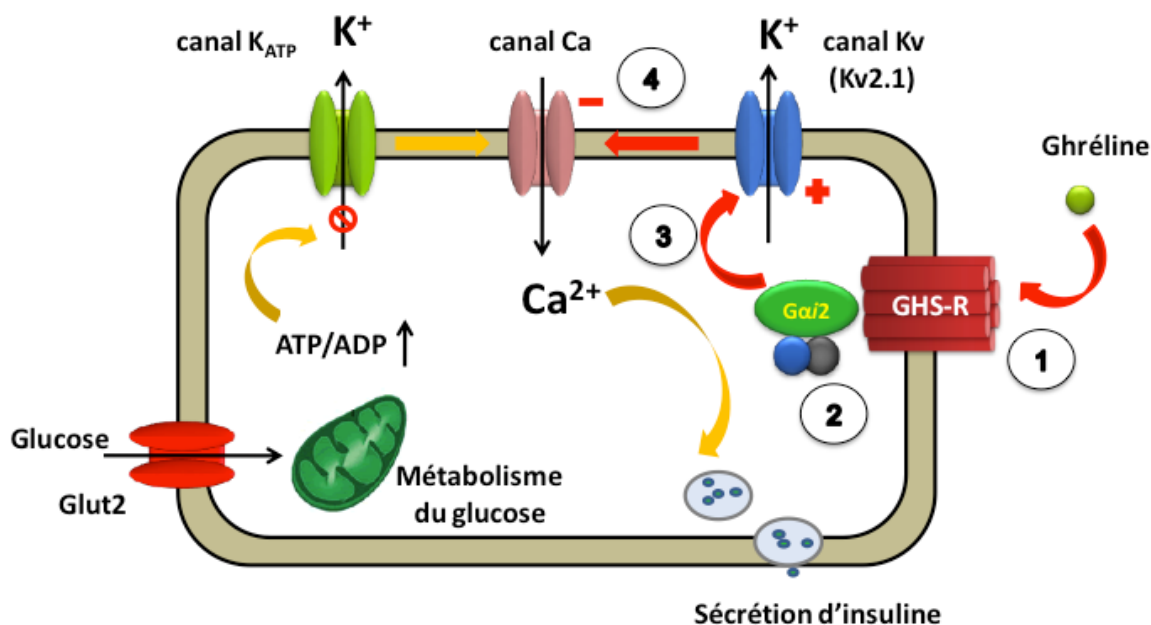


Figure 8 : Mécanismes d'action intracellulaires de la ghréline sur la cellule β pancréatique. Adapté de (Dezaki *et al*, 2008) après obtention de l'autorisation par l'éditeur.

Contrairement aux attentes liées aux rôles connus de la ghréline, les souris où le gène codant pour la ghréline a été invalidé présentent une taille et une croissance normale ainsi que des taux de GH normaux. La composition corporelle, la densité osseuse, le poids, la prise alimentaire ainsi que les rythmes circadiens sont comparables aux souris contrôles (Sun *et al*, 2003; Wortley *et al*, 2004). De plus, les souris mutantes mises à jeun présentent une diminution des taux de leptine et d'insuline circulants de façon comparable aux souris contrôles. Le traitement de l'information alimentaire semble intact chez les souris mutantes.

Les souris où le récepteur *Ghsr1a* n'est plus produit présentent, elles aussi, une croissance et un développement normal, et ne montrent pas de modulation de l'appétit ni de leur composition corporelle (Sun *et al*, 2004). Les souris mutantes mises à jeun présentent une diminution des taux de leptine et d'insuline circulantes comparable aux souris contrôles. Cependant, les taux d'IGF1 et la masse des souris mutantes sont diminués montrant l'implication de la ghréline dans l'anabolisme (Kojima et Kangawa, 2005; Sun *et al*, 2004). Ces souris ont également un quotient respiratoire plus bas que les souris contrôles et leur activité locomotrice est également diminuée.

Pour étudier le rôle de la ghréline et de son récepteur *Ghsr* dans l'instauration de l'obésité, des animaux contrôles et mutants soit pour le *Ghsr* ou la ghréline ont été nourris durant 10 semaines avec de la nourriture grasse. Le gain de poids relatif n'est pas significativement différent entre les animaux mutants et contrôles respectifs (Albarran-Zeckler *et al*, 2011; Sun *et al*, 2008). L'invalidation de la ghréline ainsi que de son récepteur n'aide donc pas à prévenir l'obésité (Sun *et al*, 2008). Les taux de ghréline totale et active sont réduits lorsque les animaux mutants sont nourris avec une alimentation grasse (Sun *et al*, 2008). De plus, la glycémie n'est pas affectée chez les souris mutantes pour le *Ghsr* et nourries avec de la nourriture grasse. Le jeun chez les animaux nourris avec de la nourriture régulière entraîne une diminution de la glycémie et des taux d'insuline chez les animaux *Ghsr* mutants en comparaison aux contrôles (Sun *et al*, 2008). Il semble donc que chez la souris adulte, les fonctions métaboliques primaires de la ghréline seraient de moduler la sensibilité au glucose plutôt que régir le métabolisme énergétique.

Le rôle de la ghréline a également été étudié chez les souris déficientes pour la leptine. Les souris *ob/ob* sont des souris obèses qui développent un diabète de type 2 (Moinat *et al*, 1995; Muzzin *et al*, 1996). Afin de vérifier si l'obésité et le diabète de type 2 des souris *ob/ob* étaient liés à la ghréline, un modèle de souris de double délétions pour les gènes de la leptine et de la ghréline fut généré. Le phénotype hyperphagique de ces souris demeure inchangé mais la glycémie est diminuée en comparaison aux souris contrôles (Sun *et al*, 2006).

Une autre approche pour étudier le rôle de la ghréline a également été abordée. La ghréline n'est active qu'une fois octanoylée. Cette octanoylation sur la sérine en position 3 de la ghréline est attribuée à l'enzyme GOAT. Un modèle murin visant à invalider l'enzyme GOAT a été élaboré. Les souris mutantes nourries avec une diète régulière ou riche en gras ne diffèrent pas des souris contrôles en ce qui concerne leur poids, leur prise alimentaire et le contrôle de la glycémie. Néanmoins, sous restriction calorique, les souris mutantes présentent une hypoglycémie (Zhao *et al*, 2010).

5.7 La Somatostatine

La somatostatine (SST) est un peptide qui a été décrit pour la première fois comme un inhibiteur de la GH (Brazeau *et al*, 1973) et de la *thyroid-stimulating hormone* (TSH) produite par l'hypophyse (Bacha *et al*, 1983). Deux formes actives ont été reconnues : une forme de 14 acides aminés, SST-14, isolée à partir d'extraits hypothalamiques et une forme de 28 acides aminés, SST-28, provenant d'extraits intestinaux et de cerveaux (Barnett, 2003). Une forme de 25 acides aminés, SST-25, a également été rapportée. La SST provient d'une préprohormone de 116 acides aminés constituée d'un peptide signal de 24 acides aminés qui sera clivé pour donner une prohormone de 92 acides aminés. Les SST-14 et SST-28 seront ensuite clivés (Kumar et Grant, 2010).

La production de SST se fera par les cellules du système nerveux central et périphérique, la thyroïde, le thymus, la rétine, le nerf optique, le placenta, les glandes salivaires, la prostate, les reins, l'intestin et la partie endocrine du pancréas au niveau des cellules δ . La sécrétion de la SST est stimulée par le glucagon, la diminution d'insuline, la sécrétine, la gastrine, la CCK et le VIP (Konturek, 1994; Kumar et Grant, 2010).

Les actions de la SST mettent en jeu des récepteurs spécifiques, présents à la surface des cellules cibles. Ce sont les SSTRs. Actuellement on dénombre 6 sous-types de SSTRs : SSTR1, 2a, 2b, 3, 4 et 5 (Csaba *et al*, 2012; Hoyer *et al*, 1995). Les SSTRs font partie de la famille des récepteurs couplés aux protéines G. Ces récepteurs interagissent avec plusieurs types de protéines G (Csaba et Dournaud, 2001).

Les fonctions de la SST sont : l'inhibition de la sécrétion de la GH, de la TSH, de la prolifération cellulaire et des sécrétions pancréatiques comprenant l'insuline, le glucagon, le polypeptide pancréatique, les bicarbonates et les enzymes pancréatiques. Au niveau du tractus intestinal, la SST va inhiber la sécrétion de gastrine, de sécrétine, de cholecystokinine (CCK), du VIP, du GIP, de la motiline, de la neurotensine, des acides gastriques et de la bile. De plus, la SST va inhiber la motilité, la vidange gastrique, la contraction de la vésicule biliaire et son flux. L'absorption du glucose, du fructose, du galactose, du lactose, des acides aminés, du calcium et des triglycérides par l'épithélium intestinal se verra également altérée par la SST. Cette hormone perturbera également la prolifération cellulaire, inhibera la thyroxine, la calcitonine et les sécrétions rénales de rénine. On notera également des modifications au niveau du système nerveux central (Barnett, 2003).

6 Hypothèse et objectifs du projet de recherche

Le facteur de transcription HNF1 α exprimé dans le foie, le pancréas, les reins, l'estomac, l'intestin grêle et le côlon, intervient dans la régulation de la glycémie. En effet, il a été démontré que des mutations du gène codant pour ce facteur peuvent conduire à un diabète non insulino-dépendant MODY3 chez l'homme. Une hyperglycémie est aussi observée chez les souris où la protéine Hnf1 α a été invalidée.

Notre but est dans cette étude d'étudier le rôle de Hnf1 α dans la régulation de l'homéostasie du glucose.

Notre hypothèse est que la perte de Hnf1 α entraîne un dérèglement hormonal qui conditionne la dérégulation de la glycémie chez les souris mutantes comparativement aux souris contrôles. Hnf1 α promeut le diabète par l'intermédiaire d'hormones intestinales.

Pour répondre à cette hypothèse, nous nous sommes fixés trois objectifs de recherche.

Le premier objectif sera de caractériser les modulations hormonales lors de la perte de Hnf1 α . Dans le cadre de cet objectif nous nous proposons, tout d'abord, de caractériser les différents acteurs hormonaux impliqués dans le contrôle de la glycémie. Dans le modèle murin dont nous disposons, à savoir le modèle généré par l'équipe du Dr Gonzalez (Lee *et al*, 1998), nous étudierons tout d'abord l'expression des marqueurs cellulaires correspondants. Nous quantifierons les niveaux d'expression des transcrits. Nous nous intéresserons aux différents types cellulaires responsables de la production des hormones au sein de l'appareil digestif par des marquages renseignant leur nombre et leur localisation. Pour cela nous réaliserons des expériences d'immunofluorescence. Une fois cela établi, nous procéderons au dosage des facteurs hormonaux mis en évidence. Nous évaluerons l'impact des modulations hormonales sur le mécanisme de régulation de la glycémie.

Le deuxième objectif sera d'étudier l'inhibition de la sécrétion d'insuline par l'intermédiaire de la ghréline. Pour réaliser cela, nous évaluerons l'effet d'un traitement basé sur l'utilisation d'un antagoniste du récepteur à la ghréline Ghsr1a sur l'homéostasie du glucose des souris mutantes comparativement aux souris contrôles.

HNF1 α étant un facteur de transcription, le troisième objectif de recherche sera de documenter le rôle de ce dernier dans la régulation transcriptionnelle du gène codant pour la ghréline. Nous utiliserons pour cela un modèle cellulaire approprié, les cellules de souris MIN6, permettant l'étude du mécanisme transcriptionnel du gène ghréline. Nous procéderons à des expériences d'infections lentivirales avec un shARN dirigé contre le transcrit Hnf1 α dans un premier temps. Dans un deuxième temps, nous mènerons une étude bioinformatique du promoteur du gène ghréline pour la prédiction des sites potentiels de liaison du facteur de transcription que nous vérifierons par des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine.

Matériel et Méthodes

1 Le modèle de souris mutantes $Hnf1\alpha^{-/-}$

Les souris $Hnf1\alpha^{-/-}$ ont été obtenues du Dr Lee (Institut de biologie moléculaire, Taiwan) (Lee *et al*, 1998). Les souris mutantes et les souris contrôles ont été traitées conformément au protocole portant le numéro 102-10B et approuvé par le comité d'éthique de la Faculté de médecine et des sciences de la santé de l'Université de Sherbrooke en accord avec le conseil canadien de protection des animaux (CCPA). Les animaux sont élevés dans l'unité de souris transgéniques, en conditions permettant l'absence de pathogènes. Elles sont testées régulièrement pour *helicobacter*, *pasteurella* et les novovirus murins. Les souris sont nourries ad libitum et vivent dans une pièce éclairée durant 14 heures par cycle diurne. Au cours des différentes manipulations nécessitant des prélèvements ou des sacrifices, celles-ci sont mises à jeun 16 heures avant prélèvement ou expérimentation. Pour certaines expériences spécifiques, les souris sont logées de façon individuelle dans des cages métaboliques. Les informations sur la prise alimentaire et de boisson, la quantité des fèces ainsi que le volume des urines sont récoltées à 8 heures, le matin.

1.1 Sacrifice des souris

Lors du sacrifice, les souris sont anesthésiées à l'aide de kétamine supplémentée en xylazine (Rogar STB, Pointe Claire-Dorval, QC, Canada) et administrée par injection intrapéritonéale, à raison de 1 μ L par gramme de souris. Une fois les souris endormies, elles sont sacrifiées par dislocation cervicale suivi du prélèvement des différents tissus : pancréas, estomac, jéjunum proximal et iléon. Lors des ponctions cardiaques, l'animal est sacrifié immédiatement après la ponction.

1.2 Génomique des souris

Un orteil est sectionné aux souris conformément au code mis en place pour permettre leur identification. Cet orteil sera conservé à -20°C jusqu'à son utilisation. Le protocole d'isolement de l'ADN génomique est exécuté conformément aux instructions de la trousse *Genomic DNA Solution Set* (GerardBIOTECH, Oxford, USA). La digestion sera assurée par la protéinase K (Roche Applied Science, Indianapolis, IN).

Le protocole d'amplification par PCR est détaillé dans les tableaux 2, 3 et 4. L'appareil S1000™ Thermal Cycler (Biorad, Mississauga, Canada) fut utilisé pour les amplifications. Les produits de PCR sont ensuite visualisés sur gel d'agarose 1,6%.

Tableau 2 : Mélange réactionnel de PCR.

Réactifs	Volumes
Eau	14,54 µL
Tampon 10X (New England Biolabs, Ipswich, MA)	2 µL
dNTPs (25 mM)	0,16 µL
amorces HNF1 gen up (20 µM)	1 µL
amorces HNF1 gen dw (20 µM)	1 µL
TAQ DNA polymérase (New England Biolabs, Ipswich, MA)	0,3 µL
ADN	1 µL
Volume final	19 µL

Tableau 3 : Amorces utilisées pour le génotypage des souris mutantes.

Amorces	Séquences
HNF1 gen up	TCCCCAGCTCCAATGTAAAC
HNF1 gen dw	GCCAAACAGAGGGGTAGGTT

Tableau 4 : Programme PCR.

Températures	Temps
<i>Hot start</i> 94°C	
94°C	3 minutes
94°C	30 secondes
56°C	30 secondes
72°C	2 minutes
72°C	2 minutes
4°C	∞

1.3 Extraction d'ARN totaux à partir de tissus

Tous les instruments sont nettoyés à l'alcool 90% et *RNase Away*TM (ThermoScientific, Wilmington, USA) avant et après utilisation. Une fois la section de tissu prélevée, en général un petit carré de 2 x 2 mm, elle est placée dans un tube de 2 mL et plongée dans de l'azote liquide. Juste avant de la broyer grâce au Polytron (Kinematica AG Luzerne, Suisse), un volume de 1 mL de *denaturation solution* du kit *Totally RNA* d'Ambion (Invitrogen, Burlington, Canada) est ajouté. Le tissu est polytroné et une fois broyé, plongé dans l'azote liquide. Les tubes seront décongelés sur glace avant utilisation. Un mL de phénol IAA est ajouté (Invitrogen, Burlington, Canada) et mélangé durant 1 minute par inversion puis laissé 5 minutes sur glace. Nous centrifugeons 5 minutes à 12000 rpm à 4°C. La phase aqueuse est alors récupérée dans un nouveau tube puis 100 µL d'acétate de sodium à 3M (Invitrogen, Burlington, Canada) sont ajoutés, le tout est alors bien mélangé durant 1 minute. 1 mL de phénol chloroforme acide est ajouté (Invitrogen, Burlington, Canada) et mélangé de nouveau avant de laisser 5 minutes sur glace puis de centrifuger 5 minutes à 12000 rpm à 4°C. La phase aqueuse est une nouvelle fois récupérée dans un nouveau tube avant d'y ajouter 1 mL d'isopropanol froid. Après une incubation d'une heure à -20°C, les tubes sont centrifugés 15 minutes à 12000 rpm à 4°C. Le culot est par la suite dissous dans 100 µL d'eau DEPC additionnée de 50 µL de LiCl (Invitrogen,

Burlington, Canada) et incubé 1 heure à -20°C . Le culot est précipité durant une centrifugation de 15 minutes à 12000 rpm à 4°C . Les culots sont nettoyés avec 300 μL d'éthanol 70% et centrifugés 5 minutes à 12000 rpm. Cette étape est répétée une deuxième fois et les culots sont alors séchés à 75°C pendant 5 minutes. Les culots sont dissous dans 50 à 100 μL d'eau DEPC. Un traitement à la DNase (Roche Diagnostics, Laval, Canada) est ensuite effectué pour éliminer l'ADN génomique contaminant. Ce traitement est effectué sur les échantillons à l'exception des échantillons pancréatiques. Les ARNs en solution sont dosés au Nanodrop (ThermoScientific, Wilmington, USA) puis conservés à -80°C .

1.4 Réaction de rétro transcription (RT)

Les ARNs sont chauffés à 75°C durant 5 minutes pour dénaturer les structures secondaires de l'ARN, puis déposés rapidement sur glace pendant 5 minutes. Les échantillons sont ensuite centrifugés 30 secondes à vitesse maximale. Un volume de 10 μL du mélange réactionnel est alors ajouté à chaque échantillon selon le tableau 5.

Tableau 5 : Mélange réactionnel de RT.

Mélange réactionnel :	Volumes
Tampon AMV-RT 5x (Roche Diagnostics, Laval, Canada)	4 μL
Eau DEPC	0,7 μL
dNTPs (25 mM)	0,8 μL
Oligonucléotides p(d)T (0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$; 1,2 μg)	2,4 μL
Inhibiteur d'ARNases (40 U/ μL ; 24 U) (Roche Diagnostics, Laval, Canada)	0,6 μL
Enzyme AMV-RT (20 U/ μL ; 30 U) (Roche Diagnostics, Laval, Canada)	1,5 μL

Une incubation d'une heure à 42°C est alors menée suivie d'une incubation de 5 minutes à 95°C pour inactiver la reverse transcriptase.

1.5 PCR quantitatif (qPCR)

Les échantillons provenant de la transcription inverse sont dilués 20 fois. Les réactions de PCR quantitatif ont été réalisées dans des capillaires *LightCycler*[®] (Roche Diagnostics, Laval, Canada). Les réactions d'amplification sont effectuées avec la trousse *Quanti-Tect*[®] *SYBR Green PCR* (QIAGEN, Mississauga, Canada) en duplicata. Le mélange réactionnel pour qPCR est préparé selon le tableau 6.

Tableau 6 : Mélange réactionnel de qPCR.

Réactifs	Volumes
<i>Quanti-Tect SYBR Green PCR Master Mix</i>	10 µL
Amorce Up (10 µM)	1 µL
Amorce Dw (10 µM)	1 µL
Eau <i>Rnase, Dnase free</i>	6 µL

Le mélange réactionnel est alors réparti à raison de 18 µL dans chaque capillaire, puis 2 µL de chaque échantillon d'ADN sont alors ajoutés. Le tout est centrifugé et l'expérience est lancée à l'aide de l'appareil *LightCycler*[®] 2.0 *RT-PCR* (Roche Diagnostics, Laval, Canada). Les gènes de référence *TBP* et *PBGD* sont utilisés au cours des expérimentations et les amorces utilisées pour réaliser les expériences de qPCR sont listées dans le tableau 7.

Tableau 7 : Séquences des amorces utilisées pour les réactions de qPCR.

Amorces	Séquences
r/mHnf1a 1560 Up	CTATCAGCAGCCTCTCATGC
r/mHnf1a 1790 Dw	GCCTCTGTGTCTGAGGTGAA

Hnf1b Forward	ACAATCCCCAGCAATCTCAGAA
Hnf1b Reverse	GCTGCTAGCCACACTGTTAATGA
h/r/mTBP 1009 Up	GGGGAGCTGTGATGTGAAGT
h/r/mTBP 1139 Dw	GGAGAACAATTCTGGGTTTGA
rmPBGD 459-F	CCTCCTGGCTTTACTATTGGA
rmPBGD 608-R	TAGCTGAGCCACTCTCCTCAG
Ghrl Up	AGCCCAGCAGAGAAAGGAATC
Ghrl Dw	GGGAGCATTGAACCTGATCTC
r/mGLP1 233 up	TGATGAACACCAAGAGGAACC
r/mGLP1 343 dw	CCTGGCCCTCCAAGTAAGA
Sst 185	CCCAGACTCCGTCAGTTTCT
Sst 304	CAGGGCATCATTCTCTGTCTG
Gip 79	GGCTAGGGGACACAATCTAGG
Gip 192	GGATCGGAACTCAACCTCTTC
mIns1 sense	CACTTCCTACCCCTGCTGG
mIns1 antisense	ACCACAAAGATGCTGTTTGAC
mGIPR sense	CCTGTAACGGTTCCTTCGATATG
mGIPR antisense	ACACTGGCGGAAGACAAAGC
Dpp4 Forward	GATTTGTGGACAGCAAGCGA
Dpp4 Reverse	ACCCTCCATATGACCAGCCC
ChIP ghresites 1-2-1 up	CATCTGCATCTCCACAATGG
ChIP ghresites 1-2-1 dw	CAGGGCCTTGTTTTTGGTAG
ChIP ghresite 3-1 up	GGATATCATGGGGCTCTGAA
ChIP ghresite 3-1 dw	ATGTCTTTCTGGGGCAGTGT
ChIP ghresites 4-5 up	CTGGATGGCAAGGTATGTGA
ChIP ghresites 4-5 dw	AGGACAGAAAGCCTGTGCAT
ChIP ghresite 6 up	TCCACCTGTTTTTGGTCTTGG
ChIP ghresite 6 dw	GATGGAAAAGGCACCAGAAA
ChIP ghresites 7-8-9-10-1 up	GCCCCTGGACTTAAACACTG
ChIP ghresites 7-8-9-10-1 dw	CCTTGCTGCTTGGGTTTTAG
ChIP ghremet200 up 1	CACAGGGACCATGGAGAATC

ChIP ghremet200 dw 1	CACATCCGGTAGCCTCATCT
ChIP ghremet200 up 2	CAGGCATTCCAGGTAAGCTC
ChIP ghremet200 dw 2	AGGCAGACAGAGCCTGATGT

1.6 Extraction de protéines totales à partir de tissus

Des segments (jéjunum proximal, iléon, pancréas et estomac) d'environ 3 mm de longueur sont récupérés, placés dans des tubes de 2 mL et plongés dans de l'azote liquide. Une solution de lyse est ajoutée aux échantillons au moment de polytroner (Tableau 8). Les échantillons sont alors polytronés, jusqu'à obtenir un liquide homogène, puis replongés dans l'azote liquide et conservés à -80°C jusqu'à leur utilisation.

Tableau 8 : Tampon de lyse.

Solutions	Concentrations finales
Triton X-100 (Fisher Scientific, Mississauga, Canada)	1%
Tris-HCl pH 7,5 (Fisher Scientific, Mississauga, Canada)	50 mM
NaCl (Fisher Scientific, Mississauga, Canada)	100 mM
EDTA pH 8,0 (Sigma Aldrich, Oakville, Canada)	5 mM
B-Glycérophosphate (Sigma Aldrich, Oakville, Canada)	40 mM
NaF (Sigma Aldrich, Oakville, Canada)	50 mM
Orthovanadate (Sigma Aldrich, Oakville, Canada)	200 µM
Glycérol (Fisher Scientific, Mississauga, Canada)	5%
Inhibiteurs 1000X PIC (P8340) (Sigma Aldrich, Oakville, Canada)	5%
PMSF 100X (Sigma Aldrich, Oakville, Canada)	5%

1.7 Fixation des tissus pour coupes histologiques

Les tissus sont fixés dans une solution de paraformaldéhyde 1% frais à 4°C durant 24 heures. Les tissus sont ensuite lavés avec de l'éthanol 70% et peuvent être conservés jusqu'à un mois à 4°C. Les échantillons sont par la suite traités par la plateforme d'histologie et de microscopie électronique de l'Université de Sherbrooke où ils seront inclus dans des blocs de paraffine puis tranchés en coupes histologiques de 5 µm d'épaisseur à l'aide d'un microtome *Spencer 820* (American Optical Company).

1.8 Immunofluorescences

Tout d'abord, les lames sont chauffées à 60°C pendant 15 minutes. Une succession de lavages est ensuite réalisée : 2 fois dans le xylène pendant 5 minutes, 2 fois dans l'éthanol 100% pendant 2 minutes, 2 fois dans l'éthanol 95% pendant 1 minute, une fois dans l'éthanol 80% pendant 1 minute et enfin une fois dans l'éthanol 70% pendant 1 minute. Les lames sont ensuite rincées dans l'eau pendant 1 minute. Le recouvrement des antigènes est ensuite effectué par immersion des lames dans 600 mL de tampon acide citrique monohydrate 10 mM à pH 6,0 chauffé 11 minutes 30 secondes au micro-onde et laissé refroidir dans le tampon acide citrique pendant 10 minutes. Les lames sont ensuite rincées durant 10 minutes avec de l'eau, suivi de 2 lavages au PBS 1X de 5 minutes. Le blocage est ensuite effectué pendant 45 minutes avec l'agent bloquant contenant du PBS 1X, 0,2% de Triton X100 et 2% de BSA. L'agent bloquant est par la suite retiré sans rincer. L'anticorps primaire est alors dilué (Tableau 9) dans la solution de blocage et les lames sont incubées avec celui-ci pendant 2 heures à température pièce. Les lames sont ensuite rincées 5 fois au PBS 1X pendant 5 minutes chaque fois. L'anticorps secondaire fluorescent (Vector Laboratories Inc., Burlingame, USA) est dilué au 1/200^e dans la solution de blocage et les lames en sont recouvertes pour 45 minutes à température ambiante dans une chambre humidifiée. Quatre rinçages au PBS 1X sont effectués pendant 5 minutes chacun. Les lames sont alors asséchées sous la hotte. Le montage des lames est effectué avec le *Vectashield Hardset* contenant du DAPI (Vector Laboratories Inc., Burlingame, USA) et des lamelles de taille appropriée. L'observation est faite au microscope à lampe fluorescente.

Tableau 9 : Anticorps et dilutions utilisés lors des expériences d'immunofluorescences.

Anticorps	Dilutions	Références et compagnies
Hnf1 α	1/200 ^e	sc-6547 Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA
Ghréline	1/100 ^e	sc-10368 Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA
GIP	1/100 ^e ou 1/50 ^e	sc-23554 Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA
Somatostatine	1/200 ^e	sc-7819 Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA
Insuline	1/200 ^e	sc-9168 Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA

1.9 Prise de la glycémie sanguine

La glycémie est prise après avoir fait une incision sur la queue de l'animal permettant d'obtenir un volume de 3 à 5 μ L de sang. Nous utilisons le glucomètre et les bandelettes *FreeStyle Lite*[®] (Laboratoires Abbott, Limitée, Saint-Laurent, Québec, Canada).

1.10 Prise de la glycosurie

La glycémie urinaire est mesurée directement dans le récipient prévu à cet effet dans les cages métaboliques ou au niveau de la sortie de l'appareil urinaire des animaux par l'intermédiaire des bandelettes urinaires *Chemstrip 10*[®] (Roche Diagnostics, Laval, Canada). La concentration est déterminée selon une échelle colorimétrique fournie par le fabricant.

1.11 Traitement des souris avec l'antagoniste au récepteur à la ghréline GHSR1a

Nous utilisons le composé suivant : (D-Lys3)-GHRP6 (Bachem Americas, Torrance, USA) solubilisé dans une solution de saline de manière à injecter 200 nmoles/L pour un volume final de 100 μ L en injection intrapéritonéale. Le traitement se fait aux 12 heures pendant 6 jours.

1.12 Récolte du sérum et stockage

La souris est anesthésiée et ensuite immobilisée à l'aide de ruban adhésif sur le dos. Le sternum est repéré et un déplacement de 5 à 10 mm vers le côté gauche de la souris est effectué afin de désinfecter la portion identifiée. Le prélèvement se fait avec une seringue de 3 mL montée avec une aiguille 25 G 3/8. Le piston est légèrement retiré pour permettre un appel d'air et ainsi faciliter le prélèvement. L'aiguille est alors rentrée au travers des côtes de l'animal avec un angle d'environ 45°. Le piston est tiré doucement afin de récolter le sang. Lorsque le volume de sang prélevé est suffisant, la seringue est retirée et l'animal disloqué. Le sang est alors transféré dans un tube de 1,5 mL et restera à température pièce pendant 30 minutes avant d'être centrifugé 15 minutes à 4°C. Le sérum, alors situé au dessus des hématies, est récupéré et réparti en volumes nécessaires pour effectuer les tests voulus. Dans le cas de l'étude de la ghréline, une solution de PEFABLOC SC (Roche Diagnostics, Laval, Canada) est immédiatement ajoutée afin d'obtenir une concentration finale de 1 mg/mL. Les sérums obtenus après centrifugation sont acidifiés avec du HCl de concentration finale 0,05 N. Pour les sérums servant à étudier le GIP et le GLP1, l'inhibiteur de DPP4 (Millipore, Billerica, USA) est plutôt ajouté dès que le sang est récolté dans le tube.

2 Test immuno-enzymatique ELISA

Plusieurs types d'hormones ont été quantifiés en suivant les procédures conformément aux données des différents fournisseurs de plaques ELISA (Tableau 10).

La procédure générale des manipulations se déroule comme suit. La plaque fournie, où est fixé un anticorps monoclonal dit « de capture » dirigé contre l'hormone désirée est lavée avec un tampon de lavage adéquat. L'échantillon contenant l'antigène est alors appliqué à la plaque. Après une incubation, un lavage de la plaque est effectué pour éliminer l'antigène non-lié et les molécules non-spécifiques. Une solution contenant des anticorps conjugués à l'enzyme, comme la *horseradish peroxidase* (HRP) ou bien un anticorps de détection qui sera détecté par une enzyme couplée à la HRP et reconnaissant la fraction Fc de l'anticorps de détection, est ajoutée. Après une nouvelle incubation, la plaque est rincée une deuxième fois. Une solution contenant un substrat convertible par l'enzyme en signal fluorescent est ajouté. Le résultat est alors analysé par spectrophotométrie grâce à l'appareil *Molecular Devices VERSAmax Tunable Microplate Reader* aux longueurs d'ondes souhaitées. Les résultats sont traités avec le logiciel *Softmax Pro V5*.

Tableau 10 : Kits ELISA utilisés

Hormone testée	Référence
Ghréline (totale)	EZRGRT-91K (Millipore, Billerica, USA)
Ghréline (active)	EZRGRA-90K (Millipore, Billerica, USA)
GIP (total)	EZRMGIP-55K (Millipore, Billerica, USA)
GLP-1 (active)	EGLP-35K (Millipore, Billerica, USA)
Somatostatine	EKE-060-03 (Phoenix Pharmaceuticals, Burlingame, USA)
DPP4	E9088Mu 96 tests (Uscn Life Science Inc., Burlington, Canada)
Leptine	EZML-82K (Millipore, Billerica, USA)
Insuline	EZRMI-13K (Millipore, Billerica, USA)
Insuline	90080 (CrystalChem, Downers Grove, USA)
Glucagon	DGCGO (R&D Systems, Burlington, Canada)

3 Culture cellulaire

La culture cellulaire est effectuée en respectant des pratiques stériles. Une enceinte biologique à flux laminaire *Labconco Delta serie Class II* assurant un débit d'air horaire par m² de 1620 m³/heure pour une vitesse de 0,45 m/s (Labconco, Kansas City, USA) désinfectée et traitée aux U.V. est utilisée. Les bouteilles et tout le matériel nécessaire sont pré-nettoyés avec de l'éthanol 70%. Les cellules sont mises en culture à 37°C, 5% de CO₂.

3.1 Cellules MIN6

Les cellules MIN6 proviennent du laboratoire de la Professeure Marie-Josée Boucher (Département de médecine, Université de Sherbrooke). Ce sont des cellules β originaires d'insulinomes de souris transgénique C57BL/6 exprimant une construction promoteur-insuline/antigène T (Ishihara *et al*, 1993; Miyazaki *et al*, 1990). Ce sont des cellules adhérentes, formant le plus souvent des îlots cellulaires. Ces cellules ont la particularité d'exprimer les transcrits et protéines pour l'insuline, le glucagon, la somatostatine et la ghréline (Nakashima *et al*, 2009).

Les cellules sont cultivées dans du milieu DMEM (WISSENT Inc, St-Bruno, Canada) avec faible concentration de glucose (1 g/L), supplémenté de 10% de sérum de veau fœtal (FBS) (ICN Biomedicals, Aurora, USA) et 100 μ g/mL de pénicilline/streptomycine (Gibco BRL, Life Technologies Inc, Burlington, Canada). Le milieu de culture est changé à tous les 2 jours. Les passages sont effectués 1 dans 2 en utilisant la trypsine à concentration de 0,05% EDTA 1X (Gibco BRL, Life Technologies Inc, Burlington, Canada).

3.2 Cellules HEK293T

Les cellules HEK293T (ATCC, Manassas, VA) sont des cellules transformées de rein fœtal humain (Aiello *et al*, 1979). Elles sont adhérentes avec une morphologie épithéliale d'origine rénale et expriment l'antigène SV40 T. Elles sont cultivées dans du milieu DMEM (WISSENT Inc, St-Bruno, Canada) supplémenté de 10% de sérum de veau

foetal (FBS) (ICN Biomedicals, Aurora, USA), 2 mM de glutamine, 0,01 mM de tampon HEPES (Gibco BRL, Life Technologies Inc, Burlington, Canada) et 100 µg/mL de pénicilline/streptomycine (Gibco BRL, Life Technologies Inc, Burlington, Canada). Le changement de milieu sera fait tous les 2-3 jours. Elles sont utilisées pour la production de lentivirus.

3.3 Production lentivirale

Les cellules HEK293T sontensemencées la veille de façon à obtenir une confluence de 90% le jour de la transfection. Pour chaque Pétri de 100 mm, les mélanges d'ADN appropriés sont préparés : 6 µg de vecteurs de production lentiviraux plp1, plp2 et plpVSVG et 6 µg du vecteur d'expression contenant la construction avec le shRNA adéquat auquel 1,5 mL de milieu OptiMEM (Invitrogen, Burlington, Canada) sans FBS est ajouté. Les shARNs dirigés contre le transcrite Hnf1 α ont été préparés via la trousse « HNF1 homeobox A : NM_009327 MISSION[®] shRNA Bacterial Glycerol Stock » (Sigma Aldrich, Oakville, Canada). Le shARN contrôle (shNT) est caractérisé pour ne cibler aucun transcrite et a été préparé à partir du « shRNA MISSION[®] pLKO.1-puro Non-Mammalian shRNA Control Plasmid DNA » (Sigma Aldrich, Oakville, Canada). 48 µL de Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Burlington, Canada) sont ajoutés à 1,5 mL de milieu OptiMEM dans un tube de propylène et incubés 5 minutes à température pièce. Cette solution d'agent de transfection est ajoutée à la préparation d'ADN et le tout est incubé durant 20 minutes à température pièce. Le milieu de culture des HEK293T est alors remplacé par 5 mL de milieu OptiMEM sans FBS. Au bout des 20 minutes d'incubation, les préparations d'ADN/agent de transfection sont ajoutées goutte à goutte aux boîtes de Pétri de 100 mm et incubées durant 4 heures. Le milieu est alors remplacé par 8 mL de milieu approprié aux cellules HEK293T. Le milieu de culture, contenant les virus en suspension, est recueilli 2 jours plus tard à l'aide d'une seringue de 10 mL, puis filtré avec un filtre 0,45 µm. Les virus sont conservés à -80°C.

3.4 Infection lentivirale

Les cellules MIN6 sont ensemencées la veille dans des plaques de 6 puits à une confluence de 70-75% afin d'obtenir des cellules en phase exponentielle de croissance le jour de l'infection. Le lendemain, les virus sont décongelés rapidement à 37°C et du polybrène (Sigma Aldrich, Oakville, Canada) est ajouté à tous les virus pour obtenir une concentration finale de 4 µg/mL. Le milieu des cellules à infecter est alors retiré et la solution de virus est ajoutée sur la paroi du puits. Une incubation d'une heure à 37°C est alors menée avant de rajouter une solution de milieu de culture adéquat supplémenté de polybrène à 4 µg/mL. Les cellules sont trypsinisées 48 heures après l'infection où 2 puits de 35 mm d'un même type d'infection sont mis en commun pour une boîte de Pétri de 60 mm. La sélection est amorcée avec la puromycine à une concentration finale de 2 µg/mL. Cette sélection se fait de 7 à 10 jours pour atteindre au moins 60-70% de confluence avant l'extraction des protéines, de l'ARN ou l'immunoprécipitation de la chromatine.

3.5 Extraction des ARN totaux et transcription inverse

Les extractions d'ARN ont été effectuées à l'aide de la trousse RNeasy (Qiagen, Mississauga, Canada) en suivant les directives détaillées dans le protocole du détaillant. Un traitement à la DNase (Roche Diagnostics, Laval, Canada) a ensuite été effectué pour éliminer l'ADN génomique contaminant. Le dosage des ARN est effectué à l'aide du Nanodrop (Thermoscientific, Wilmington, USA). Les échantillons sont alors conservés à -80°C.

Pour la réaction de transcription inverse, nous procédons comme décrit précédemment avec 2 µL d'ARN pour les expériences réalisées dans des boîtes de Pétri de 10 mm de diamètre ou 1 µg pour les expériences réalisées en boîtes de 60 mm.

3.6 Extraction des protéines totales

L'extraction des protéines est effectuée dans un tampon de lyse « protéines totales » (1% Triton X-100 (Fisher Scientific, Mississauga, Canada), 50 mM Tris-HCl pH 7,5 (Fisher Scientific, Mississauga, Canada), 100 mM NaCl (Fisher Scientific, Mississauga, Canada), 5 mM EDTA (Sigma Aldrich, Oakville, Canada), 40 mM β -Glycérophosphate (Sigma Aldrich, Oakville, Canada), 50 mM NaF (Sigma Aldrich, Oakville, Canada), 5% glycérol (Fisher Scientific, Mississauga, Canada), 200 μ M orthovanadate (Sigma Aldrich, Oakville, Canada), 1% PIC (Sigma Aldrich, Oakville, Canada) et 1% PMSF (Sigma Aldrich, Oakville, Canada). Les cellules sont incubées durant 15 minutes à 4°C dans le tampon de lyse puis centrifugées à 13000 rpm. Les protéines sont ensuite dosées selon la technique de Bradford et les échantillons sont conservés à -80°C.

3.7 Immunobuvardages

Les expériences d'immunobuvardage sont réalisées avec 40 μ g de protéines dans un volume final de 13 μ L complété au besoin avec de l'eau. 5 μ L de NuPAGE LDS (lithium dodecyl sulfate) (Invitrogen, Burlington, Canada) sample buffer 4X et 2 μ L de NuPAGE *reducing agent* (Invitrogen, Burlington, Canada) sont ensuite ajoutés. Les échantillons sont chauffés à 70°C durant 10 minutes et déposés sur gel d'acrylamide NuPAGE 4-12% (Invitrogen, Burlington, Canada) préalablement lavé et déposé dans une cuve de migration contenant le tampon de migration MOPS 1X (50 mM MOPS, 50 mM Tris base, 0,1% SDS, 1 mM EDTA, pH 7,7) où 500 μ L de NuPAGE antioxydant (Invitrogen, Burlington, Canada) est ajouté au tampon de migration juste avant de débiter la migration à 200 volts durant une heure dans l'appareil *XCell SureLock Mini-Cell* (Invitrogen, Burlington, Canada). Une fois la migration achevée, l'électrotransfert se fait sur une membrane de PVDF (Roche Diagnostic, Laval, Canada) à 30 volts maintenus durant une heure dans le tampon de transfert (25 mM Bicine, 25 mM bis Tris, 1 mM EDTA, pH 7,2) supplémenté de NuPAGE antioxydant (Invitrogen, Burlington, Canada). Dès la fin du transfert, la membrane contenant les protéines est bloquée à température ambiante durant une à deux heures par une solution de lait écrémé en poudre à 5% final resuspendu dans une solution de PBS 1X auquel on a rajouté du Tween 0,1% (Sigma Aldrich, Oakville, Canada). Cette étape est suivie d'une incubation sur la nuit à 4°C sous agitation avec l'anticorps primaire

dilué dans la solution de blocage. La membrane est rincée rapidement deux fois dans la solution PBS 1X, Tween 0,1% et lavée deux fois pendant 5 à 15 minutes avec du PBS 1X Tween 0,1%. L'incubation avec l'anticorps secondaire dilué dans la solution de blocage se fait durant une heure sous agitation à température ambiante. La membrane est rincée rapidement deux fois dans la solution PBS 1X, Tween 0,1% pour enfin être lavée pendant 15 minutes avec du PBS 1X Tween 0,1%. La révélation des anticorps liés sur l'antigène sera réalisée en utilisant la trousse ECL Prime (Amersham Biosciences, Québec, Canada) sur la membrane durant une minute suivie d'une exposition dans une cassette au contact de films autoradiographiques (Amersham Biosciences, Québec, Canada).

4 Immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) sur cellules MIN6

2 millions de cellules sont rincées au PBS 1X et ensuite incubées avec 20 mL de PBS contenant 1,1% de formaldéhyde durant 10 minutes à température pièce. La réaction de pontage est ensuite arrêtée par l'ajout d'une solution de glycine 125 mM et une incubation durant 5 minutes. Les cellules sont ensuite rincées 2 fois avec du PBS froid. Les cellules sont grattées et transférées dans un tube Eppendorf qui sera alors centrifugé à 4000 rpm durant 6 minutes à 4°C. Les culots de cellules sont congelés par immersion dans l'azote liquide et conservés à -80°C. Le culot de cellules est resuspendu dans 1 mL de tampon I (0,25% Triton, 10 mM EDTA, 0,5 mM EGTA, 10 mM HEPES pH 6,5 supplémenté avec 1mM de PMSF et 10 µL de cocktail d'inhibiteurs de protéases PIC juste avant l'utilisation). Suite à une incubation de 10 minutes sur glace et d'une centrifugation de 6 minutes à 4000 rpm, le culot est de nouveau resuspendu dans 1 mL de tampon II (200 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0,5 mM EGTA, 10 mM HEPES pH 6,5 supplémenté avec 1 mM PMSF et 10 µL de cocktail d'inhibiteurs de protéase PIC juste avant l'utilisation). Après une centrifugation de 6 minutes à 4000 rpm, le culot est dissous dans 340 µL de tampon de lyse (1% SDS, 10 mM EDTA, 50 mM Tris pH 8,1 supplémenté avec 1 mM PMSF et 10 µL de cocktail d'inhibiteurs de protéase PIC juste avant l'utilisation). Le lysat est alors passé 5 fois dans une seringue avec une aiguille de 23G1 et incubé à 4°C pendant 1 heure avec agitation. Le lysat est par la suite soniqué 5 fois pendant 10 secondes à intensité de 15%

avec une pause sur glace de 3 minutes entre chaque sonication. La taille des fragments d'ADN ainsi générés doit être comprise entre 200 et 300 paires de bases et confirmée par migration de 5 μ L du lysat sur gel d'agarose. Les échantillons soniqués sont alors centrifugés à 12 000 rpm, 10 minutes à 4°C. Une portion du volume total du lysat (5%) est ensuite conservé à 4°C comme référence *input*. Le lysat est dilué dans 10 volumes de tampon de dilution d'immunoprécipitation (0,01% SDS, 1,1% Triton, 1,2 mM EDTA, 16,7 mM Tris pH 8,1, 167 mM NaCl, le tout supplémenté avec 1 mM de PMSF et 10 μ L de cocktail d'inhibiteurs de protéase PIC et pré-incubé avec 20 μ L d'une solution de billes magnétiques couplées à la protéine G (Millipore, Billerica, USA) pendant 4 heures à 4°C sous agitation. Le surnageant est isolé et incubé avec un anticorps primaire spécifique (Tableau 11) à raison de 4 μ g par réaction pendant toute la nuit à 4°C sous agitation.

Tableau 11 : Anticorps utilisés pour les expériences d'immunoprécipitation de la chromatine.

Anticorps	Références
Hnf1 α	sc-6547 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA)
H3K27me3	ABE44 (Upstate, Billerica, USA)
H3K36me3	ab9050 (Abcam, Toronto, Canada)

20 μ L de billes magnétiques sont ajoutées et incubées pendant 2-4 heures à 4°C avec agitation. Les billes-complexes immunologiques sont par la suite séparées par aimantation et rincées par plusieurs lavages successifs de 800 μ L sous agitation de 5 minutes à 4°C dans l'ordre suivant: 2 fois au TSE-150 (0,1% SDS, 1% Triton, 2 mM EDTA, 20 mM Tris pH 8,1, 150 mM NaCl), 3 fois au TSE-500 (0,1% SDS, 1% Triton, 2 mM EDTA, 20 mM Tris pH 8,1, 500 mM NaCl), 2 fois au LiCl (0,25 M LiCl, 1% NP40, 1% DOC, 1 mM EDTA, 10 mM Tris pH 8,1) et 2 fois au TE pH 8,0. L'éluion des complexes s'effectue en ajoutant 200 μ L de 1% SDS/0,1 M NaHCO₃, où les *input* correspondants sont traités de la même manière, suivi d'une incubation de 30 minutes à 65°C avec agitation à l'aide d'un vortex toutes les 2 minutes. Les échantillons sont séparés des billes par aimantation et récupérés dans de nouveaux tubes. La réversion des

pontages se fait sur la nuit à 65°C. Les échantillons sont ensuite traités avec 2 µL de RNase A (stock à 10 mg/mL) durant 30 minutes à 37°C et 5 µL de protéinase K (stock à 20 mg/mL) durant 45 minutes à 37°C. Le pH des échantillons est ajusté en ajoutant 1 mL de tampon PB du kit *High Pure PCR Cleanup Micro* (Roche Diagnostics, Laval, Canada) et 10 µL de 3M NaOAc pH 5,5 et l'ADN récupéré dans un volume final de 50 µL. Les échantillons sont utilisés directement pour les expériences de qPCR comme précédemment détaillé.

5 Statistiques

Les graphiques et calculs de moyennes ainsi que d'écart types ont été effectués en utilisant l'outil bioinformatique GraphPad Prism version 6.0c pour Mac OS X (GraphPad Software, San Diego USA, www.graphpad.com). Les tests de Student non pairés avec intervalles de confiance de 95%, les tests two-way Anova ainsi que les régressions linéaires ont été réalisés à l'aide de ce logiciel (* : $P < 0,05$, ** : $P < 0,01$, *** : $P < 0,001$, **** : $P < 0,0001$).

Résultats

1 La perte de Hnf1 α affecte les niveaux d'expression de marqueurs de cellules entéroendocrines

Dans une précédente étude effectuée au sein de notre laboratoire (Lussier *et al*, 2010), nous avons comparé le profil d'expression des transcrits de gènes du jéjunum des souris Hnf1 α mutantes par rapport aux souris contrôles et ce, par l'utilisation de micropuces à ADN. Cette analyse a permis d'identifier, entre autre, des modulations de gènes impliqués dans le métabolisme du glucose, notamment d'hormones incluant les incrétines qui sont normalement produites par les cellules entéroendocrines.

Nous avons donc procédé à la confirmation des modulations des transcrits des cellules entéroendocrines dans le contexte où le gène Hnf1 α était invalidé. Nous avons réalisé la quantification des niveaux de certains transcrits par des expériences de qPCR dans le jéjunum de souris Hnf1 α ^{-/-} et souris contrôles naissantes et âgées de 4 mois. Les niveaux de transcrits Glp-1 ne varient pas entre les souris mutantes et les souris contrôles que ce soit à la naissance ou à l'âge de 4 mois (Figure 9 A). Pour les niveaux d'expression de Gip, on voit une diminution à la naissance (0,23 +/- 0,08) et à 4 mois (0,65 +/- 0,12) chez les souris Hnf1 α ^{-/-} en comparaison aux souris contrôles (Figure 9 B). Une augmentation des niveaux d'expression du transcrit de la ghréline est observée chez les souris mutantes à la naissance (1,79 +/- 0,23) et à 4 mois (4,30 +/- 0,70) (Figure 9 C). Le transcrit de la Sst est quant à lui diminué seulement à 4 mois chez les souris Hnf1 α ^{-/-} (0,46 +/- 0,08) en comparaison aux souris contrôles et ne varie pas de manière significative à la naissance (Figure 9 D).

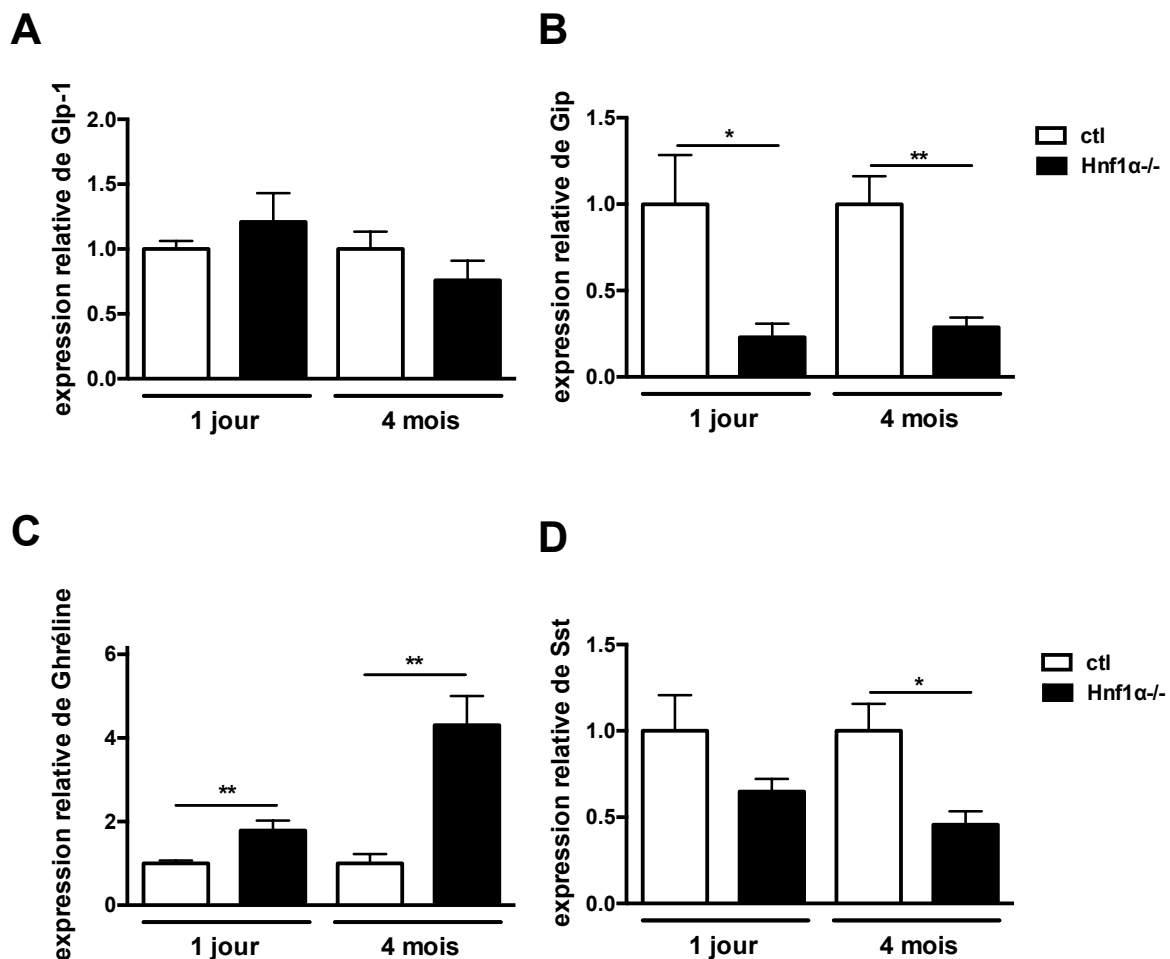


Figure 9 : Expression des transcrits de Glp-1, Gip, Ghréline et Sst dans le jéjunum des souris Hnf1 $\alpha^{-/-}$.

Quantification des niveaux d'expression des transcrits dans le jéjunum des animaux à jeun par qPCR de : A : Glp-1, B : Gip, C : ghréline et D : Sst à la naissance et chez les souris âgées de 4 mois. L'expression des gènes est relativisée à 1 par rapport à celle de TBP (n=5, * ; p<0,05, ** ; p<0,01).

2 Impact de la perte de Hnf1 α sur l'hormone ghréline

La ghréline est une hormone qui stimule l'appétit et qui joue un rôle dans l'homéostasie du glucose en inhibant la sécrétion d'insuline. Nous voulions voir si, en

accord avec les résultats de qPCR obtenus précédemment, les taux de ghréline circulants pourraient être augmentés chez les animaux mutants. Le cas échéant, notre but est de corrélérer si l'hyperglycémie de ces animaux était due à une diminution de la sécrétion d'insuline, à une augmentation de la ghréline circulante.

2.1 La perte de Hnf1 α module la population de cellules entéroendocrines produisant la ghréline

Des expériences d'immunofluorescence réalisées avec un anticorps dirigé contre la ghréline au niveau du jéjunum chez les souris Hnf1 α ^{-/-} âgées de 4 mois ont permis de montrer que le nombre de cellules produisant la ghréline par axe crypte-villosité est augmenté de façon significative chez les animaux mutants (0,82 +/- 0,07) comparativement aux animaux contrôles (0,22 +/- 0,03) (Figure 10).

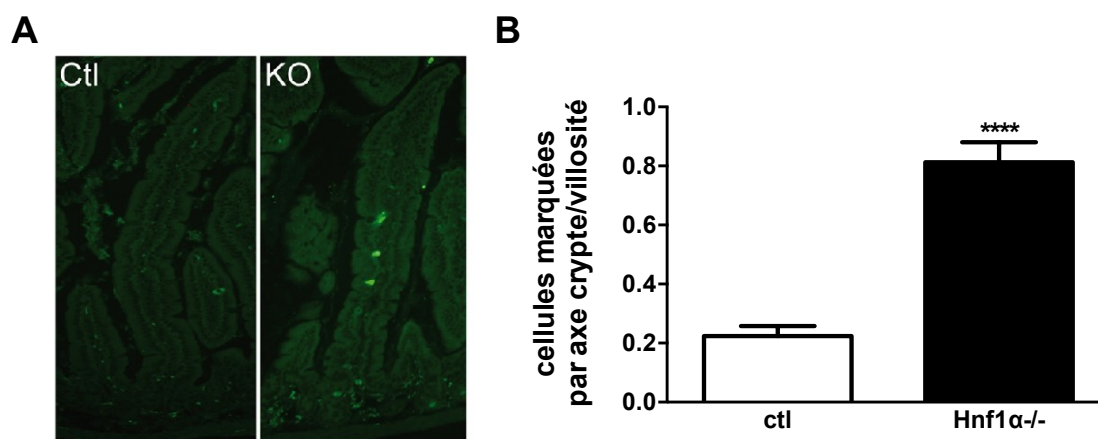


Figure 10: Modulation du nombre de cellules ghréline positives dans le jéjunum proximal des souris Hnf1 α ^{-/-} et contrôles.

A : Immunofluorescences mettant en évidence les cellules ghréline positives. B : Comptage des cellules ghréline positives par axe crypte/villosité et analyse statistique en utilisant le test t. Une quarantaine d'axes crypte/villosité fut dénombrée par souris chez un nombre total de 6 individus (**** ; p<0,0001).

2.2 La perte de Hnf1 α module la production de ghréline circulante

Nous avons par la suite mesuré les taux sérologiques de ghréline totale ou spécifiquement acylée (bioactive) chez des souris Hnf1 α ^{-/-} et des souris contrôles à 1, 4 et 18 mois. Il est à noter que la ghréline dite totale regroupe les 2 formes. Les souris mutantes présentent une augmentation des taux de ghréline totale à tous les âges étudiés. À 1 mois, les animaux contrôles présentent des taux de ghréline totale de 1,94 +/- 0,41 ng/mL alors que les animaux mutants ont des taux de 12,74 +/- 1,76 ng/mL. À 4 mois, ces taux de ghréline totale sont de 3,76 +/- 1,63 chez les contrôles contre 15,65 +/- 1,5 ng/mL chez les mutants. À 18 mois, ces taux relatifs sont de 1,78 +/- 0,52 contre 19,59 +/- 4,45 ng/mL entre les animaux contrôles et les animaux mutants respectivement (Figure 11 A). Il en est de même pour la forme bioactive de la ghréline, avec une augmentation à tous les âges chez les souris mutantes. En effet, à 1 mois, les souris contrôles présentent des taux de ghréline active de 222,70 +/- 29,55 pg/mL alors que les souris mutantes ont des taux de 1096,0 +/- 158,0 pg/mL. À 4 mois, ces taux sont de 206,50 +/- 36,72 pg/mL versus 973,90 +/- 292,60 pg/mL et à 18 mois de 153,90 +/- 22,31 pg/mL versus 430,00 +/- 70,19 pg/mL entre les animaux contrôles et mutants respectivement (Figure 11 B).

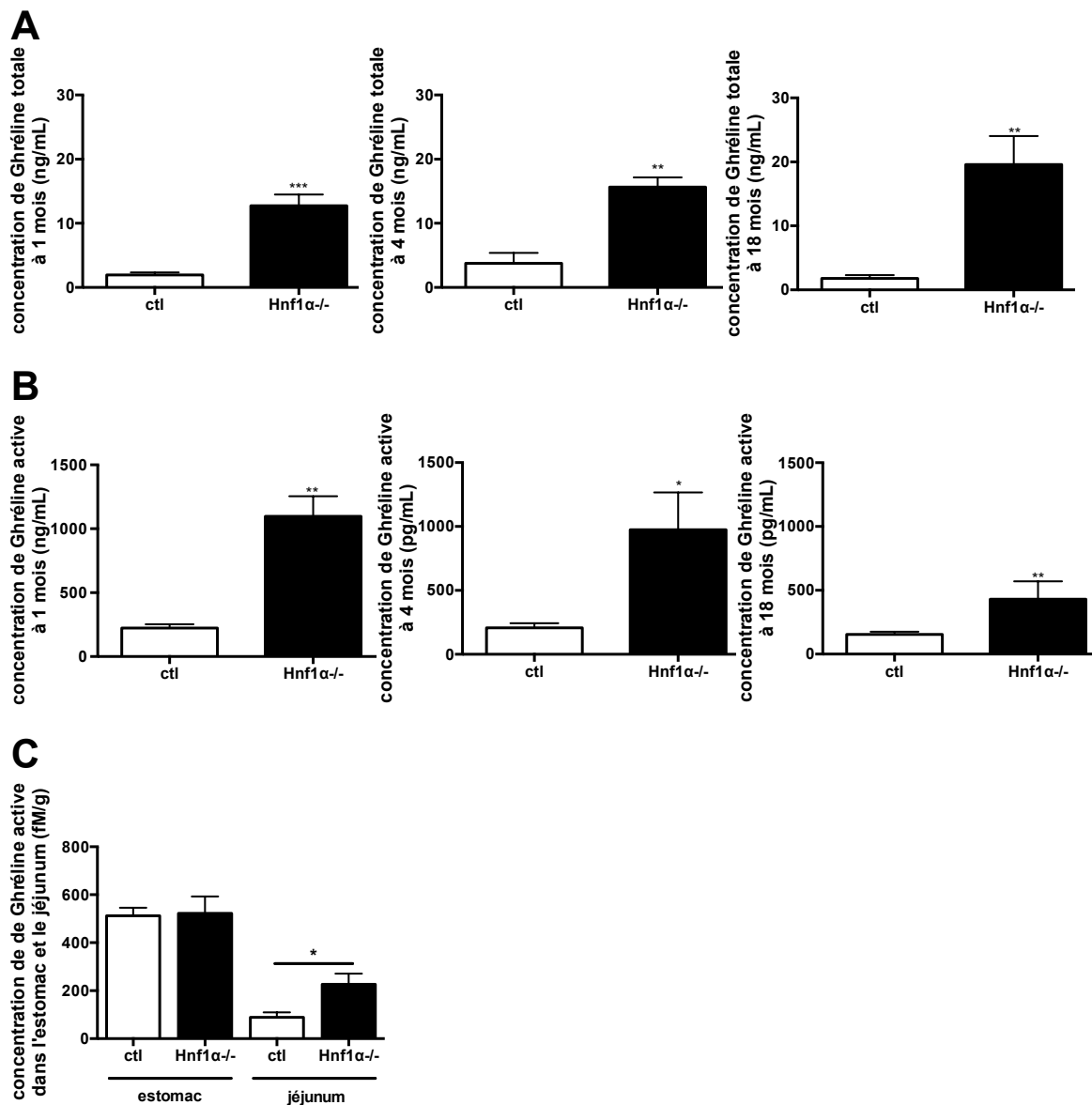


Figure 11: Modulation des taux sérologiques de ghréline totale et de ghréline active chez les souris *Hnf1α*^{-/-}.

A et B: Dosage par ELISA des taux de ghréline totale et ghréline active circulantes contenues dans le sérum, respectivement à 1, 4 et 18 mois (n=4 à 5). C : Quantification par test immunologique ELISA de l'hormone ghréline active présente dans l'estomac et le jéjunum proximal de souris âgées de 4 à 6 mois mises à jeun durant 16 heures (n=6 et n=5 respectivement, * ; p<0,05, ** ; p<0,01, *** ; p<0,001).

Puisque l'estomac représente le site majeur de production de la ghréline, nous avons réalisé des dosages immunologiques de type ELISA pour comparer la production de ghréline active dans des extraits protéiques de l'estomac en comparaison avec des extraits protéiques provenant du jéjunum. On ne dénote aucune modulation entre les taux de ghréline active produite par l'estomac des souris $Hnf1\alpha^{-/-}$ et les contrôles avec des taux de 522,20 +/- 70,72 fM/g et 512,00 +/- 33,42 fM/g de tissu, respectivement. Par contre, le jéjunum des souris mutantes produit plus de ghréline active que celui des souris contrôles. On observe pour les souris mutantes des taux de ghréline active de 226,50 +/- 44,33 contre 88,72 +/- 20,71 fM/g de tissu pour les souris contrôles (Figure 11 C). Une approche similaire a été utilisée afin de mesurer la production de ghréline dans des extraits protéiques isolés du pancréas. Toutefois, nous ne sommes pas parvenus à mesurer des quantités de ghréline active dans ce tissu. L'augmentation de la ghréline active circulante des animaux $Hnf1\alpha^{-/-}$ semble donc corrélérer avec une augmentation de la production au niveau du jéjunum.

Nous avons voulu, par la suite, étudier si la perte de $Hnf1\alpha$ chez les souris modifiait également l'expression du gène ghréline dans les autres organes rapportés comme étant producteurs de celle-ci. Nous avons réalisé des expériences de qPCR à partir d'extraits d'ARN isolés de l'estomac et du pancréas de souris mutantes et contrôles. Au niveau de l'estomac, les souris $Hnf1\alpha^{-/-}$ montrent des niveaux d'expression de la ghréline diminués de près de 60% lorsqu'on les compare aux contrôles (1,00 +/- 0,26 versus 0,39 +/- 0,08) (Figure 12 A). Au niveau du pancréas, on observe une augmentation significative des niveaux d'expression du transcrite de (7,58 +/- 1,69) chez les souris mutantes en comparaison aux souris contrôles (1,00 +/- 0,26) (Figure 12 B).

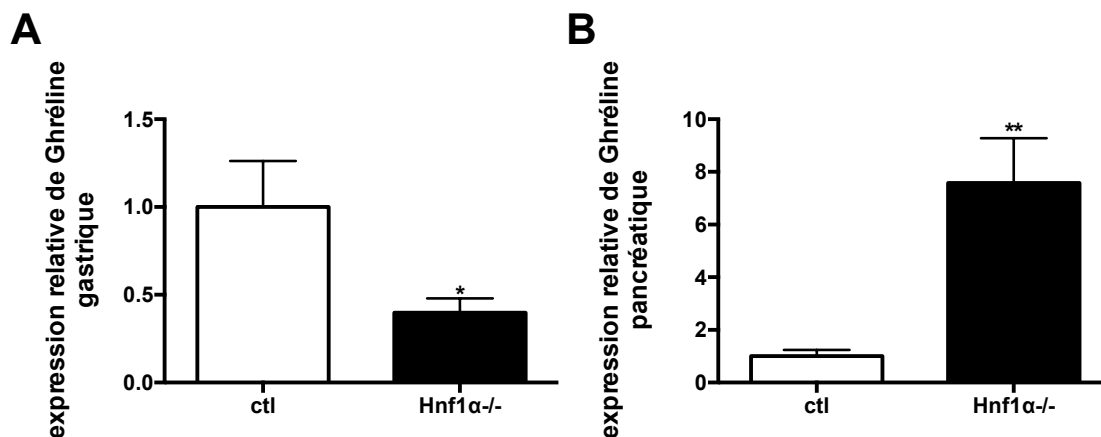


Figure 12 : Expression du transcrit du gène de la ghréline dans l'estomac et le pancréas des souris $Hnf1\alpha^{-/-}$ et contrôles.

L'expression du transcrit du gène ghréline a été mesurée par qPCR dans l'estomac (A) et le pancréas (B) de souris âgées de 4 à 6 mois mises à jeun pour 16 heures. L'expression du gène est relativisée à 1 par rapport à celle du gène TBP dans l'estomac (n=7) et PBGD dans le pancréas (n=8, * ; p<0,05, ** ; p<0,01).

3 Impact de la perte de $Hnf1\alpha$ sur l'hormone Gip et son inhibiteur Dpp4

Le Gip est une hormone qui joue un rôle prépondérant dans l'homéostasie du glucose en favorisant la libération d'insuline lorsque, suite à une prise alimentaire, la glycémie augmente. Nous avons tout d'abord confirmé une diminution du transcrit de Gip dans le jéjunum de nos souris mutantes par qPCR. Nous voulions dans un second temps renseigner les quantités de Gip produites chez nos animaux mutantes et enfin corrélérer l'impact de ces modulations sur la régulation du glucose sanguin.

Des expériences d'immunofluorescence réalisées avec un anticorps dirigé contre l'hormone Gip ont été menées au niveau du jéjunum chez les souris $Hnf1\alpha^{-/-}$ âgées de 4 mois et ont permis de montrer que le nombre de cellules produisant cette incrétine est diminué de façon significative chez les animaux mutantes (Figures 13 A et B).

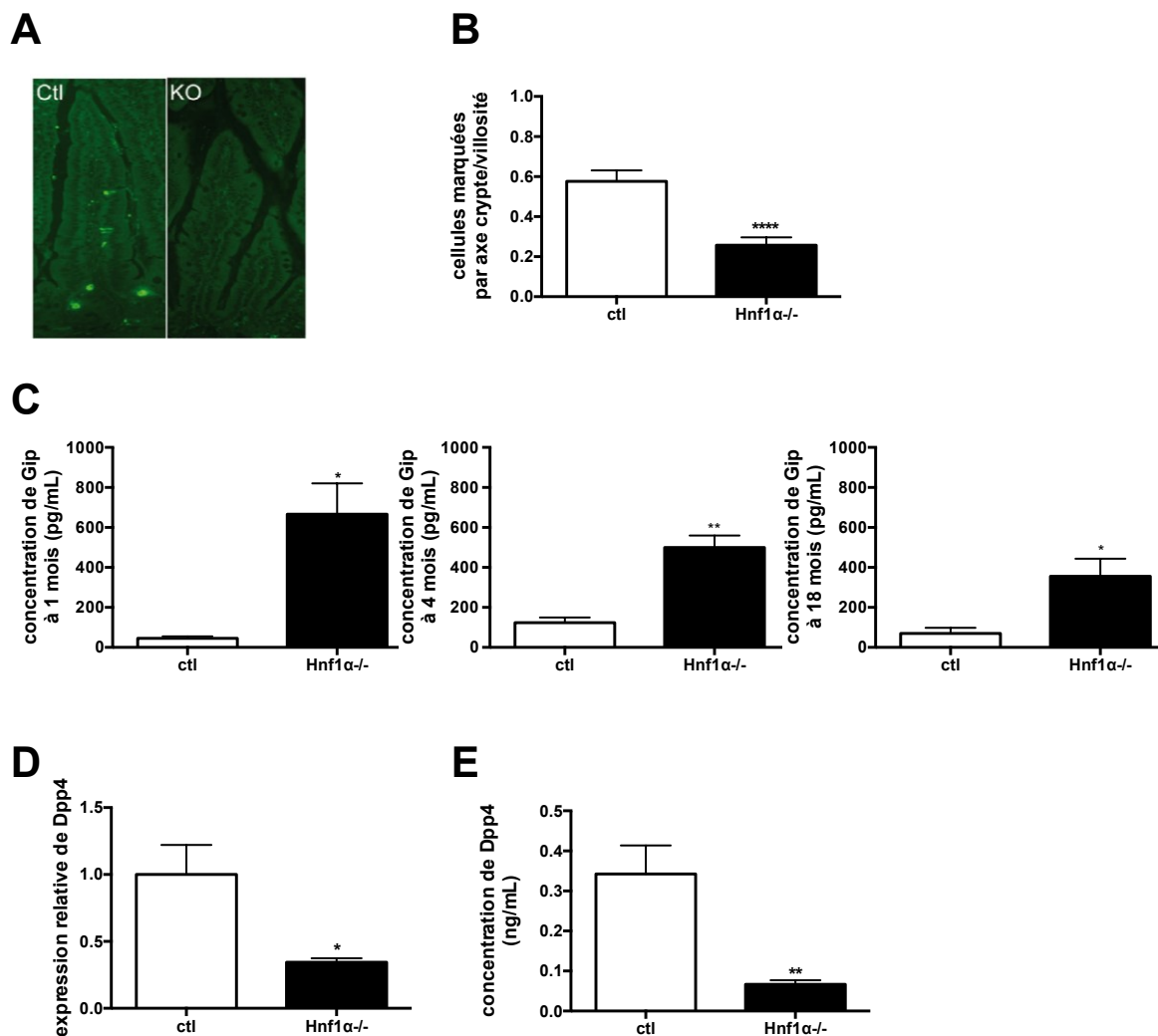


Figure 13 : Modulations de la production de Gip et de son inhibiteur Dpp4 chez les souris $Hnf1\alpha^{-/-}$ et contrôles.

A : Immunofluorescences mettant en évidence les cellules Gip positives dans le jéjunum des souris $Hnf1\alpha^{-/-}$ et contrôles. B : Comptage des cellules Gip positives par axe crypte/villosité et analyse statistique à l'aide d'un test t. Une moyenne de 40 axes crypte/villosité fut utilisée par souris chez un nombre total de 6 individus (**** ; $p < 0,0001$). C : Dosage immunologique ELISA des taux de Gip circulant effectué dans le sérum, respectivement à 1, 4 et 18 mois chez des souris à jeun durant 16 heures ($n=4$ à 5, * ; $p < 0,05$, ** ; $p < 0,01$). D : Diminution de l'expression de Dpp4 dans le jéjunum des animaux mutants. L'expression de la Dpp4 a été mesurée par qPCR dans le jéjunum proximal de souris âgées de 4 à 6 mois. L'expression du gène est relativisée à 1 par rapport

à celle de TBP. E : Diminution des taux de Dpp4 circulants. La quantification est effectuée par un dosage immunologique ELISA des taux de Dpp4 circulante chez des souris âgées de 4 à 6 mois (n=6, * ; $p < 0,05$, ** ; $p < 0,01$).

Nous avons par la suite mesuré les taux sérologiques de Gip chez les animaux mutants et contrôles à l'aide d'un test ELISA. Chez les souris $Hnfl\alpha^{-/-}$, on note une augmentation des taux de Gip circulant comparativement aux animaux contrôles et cela quel que soit l'âge des souris (Figure 13 C). Cette augmentation de Gip circulant contredit la diminution de l'expression du transcrite décelée par qPCR de même que la diminution du nombre de cellules Gip positives dans les animaux mutants.

Puisque Gip est une hormone rapidement dégradée dans le sang par l'action de la Dpp4, nous avons corrélé l'expression de cette dernière. Dans le jéjunum proximal des animaux mutants, nous observons une diminution significative de l'expression relative de Dpp4 de l'ordre de 2,9 fois avec une expression relative de $0,344 \pm 0,03$ pour les animaux mutants (Figure 13 D). Cette diminution est confirmée au niveau sérique puisqu'un dosage de l'enzyme circulante par test ELISA a permis d'observer une diminution significative de la DPP4 entre nos animaux contrôles et mutants avec $0,342 \pm 0,07$ contre $0,067 \pm 0,01$ ng/mL de Dpp4 circulante (Figure 13 E). On peut donc penser que la perte de $Hnfl\alpha$ perturbe la dégradation de Gip en diminuant l'expression et la production de Dpp4 responsable de sa dégradation.

4 Impact de la perte de $Hnfl\alpha$ sur l'hormone Sst

Par des expériences de qPCR, nous avons démontré que dans le jéjunum des animaux $Hnfl\alpha^{-/-}$, les niveaux d'expression du transcrite Sst étaient diminués à 4 mois comparativement aux souris contrôles. Cette hormone intervient dans l'homéostasie du glucose en agissant sur la sécrétion d'insuline et de ghréline. On a ainsi voulu renseigner l'effet de la perte de $Hnfl\alpha$ sur la modulation de la production de Sst et le cas échéant, corréler cela avec la dérégulation de la glycémie.

Nous avons dans un premier temps mesuré les taux sérologiques de Sst chez nos souris mutantes et contrôles âgées de 4 mois à l'aide d'un test ELISA. Chez les souris $Hnf1\alpha^{-/-}$, on note une diminution des taux de Sst circulante comparativement aux souris contrôles (Figure 14 A).

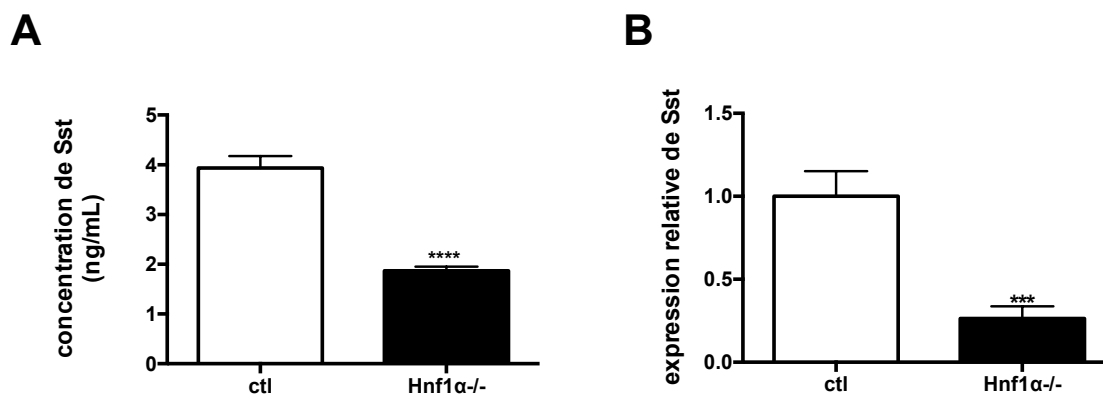


Figure 14 : Quantification de la Sst circulante et des niveaux d'expression du transcrite de la Sst dans le pancréas des animaux mutants et contrôles.

A : Taux circulant de la Sst mesuré par ELISA à 4 mois dans le sérum des souris mises à jeun pendant 16 heures. En blanc sont représentées les souris contrôles et en noir les souris $Hnf1\alpha^{-/-}$ (n=5, *** ; $p < 0,001$). B : Expression du transcrite de la Sst dans le pancréas des animaux contrôles et $Hnf1\alpha^{-/-}$. L'expression du gène est relativisée à 1 par rapport à celle du gène PBGD (n =10, *** ; $p < 0,001$).

Une autre des sources connues de Sst de l'organisme est assurée par les cellules pancréatiques δ . Nous avons étudié les variations des niveaux d'expression du transcrite de la Sst dans le pancréas des souris contrôles et $Hnf1\alpha^{-/-}$ par des qPCR sur des extraits d'ARNs totaux provenant de souris âgées de 4 à 6 mois. On note une diminution des niveaux d'expression du transcrite de la Sst dans le pancréas des souris mutantes (0,2627 +/- 0,07) (Figure 14 B). Cette diminution suit la tendance retrouvée dans le jéjunum de ces animaux en comparaison aux animaux contrôles.

5 Impact de la perte de Hnf1 α sur l'hormone leptine

La leptine est une hormone produite en grande partie par les adipocytes mais une partie de la production est également assurée par l'estomac. Les souris Hnf1 α ^{-/-} sont de petite taille et semblent dépourvues de graisse blanche. La leptine est une hormone contrôlant la prise alimentaire. Nous avons donc voulu établir si les taux circulants de cette hormone étaient modulés. Des tests immunologiques de type ELISA à partir de sérums récoltés d'animaux âgés de 4 à 6 mois ont été effectués. Les souris Hnf1 α ^{-/-} présentent une diminution des taux de leptine circulante (1,828 +/- 0,3269 ng/mL) lorsque elles sont comparées aux souris contrôles (4,647 +/- 0,7768 ng/mL) (Figure 15 A). Cependant, une quantification de l'expression des transcrits de la leptine au niveau de l'estomac ne révèle aucune modification significative entre les animaux mutants et contrôles (Figure 15 B).

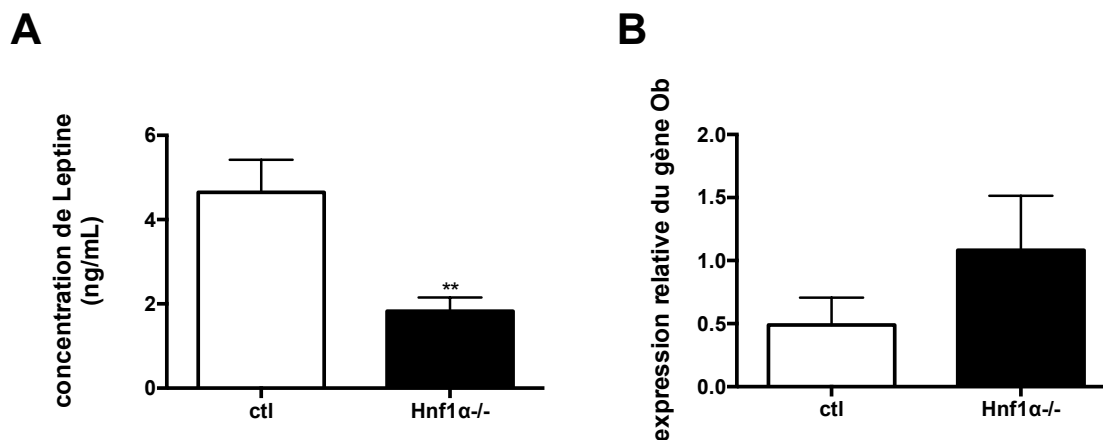


Figure 15 : Impact de la perte de Hnf1 α sur l'hormone leptine.

A : Quantification par test ELISA effectuée à partir de sérums issus d'animaux âgés de 4 à 6 mois mis à jeun pour 16 heures (n=10, ** ; p<0,01). B : Expression du gène codant pour la leptine dans l'estomac. L'expression des transcrits du gène *Ob* a été mesurée par qPCR dans l'estomac de souris âgées de 4 à 6 mois. L'expression du gène est relativisée à 1 par rapport aux transcrits du gène *TBP*. n=6.

6 Impact de la perte de Hnf1 α sur les hormones pancréatiques insuline et glucagon

6.1 Modulations de l'insuline

La ghréline, la SST et le GIP sont des régulateurs de la sécrétion de l'hormone pancréatique hypoglycémisante qu'est l'insuline, et cette dernière joue un rôle indispensable dans l'homéostasie du glucose. Nous avons voulu étudier les modulations de l'insuline. Il est connu que des mutations du gène *HNF1A* chez l'homme (Yamagata *et al*, 1996) et *Hnf1 α* chez la souris mènent à une hyperglycémie. Nous avons voulu dans un premier temps valider que notre modèle murin se comportait de manière analogue à ce qui avait été décrit par le passé.

La mesure de la glycémie à jeun des souris mutantes et contrôles a permis de confirmer l'hyperglycémie due à la perte de Hnf1 α (Figure 16 A). En effet, quel que soit l'âge étudié, les souris Hnf1 α ^{-/-} présentent une glycémie plus importante que les souris contrôles tel qu'il a été rapporté précédemment (Lee *et al*, 1998; Pontoglio *et al*, 1996). Des tests ELISA ont permis de corréliser cette augmentation du glucose circulant à une diminution des taux d'insuline sérologique chez les souris mutantes comparativement aux souris contrôles à 1, 4 et 18 mois (Figure 16 B). L'hyperglycémie est donc liée à une diminution des taux d'insuline circulante chez les animaux mutants. Puisqu'il existe une controverse à savoir si les niveaux de transcrits de l'insuline sont affectés par la perte de Hnf1 α (Parrizas *et al*, 2001; Pontoglio *et al*, 1998; Shih *et al*, 2001), nous avons quantifié les niveaux d'expression du transcrit *Ins1* dans le pancréas des souris mutantes par rapport aux souris contrôles. On observe une diminution importante et significative du transcrit chez les animaux mutants (0,11 +/- 0,04) comparativement aux animaux contrôles (Figure 16 C). Nous avons par la suite réalisé des immunofluorescences afin de comparer de façon qualitative si l'insuline était emmagasinée dans les cellules β pancréatiques chez les animaux mutants par rapport aux animaux contrôles. Nous observons la présence de cellules β pancréatiques positives pour l'insuline chez les souris Hnf1 α ^{-/-} comme on peut le voir chez les souris contrôles (Figure 16 D).

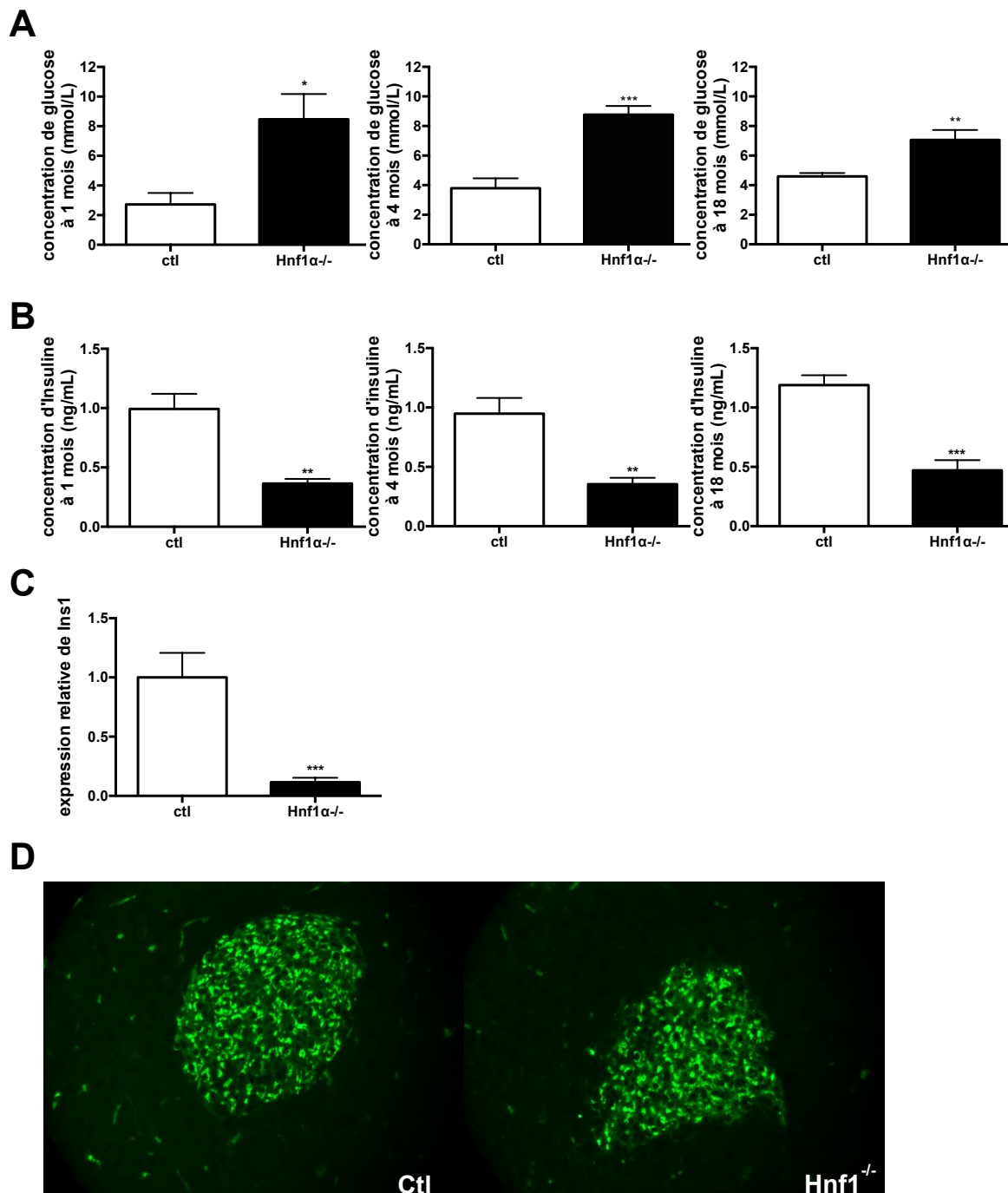


Figure 16 : Mesure de la glycémie et de l'insuline chez les animaux Hnf1 α ^{-/-}.

A : Mesure de la glycémie à jeun à 1, 4 et 18 mois. B : ELISA de l'insuline à 1, 4, et 18 mois à partir du sérum pour, en blanc, les souris contrôles et en noir, les souris Hnf1 α ^{-/-} (n=4 à 5, * ; p<0,05, ** ; p<0,01, *** ; p<0,001). C : Quantification de l'expression du gène *Ins1* dans le pancréas des souris contrôles et Hnf1 α ^{-/-}. L'expression de l'insuline a été

mesurée par qPCR dans le pancréas de souris âgées de 4 à 6 mois. L'expression du gène est relativisée par rapport à celle de PBGD (n=9, *** ; p<0,001). D : Immunofluorescences réalisées sur des coupes de pancréas chez des souris contrôles et souris $Hnf1\alpha^{-/-}$ âgées de 4 à 6 mois avec un anticorps dirigé contre l'insuline. Grossissement 20X.

6.2 Impact de la perte de $Hnf1\alpha$ sur le glucagon

Le glucagon est une hormone pancréatique qui, au contraire de l'insuline, est hyperglycémiant. Tout comme pour l'insuline, nous avons tout d'abord quantifié cet acteur de l'homéostasie au niveau protéique chez nos souris mutantes pour effectuer une comparaison avec les souris contrôles. Pour cela, nous avons réalisé un test immunologique de type ELISA chez des animaux âgés de 4 à 6 mois. Nous n'observons aucune modification de la quantité de glucagon retrouvée dans le sang entre les animaux mutants et contrôles (Résultat non montré).

7 Étude du métabolisme glucidique des souris $Hnf1\alpha^{-/-}$ et de l'impact du traitement avec un antagoniste du récepteur à la ghréline GHSR1a

Nous avons mis en évidence que les souris $Hnf1\alpha^{-/-}$ présentaient des modulations d'hormones impliquées dans la régulation de la glycémie : l'insuline, hormone hypoglycémiant qui diminue conformément à ce qui a été rapporté dans les études précédentes, mais aussi l'incrétine Gip comme décrit par le passé chez les patients atteints de diabète de type 2. La ghréline présente une augmentation de ses taux circulants et notamment la forme bioactive qui est connue pour stimuler l'appétit et inhiber la sécrétion d'insuline. Dans un premier temps, nous avons entrepris d'étudier le comportement alimentaire de ces animaux puis, dans un second, nous avons voulu vérifier si cette augmentation de ghréline pouvait alors expliquer l'hyperglycémie des animaux mutants par une inhibition trop importante de la sécrétion d'insuline par les cellules β pancréatiques.

7.1 Le traitement avec un antagoniste du récepteur à la ghréline permet une diminution de la glycémie chez les souris $Hnf1\alpha^{-/-}$.

Puisque l'augmentation de la ghréline circulante chez les souris mutantes pourrait être la cause de leur hyperglycémie, nous avons entrepris de traiter celles-ci avec un antagoniste de la ghréline, soit le D-(Lys3)-GHRP6. Ce composé agit directement sur le récepteur GHSR1 localisé à la surface des cellules β pancréatiques (Asakawa *et al*, 2003). Comme vu précédemment, les animaux $Hnf1\alpha^{-/-}$ présentent une hyperglycémie avant la première injection du traitement à jour 0 (Figure 17 A). Le traitement à l'antagoniste se traduit par une diminution progressive de la glycémie chez les animaux mutants et ce, dès 48 heures après traitement, pour rejoindre un niveau de glycémie moyen comparable aux animaux contrôles en fin de traitement (Figure 17 A). De plus, l'injection de l'antagoniste n'influence pas la glycémie des souris contrôles tout au long du traitement (Figure 17 A). Afin de déterminer si ce traitement était réversible à plus long terme, une cinétique de mesure de la glycémie a été effectuée chez les souris mutantes post-traitement avec l'antagoniste du récepteur de la ghréline. Le traitement a été effectué durant 6 jours comme précédemment et les mesures de la glycémie ont été effectuées jusqu'à 17 jours post-traitement. On constate que l'arrêt du traitement avec l'antagoniste n'engendre pas un retour immédiat à l'hyperglycémie chez les souris mutantes mais plutôt une augmentation graduelle s'étalant sur une durée d'environ une semaine avant d'atteindre des niveaux comparables de glycémie à ceux mesurés avant le traitement (Figure 17 B). Le traitement à l'antagoniste durant 6 jours permet donc une diminution de la glycémie et cette diminution semble donc persister dans le temps.

Afin d'explorer les mécanismes physiologiques pouvant être responsables du rétablissement de la glycémie suite au traitement des souris $Hnf1\alpha^{-/-}$ avec l'antagoniste, le niveau des hormones impliquées dans l'homéostasie du glucose a été mesuré. Tout d'abord, le traitement des souris mutantes avec l'antagoniste montre une augmentation significative des niveaux circulants de l'insuline (1,08 +/- 0,04 ng/mL) comparativement aux souris mutantes traitées avec une solution saline ayant des taux d'insuline circulante faibles (0,44 +/- 0,05) (Figure 17 C). Il est à noter que ces niveaux deviennent comparables

aux niveaux circulant d'insuline observés chez les souris contrôles (voir Figure 16 B). Les souris mutantes retrouvent donc une capacité accrue de sécrétion de l'insuline et ce, comparativement aux souris mutantes témoins ayant reçu des injections de saline.

Nous avons également voulu mesurer les quantités de Gip circulant chez nos souris mutantes après traitement à l'antagoniste du récepteur à la ghréline. Les souris $Hnf1\alpha^{-/-}$ qui ont reçu un traitement avec une solution saline présentent des taux de Gip circulant élevés (0,69 +/- 0,07 ng/mL) alors que celles ayant reçu le traitement à l'antagoniste voient leur taux de GIP circulant diminuer (0,21 +/- 0.04 ng/mL) (Figure 17 D). Pareillement à ce qui est observé avec l'insuline, ces niveaux deviennent comparables aux niveaux circulant de Gip observés chez les souris contrôles (voir Figure 13 C).

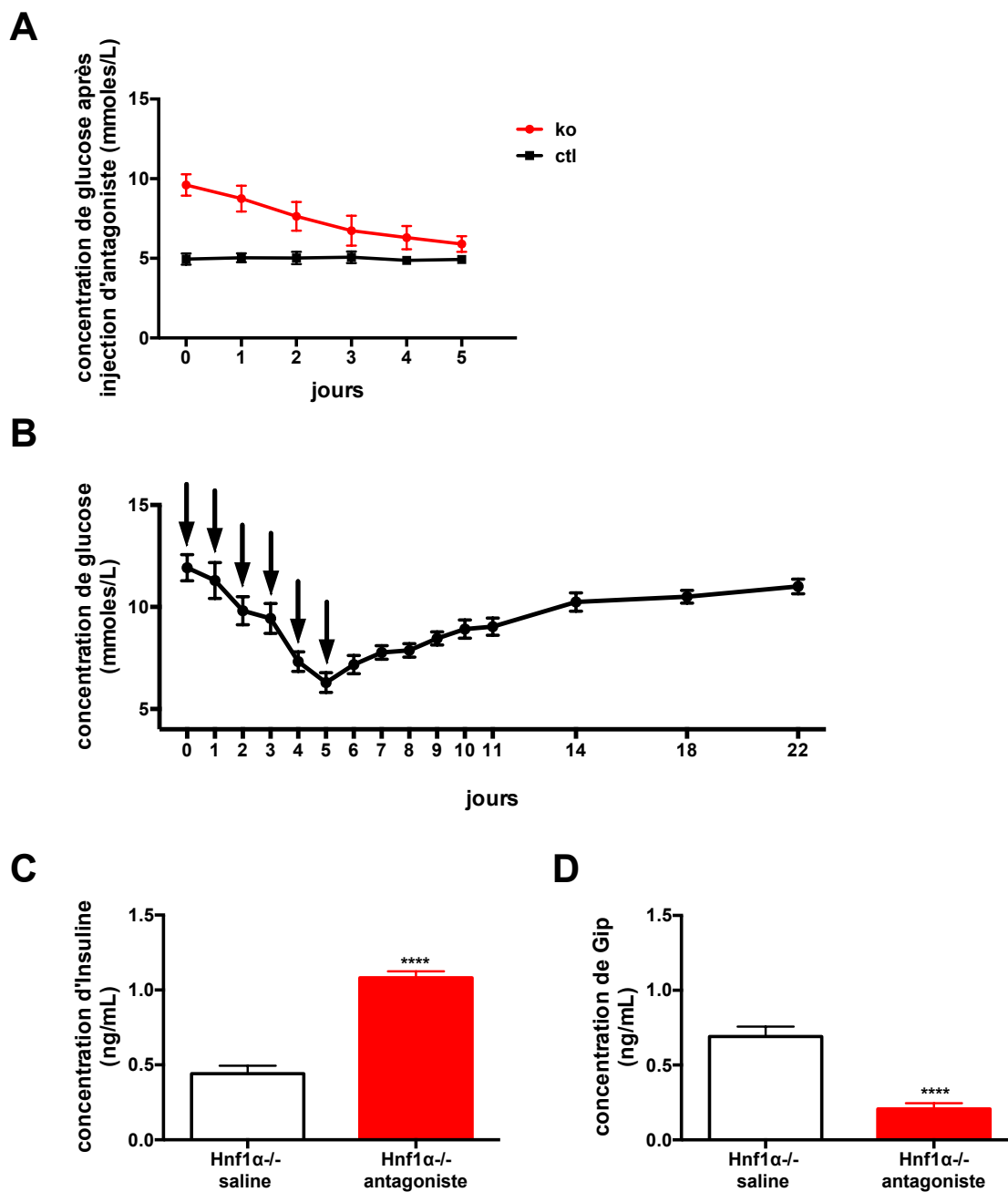


Figure 17 : Modulation de la glycémie, des taux circulants d'insuline et de GIP au cours du traitement à l'antagoniste du récepteur à la ghreline GHSR1a.

A : Le suivi de la glycémie est fait à heure fixe, tous les matins, à l'aide d'un glucomètre. Le traitement à l'antagoniste est effectué 2 fois par jour à raison de 200 nmoles par souris mutantes et contrôles durant 6 jours chez des souris âgées de 4 à 6 mois (n=6) (Test statistique 2way ANOVA : **** ; p<0,0001). B : Test de récupération des souris Hnf1α^{-/-}

après un traitement à l'antagoniste du récepteur GHSR1a. Les flèches indiquent l'administration du traitement pendant les 6 jours. C : Détermination des taux d'insuline circulante chez les souris $Hnfl\alpha^{-/-}$ traitées avec l'antagoniste au récepteur à la ghréline et ceux des souris $Hnfl\alpha^{-/-}$ traitées avec une solution saline. Après un traitement à l'antagoniste du récepteur à la ghréline ou à la saline utilisée comme témoin durant 6 jours, le sang des animaux est récupéré chez les deux groupes de souris mis à jeun durant 16 heures et utilisé pour doser par ELISA l'insuline (n=10, **** ; $p<0,0001$). D : Détermination des taux de Gip circulant chez les souris $Hnfl\alpha^{-/-}$ traitées avec l'antagoniste au récepteur à la ghréline et ceux des souris $Hnfl\alpha^{-/-}$ traitées avec une solution saline. Après un traitement à l'antagoniste du récepteur à la ghréline ou à la saline durant 6 jours, le dosage du Gip est effectué par ELISA à partir du sang des animaux mis à jeun durant 16 heures (n=10, **** ; $p<0,0001$).

7.2 Les souris $Hnfl\alpha^{-/-}$ ont une prise alimentaire qui augmente et présentent des symptômes diabétiques

Nous avons utilisé des cages métaboliques pour mesurer certains paramètres reliés au métabolisme incluant la prise de nourriture, de boisson, le volume des fèces et la production d'urine. Les souris individuellement distribuées dans les cages ont été nourries *ad libitum*. Premièrement, nous avons observé que les souris mutantes consomment 1,60 fois plus de nourriture que les souris contrôles (Figure 18 A). Les souris mutantes produisent aussi plus de fèces que les souris contrôles, avec une augmentation significative de près de 1,71 fois (Figure 18 B). Les souris $Hnfl\alpha^{-/-}$ présentent un débit de prise de boisson augmenté et significatif de 1,97 fois plus important que les souris contrôles (Figure 18 C). Enfin, nous avons mesuré le volume des urines, ou polyurie, des animaux. Les résultats montrent que le volume des urines est significativement augmenté de 1,77 fois chez les animaux mutants comparativement aux contrôles (Figure 18 D). La polydipsie, de même que la polyurie accrues chez les animaux $Hnfl\alpha^{-/-}$ abondent dans le sens de l'état diabétique de ceux-ci.

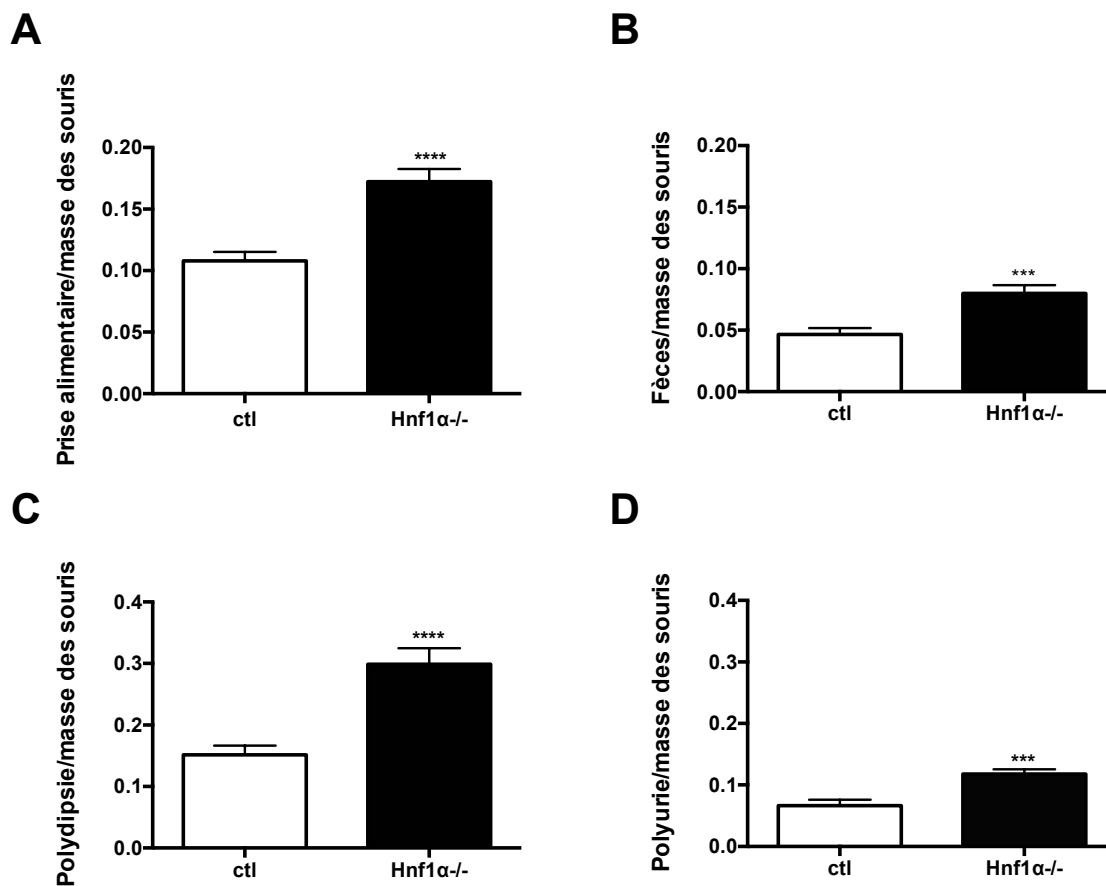


Figure 18 : Détermination de la prise alimentaire, de la prise de boisson et des quantités de fèces et d'urines chez les souris mutantes et contrôles.

Les expériences sont effectuées dans des cages métaboliques où l'animal est seul, avec nourriture et boisson *ad libitum*. Les selles et les urines sont récupérées à heure fixe quotidiennement le matin. Les résultats présentés sont obtenus en faisant la moyenne des données et divisés par la masse de l'animal chaque jour, durant 6 jours (n=6). A : ratios des moyennes de la prise alimentaire en grammes de nourriture par rapport aux masses des souris en grammes. B : ratios de la masse des fèces en grammes par rapport aux masses des souris. C : ratios des moyennes de la prise de boisson en mL d'eau par rapport aux masses des souris. D : ratios des moyennes du volume en mL des urines par rapport aux masses des souris. (* ; p<0,05, ** ; p<0,01, *** ; p<0,001).

Afin de vérifier si le traitement avec l'antagoniste pouvait influencer sur les paramètres métaboliques tels que mesurés précédemment, des traitements avec l'antagoniste au récepteur à la ghréline ont été effectués dans un contexte de cages métaboliques. Au début du traitement, comme vu précédemment (Figure 18 A), les souris $Hnf1\alpha^{-/-}$ consomment de plus grandes quantités de nourriture que les souris contrôles (Figure 19 A). Après 6 jours de traitement, les souris mutantes et les souris contrôles ne présentent pas de différence significative au niveau de leur prise alimentaire. On note également que les souris mutantes ne modifient pas leur prise alimentaire avant et après traitement. Avant traitement les souris mutantes défèquent plus que les souris contrôles (Figure 19 B). Après le traitement il n'y a pas de différence entre les quantités de fèces des souris $Hnf1\alpha^{-/-}$ et les souris contrôles.

La mesure de la prise de boisson révèle que les animaux mutants traités avec l'antagoniste du récepteur diminuent significativement leur consommation de 1,51 fois entre le début et la fin du traitement (Figure 19 C). Les animaux diabétiques boivent donc moins suite au traitement. La mesure du volume des urines révèle que les souris $Hnf1\alpha^{-/-}$ urinent moins en fin de traitement comparativement au début du traitement (Figure 19 D). Il est à noter qu'aucune modification significative des paramètres métaboliques mesurés n'est observée lorsque les animaux contrôles ont été soumis au traitement à l'antagoniste.

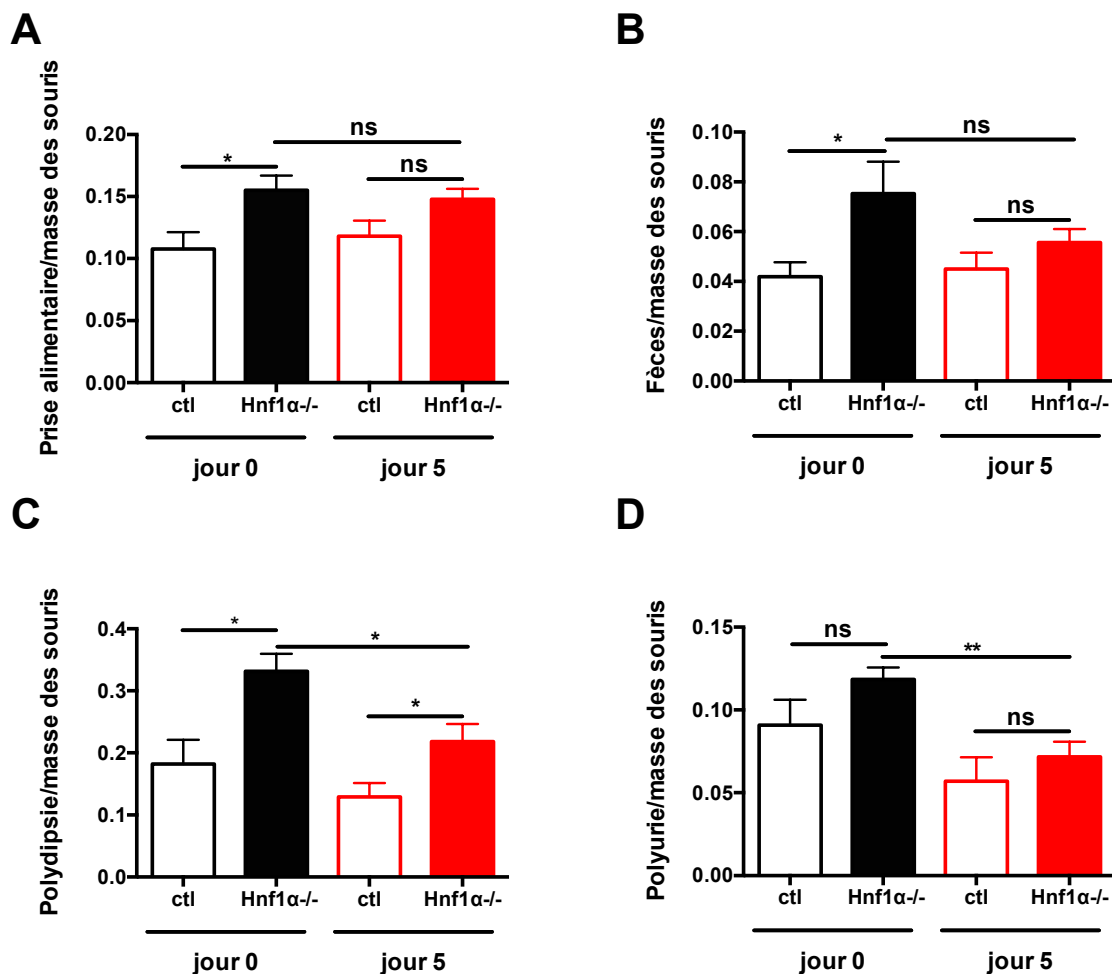


Figure 19 : Suivi de la prise alimentaire, de la quantité de fèces, de la prise de boisson et du volume des urines avant et en fin de traitement à l'antagoniste du récepteur à la ghréline GHSR1a.

Les quantités de nourriture ingérées par les souris Hnf1 α ^{-/-} mutantes et contrôles ont été mesurées dans des cages métaboliques. Les résultats présentés sont obtenus en faisant la moyenne des données et divisés par la masse de l'animal chaque jour, durant 6 jours. A : ratios des moyennes de la prise alimentaire en grammes de nourriture par rapport aux masses des souris en grammes. B : ratios de la masse des fèces en grammes par rapport aux masses des souris. C : ratios des moyennes de la prise de boisson en mL d'eau par rapport aux masses des souris. D : ratios des moyennes du volume en mL des urines par rapport aux masses des souris (n=6,* ; p<0.05, ** ; p<0.01).

7.3 Test de tolérance au glucose par injection intrapéritonéale après traitement à l'antagoniste du récepteur à la ghréline

Nous avons voulu par la suite évaluer le niveau de tolérance des souris mutantes traitées avec l'antagoniste suite à un stress glycémique occasionné par l'injection intrapéritonéale d'une solution de glucose. Nous avons, dans un premier temps, effectué un traitement à l'antagoniste du récepteur à la ghréline sur 4 groupes de 5 souris : un groupe de souris $Hnfl\alpha^{-/-}$ et un groupe contrôle tous traités avec l'antagoniste, un groupe de souris $Hnfl\alpha^{-/-}$ et un groupe contrôles injectés avec une solution de saline. Après 6 jours de traitement, nous avons injecté du D-glucose à raison de 2 g/kg de poids corporel pour chaque groupe d'animaux préalablement mis à jeun pendant une période de 16 heures. La glycémie a été mesurée aux temps 0, 15, 30, 60 et 120 minutes post-injection.

On note que les souris mutantes traitées avec l'antagoniste au récepteur présentent une glycémie d'environ 7 mmol/L contre une glycémie de 11,86 mmol/L chez les souris mutantes traitées avec une solution saline (Figure 20 A). Les souris contrôles traitées avec l'antagoniste ou la solution de saline ne présentent pas de différence entre elles (Figure 20 A). Les souris contrôles appartenant aux 2 groupes réagissent de la même manière à l'injection intrapéritonéale de glucose, montrant un même profil d'induction avec un maximum de glycémie atteint après 15 minutes et presque parfaitement superposable. Les animaux $Hnfl\alpha^{-/-}$ traités avec une solution de saline montrent un maximum de glycémie après 15 minutes suivant l'injection qui atteint 23,92 mmol/L de glucose circulant. Les souris $Hnfl\alpha^{-/-}$ traitées avec l'antagoniste présentent un maximum également à 15 minutes mais atteignant seulement 17,86 mmol/L. Au bout de 120 minutes, les souris mutantes traitées avec l'antagoniste voient leur glycémie redescendre à 8,36 mmol/L alors que celles traitées avec une solution de saline affichent une glycémie constante et très élevée au niveau moyen de 19,58 mmol/L. Les animaux mutants ayant reçu le traitement à l'antagoniste du récepteur à la ghréline montrent donc ici une meilleure tolérance au glucose que les animaux mutants traités avec une solution de saline.

La tolérance au glucose a été évaluée en procédant au calcul de l'aire sous la courbe de chaque groupe sur 120 minutes (Figure 20 B). Les souris $Hnf1\alpha^{-/-}$ traitées avec une solution de saline présentent une aire sous la courbe la plus élevée indiquant que ces souris ont une tolérance au glucose moins importante que les souris $Hnf1\alpha^{-/-}$ traitées à l'antagoniste et que les souris contrôles traitées avec l'antagoniste ou traitées avec une solution de saline. Par ailleurs, on ne dénote pas de différence significative entre les 2 groupes de souris contrôles (Figure 20 B). De même, on ne dénote pas de différence entre les souris $Hnf1\alpha^{-/-}$ traitées avec l'antagoniste au récepteur à la ghréline et les souris contrôles traitées ou non avec l'antagoniste montrant que les souris mutantes ayant reçu le traitement antagoniste ont retrouvé une tolérance au glucose similaire à celle des souris contrôles.

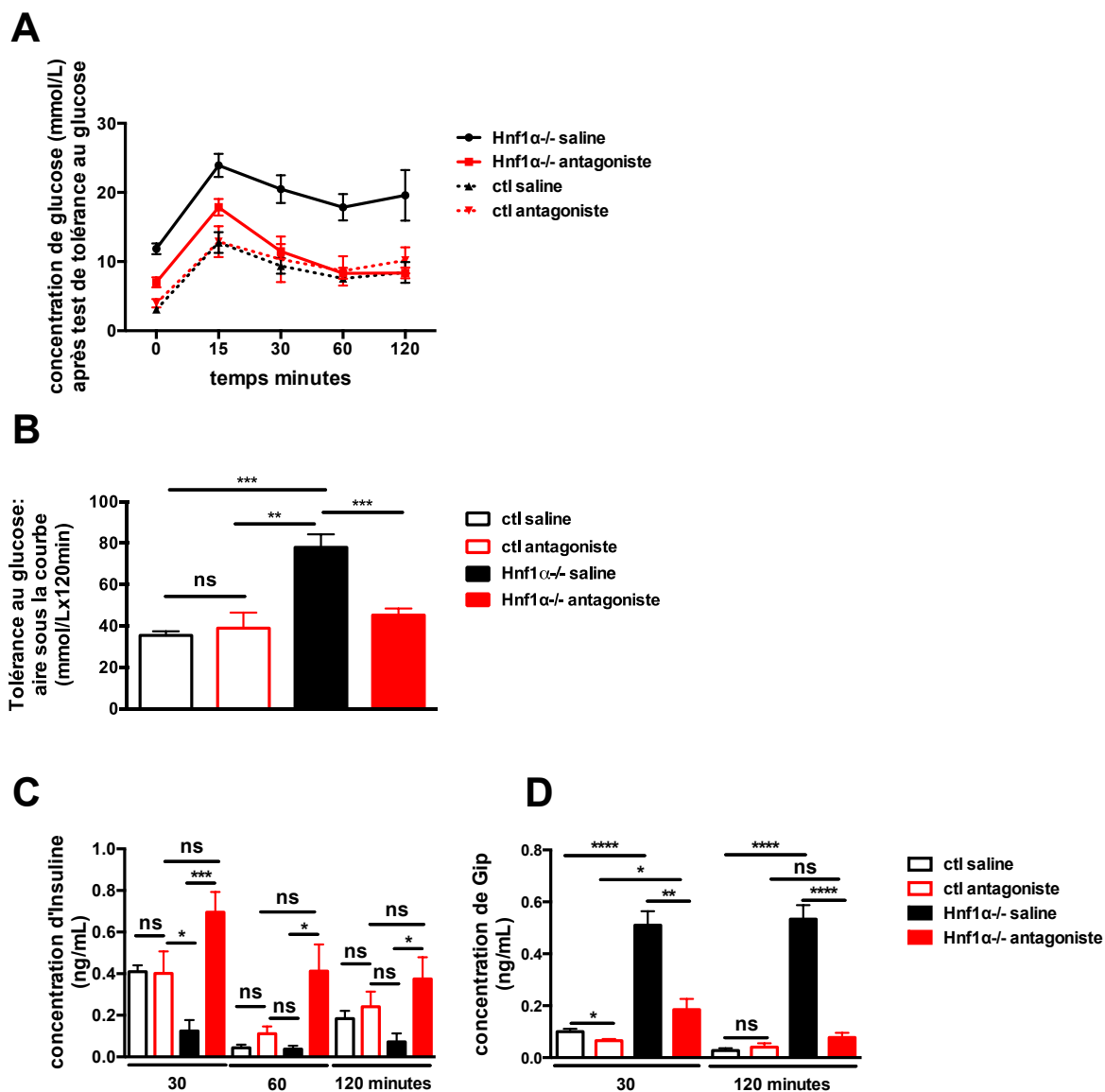


Figure 20 : Tolérance au glucose après traitement avec l'antagoniste du récepteur à la ghréline GHSR1a.

A : Test de tolérance au glucose administré par injection intrapéritonéale. Après traitement de 6 jours avec l'antagoniste ou une solution de saline, les souris sont mises à jeun durant 16 heures, puis injectées avec une solution de D-Glucose pour avoir une concentration finale de 2 g/kg de souris. La glycémie est prise à 0, 15, 30, 60 et 120 minutes à l'aide d'un glucomètre. B : Évaluation de l'aire sous la courbe suivi d'un test One Way ANOVA ($n=5$, ** ; $p<0,01$, *** ; $p<0,001$). C : Suivi des taux d'insuline circulante lors du test de tolérance au glucose. Un dosage par test ELISA de l'insuline fut réalisé à 30, 60 et 120

minutes après l'injection intrapéritonéale de D-glucose à raison de 2 g/kg de poids corporel. La récolte des sangs s'est effectuée par ponction au niveau la veine faciale à 30 et 60 minutes puis ponction cardiaque à 120 minutes. D : Suivi des taux d'insuline circulante lors du test de tolérance au glucose. Un ELISA Gip réalisé à 30 et 120 minutes après injection intrapéritonéale de D-glucose 2 g/kg de souris, récolte de sang par ponction par la veine faciale à 30 minutes puis ponction cardiaque à 120 minutes. (n=5, * ; p<0,05, ** ; p<0,01, *** ; p<0,001, **** ; p<0,0001).

Lors du test de tolérance au glucose, nous avons également effectué des prélèvements sanguins à 30, 60 et 120 minutes permettant de récupérer assez de sérums nécessaires pour effectuer le dosage de l'insuline par ELISA. Les souris contrôles traitées avec l'antagoniste ou encore avec une solution de saline ne présentent aucune différence significative dans les quantités de d'insuline circulante après 30, 60 et 120 minutes (Figure 20 C). Dans le cas des souris $Hnf1\alpha^{-/-}$, on observe des différences notables en fonction de la nature du traitement. La comparaison des taux d'insuline des souris mutantes traitées à l'antagoniste du récepteur à la ghréline avec les taux d'insuline des souris mutantes injectées avec une solution de saline démontre une meilleure sécrétion d'insuline suite au stress glycémique et ce, quel que soit le temps analysé (Figure 20 C). Les souris $Hnf1\alpha^{-/-}$ ayant reçu des injections de saline ne présentent qu'un faible taux circulant d'insuline à tous les temps analysés (Figure 20 C).

En parallèle, nous avons aussi déterminé les taux de Gip circulant dans ce contexte. Les souris contrôles prétraitées avec la saline présentent des taux de Gip circulant qui diminuent entre 30 et 120 minutes suivant l'injection de glucose (Figures 20 D). Nous observons une diminution significative pour les animaux contrôles traités à l'antagoniste à 30 minutes après injection de glucose comparativement aux souris contrôles ayant été traitées avec une solution de saline, alors qu'à 120 minutes, on ne dénote pas de différence entre les animaux contrôles traités ou non avec l'antagoniste (Figure 20 D). Les animaux $Hnf1\alpha^{-/-}$ qui ont été prétraités avec une solution de saline puis injectés avec la solution de glucose présentent des taux de Gip circulant élevés et constants à 30 et 120 minutes (Figure 20 D). Les animaux $Hnf1\alpha^{-/-}$ qui ont été prétraités avec l'antagoniste puis injectés avec la

solution de glucose présentent des taux de Gip circulant diminués en comparaison avec les animaux mutants traités avec une solution de saline (Figure 20 D). Ces animaux mutants traités avec l'antagoniste voient leurs taux de Gip diminués entre 30 et 120 minutes après le choc glycémique. A 120 minutes après injection de glucose, les souris $Hnf1\alpha^{-/-}$ traités avec l'antagoniste ont des taux de Gip circulant comparables à ceux des souris contrôles avant le choc glycémique (Figure 20 D).

7.4 La glycosurie des animaux $Hnf1\alpha^{-/-}$ est rétablie après le traitement à l'antagoniste au récepteur à la ghréline

Le traitement à l'antagoniste ayant un effet sur la glycémie des souris mutantes, nous avons décidé d'étudier la glycosurie de ces animaux en mesurant la concentration en glucose des urines des souris $Hnf1\alpha^{-/-}$. La majorité des animaux mutants présentent une glycosurie spontanée sans le traitement à l'antagoniste (Figure 21). En effet, 5 animaux sur 6 ont présenté une concentration urinaire en glucose supérieure à 2,8 mmol/L. Au bout de 6 jours de traitement, 5 animaux sur 6 ont vu leur glycosurie réduite en dessous de 2,8 mmol/L, valeur correspondant à la quantité de glucose urinaire normalement observée chez les sujets sains.

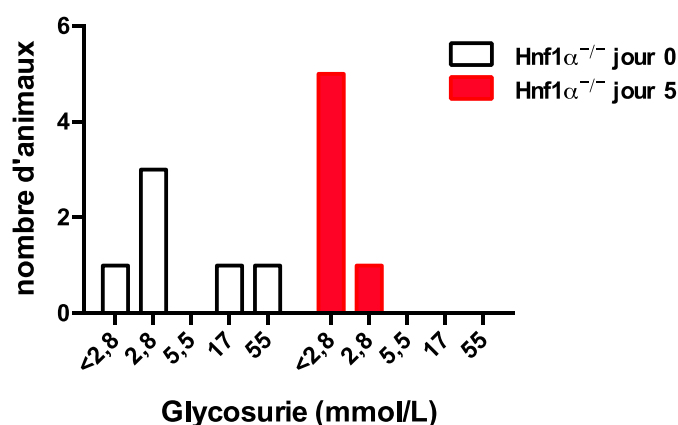


Figure 21 : Détermination de la glycosurie chez les souris $Hnf1\alpha^{-/-}$ avant et après traitement à l'antagoniste du récepteur à la ghréline.

La mesure de la glycosurie en mmol/L est effectuée à l'aide de bandelettes Chemstrip. En blanc, sont représentées les concentrations en glucose retrouvées dans les urines avant traitement avec l'antagoniste du récepteur GHSR1a, et en rouge, après un traitement de 6 jours (n=6).

8 La régulation potentielle du gène de la ghréline par Hnf1 α

Nous avons pu observer que la perte de Hnf1 α chez les souris entraînait une dérégulation des taux des hormones ghréline, insuline et Sst circulantes. Pour ce qui est de la ghréline, nous avons démontré que cette augmentation de ghréline active était corrélée à une augmentation des niveaux d'expression du gène codant pour la ghréline. Nous avons donc émis l'hypothèse que ce facteur de transcription jouait un rôle de répresseur transcriptionnel vis à vis du gène ghréline.

8.1 Validation du modèle et des outils cellulaires

Dans un premier temps, nous avons mené des expériences visant à réduire l'expression de la protéine Hnf1 α par interférence à l'ARN dans la lignée de cellules β pancréatiques issues d'un insulinome, soit les cellules MIN6. Le choix de cette lignée cellulaire est justifié par le fait qu'elle est une des rares lignées à exprimer la ghréline, la Sst et l'insuline. De plus, nous avons observé une relevance dans la perte d'expression de Hnf1 α et l'expression de ces gènes dans le pancréas de la souris. L'intégration d'un shRNA spécifique à Hnf1 α (shHnf1 α) dans les cellules MIN6 a permis une réduction significative du niveau d'expression des transcrits de Hnf1 α de plus de 3,98 fois comparativement à celui des cellules infectées avec un shNT contrôle (Figure 22 A). Cette réduction a eu pour effet de réduire de façon drastique le niveau protéique de Hnf1 α tel que révélé par immunobuvardages (Figure 22 B).

Nous avons donc par la suite étudié l'impact de cette réduction sur les niveaux d'expression des transcrits ghréline, insuline et somatostatine. La réduction de l'expression

de Hnf1 α s'accompagne d'une surexpression du transcrit de la ghréline (Figure 22 C). Cependant, les transcrits de l'insuline et de la Sst ne sont pas modulés significativement en absence de Hnf1 α (Figures 22 D et E). Hnf1 α apparaît donc comme un répresseur potentiel du gène codant pour la ghréline.

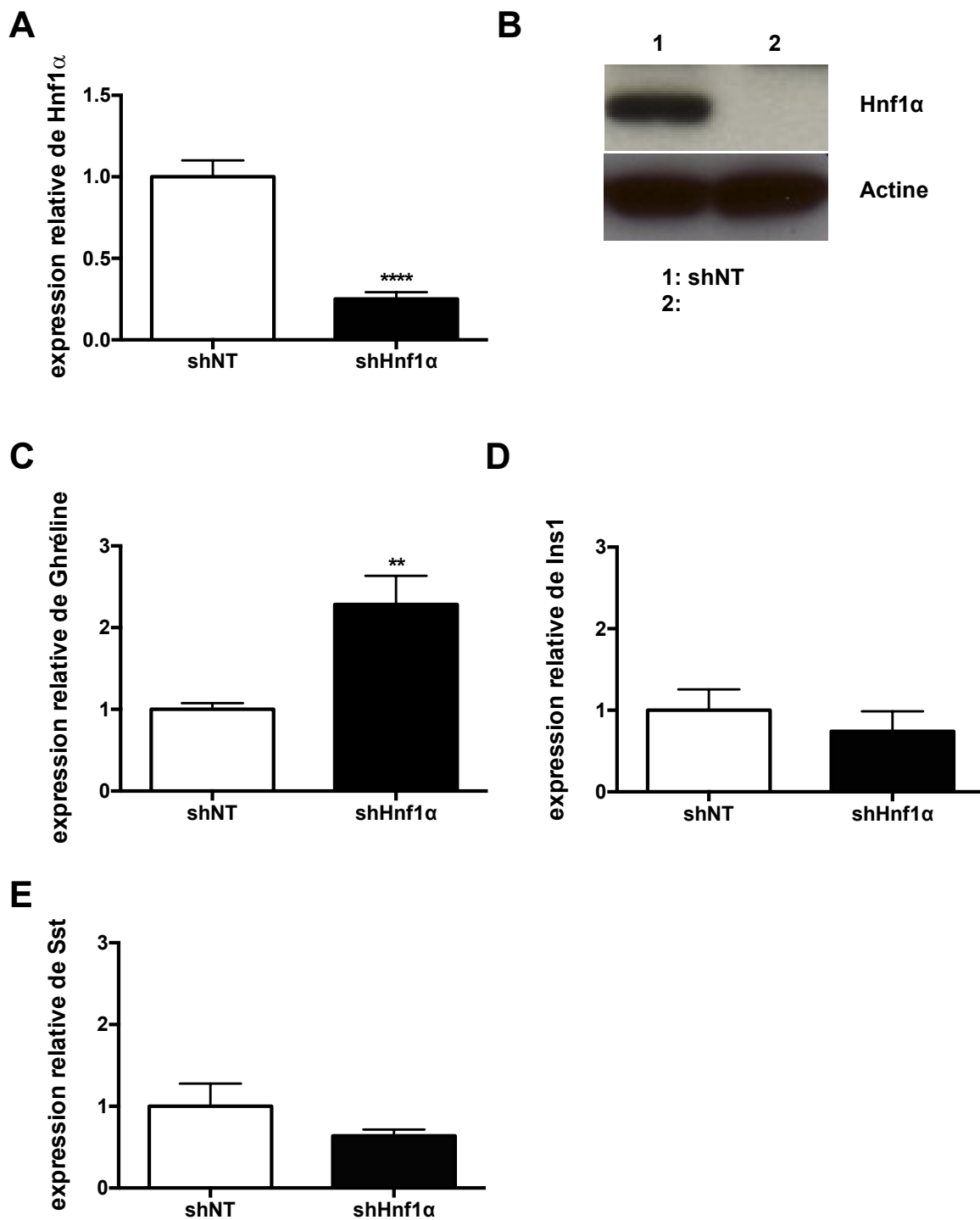


Figure 22 : Réduction du transcrit et de la protéine Hnf1 α par l'utilisation de shRNA dans les cellules MIN6 et impacts de la réduction de l'expression de Hnf1 α sur les transcrits de la ghreline, de la somatostatine et de l'insuline.

Suite à l'infection avec des lentivirus permettant d'exprimer des ARNs interférents dirigés contre le messager de Hnf1 α , les cellules MIN6 ont été sélectionnées durant 7 jours. A : Les ARNs totaux ont été extraits, l'expression du transcrite Hnf1 α a été évaluée par qPCR. L'expression du gène est relativisée à 1 par rapport à celle du gène *TBP* (n=6, **** ; p<0,0001). B : Les protéines totales des cellules MIN6 ont été extraites puis ont servi à réaliser un immunobuvardage permettant de visualiser Hnf1 α de même que l'actine comme référence. Les ARNs totaux ont été extraits et l'expression des transcrits de la ghréline (C), de l'insuline (D) et de la somatostatine (E) a été évaluée par qPCR. L'expression des gènes est relativisée par rapport à celle du gène *TBP*. (n=6, ** ; p<0,01).

8.2 Le facteur de transcription Hnf1 α interagit physiquement avec le promoteur du gène ghréline *in cellulo* et est associé à un état réprimé de la chromatine

Afin de prédire un rôle potentiel du facteur de transcription Hnf1 α sur la régulation transcriptionnelle de l'hormone ghréline, nous avons réalisé une étude *in silico* en utilisant le logiciel bioinformatique Matinspector (Genomatix© Software GmbH 2013, http://www.genomatix.de/online_help/help_matinspector/matinspector_help.html, consulté le 3 Mars 2013). Nous voulions ainsi explorer si Hnf1 α pouvait interagir physiquement avec le promoteur du gène de la ghréline. Une analyse centrée sur les 2500 nucléotides situés en amont du site initiateur de la transcription de la ghréline murine a prédit la présence de 10 sites indépendants de liaison pour Hnf1 α (Figures 23 A et B).

Nous avons par la suite réalisé des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine pour mesurer le potentiel d'interaction de Hnf1 α avec le promoteur de la ghréline. Les cellules MIN6 infectées avec un lentivirus shHnf1 α et sélectionnées ont servi de contrôle de spécificité pour l'immunoprécipitation de Hnf1 α alors que les cellules ayant intégré un lentivirus shNT contrôle ont été utilisées comme référence pour l'interaction. Suite à l'immunoprécipitation de la chromatine à l'aide d'un anticorps dirigé contre le facteur de transcription Hnf1 α , nous avons amplifié par qPCR 5 régions indépendantes de la ghréline (numérotés de 1 à 5) et couvrant les 10 sites de liaison prédits (Figure 23 A). L'immunoprécipitation de Hnf1 α a permis un enrichissement significatif des régions 1, 3, 4

et 5 contenant respectivement les sites 1-2, 4-5, 6 et 7-8-9-10 (Figure 23 C). Ce facteur de transcription peut alors être recruté au niveau de la région promotrice du gène codant pour la ghréline. Il est à noter qu'une forte réduction de l'expression de Hnf1 α dans les cellules shHnf1 α n'a pas mené à un enrichissement de ces régions respectives supportant donc une certaine spécificité de l'approche en question (Figure 23 C).

Afin de documenter l'état de l'activité relative de la chromatine en fonction de la présence ou absence de Hnf1 α , nous avons utilisé des anticorps dirigés contre l'état de méthylation de l'histone H3. L'immunoprécipitation de l'état triméthylé de la lysine en position 27 de l'histone H3, une marque de répression transcriptionnelle, a révélé un enrichissement significatif des régions situées dans l'entourage du recrutement du complexe transcriptionnel dans les cellules MIN6 shNT exprimant Hnf1 α . A l'inverse, cette même immunoprécipitation dans les cellules MIN6 shHnf1 α , où l'expression de Hnf1 α est fortement réduite, résulte en une réduction significative de l'état méthylé de cette lysine associé à la chromatine réprimée (Figure 23 D).

D'autre part, l'immunoprécipitation de l'état triméthylé de la lysine en position 36 de l'histone H3, une marque d'activation transcriptionnelle, a révélé un enrichissement significatif des régions situées dans l'entourage du recrutement du complexe transcriptionnel chez les cellules MIN6 shHnf1 α , soit dépourvues de Hnf1 α , par rapport aux cellules shNT exprimant la protéine Hnf1 α . Ainsi, l'état de méthylation de l'histone H3 dans la région promotrice du gène de la ghréline varie en fonction de la présence de Hnf1 α dans les cellules MIN6 (Figure 23 E).

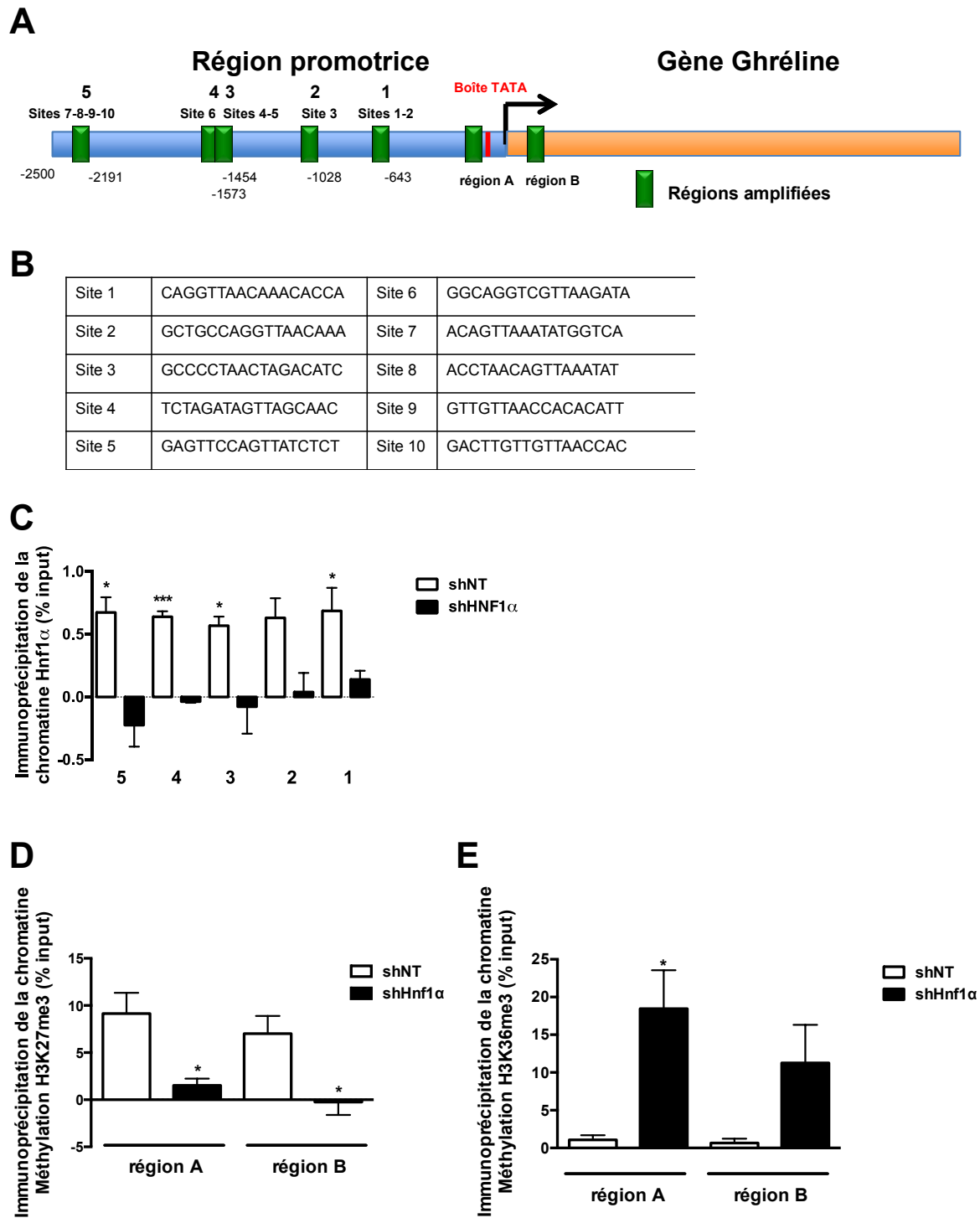


Figure 23 : Le facteur de transcription Hnf1 α interagit physiquement avec le promoteur du gène ghréline *in cellulo* et réprime la transcription du gène en modifiant l'état de la chromatine.

A : Schéma de la répartition des sites de liaison du facteur de transcription Hnf1 α et des régions amplifiées lors des expériences de qPCR sur la région de 2500 nucléotides situés en amont du site d'initiation de la transcription du gène murin codant pour la ghréline obtenus par le logiciel bioinformatique MatInspector de Genomatix. B : Séquences des sites Hnf1 α prédits. C : Immunoprécipitation de la chromatine mettant en évidence les sites de liaison d'Hnf1 α sur les 2500 premiers nucléotides en amont du site d'initiation de la transcription du gène ghréline. Suite à l'infection avec des lentivirus permettant d'exprimer des ARNs interférents dirigés contre le messenger d'Hnf1 α , shHnf1 α , ou un shNT ne ciblant aucun messenger, les cellules MIN6 ont été sélectionnées durant 7 jours. Les expériences d'immunoprécipitation de la chromatine ont été réalisées avec un anticorps reconnaissant Hnf1 α . La liaison de Hnf1 α a été évaluée par qPCR (n=3). D : Méthylation répressive de la chromatine en absence de Hnf1 α . Suite à l'infection avec des lentivirus permettant d'exprimer des ARNs interférents dirigés contre le messenger d'Hnf1 α , shHnf1 α , ou un shNT ne ciblant aucun messenger, les cellules MIN6 ont été sélectionnées durant 7 jours. Les expériences d'immunoprécipitation de la chromatine ont été réalisées avec un anticorps H3K27me3. La présence de la méthylation a été évaluée par qPCR (n=5). E : Méthylation répressive de la chromatine en absence de Hnf1 α . Suite à l'infection avec des lentivirus permettant d'exprimer des ARNs interférents dirigés contre le messenger d'Hnf1 α , shHnf1 α , ou un shNT ne ciblant aucun messenger, les cellules MIN6 ont été sélectionnées durant 7 jours. Les expériences d'immunoprécipitation de la chromatine ont été réalisées avec un anticorps H3K36me3. La présence de la méthylation a été évaluée par qPCR (n=4) (* ; p<0,05, *** ; p<0,001).

Discussion

HNF1 α est un régulateur de gènes intestinaux (Boudreau *et al*, 2001). Précédemment, il a été démontré que la perte du facteur de transcription Hnf1 α , chez la souris, occasionnait des dysfonctionnements au niveau du foie, du pancréas et des reins, alors que l'homéostasie intestinale n'était pas altérée (Bosse *et al*, 2006; D'Angelo *et al*, 2010; Lee *et al*, 1998; Pontoglio *et al*, 1996; Shih *et al*, 2001). Une étude démontre que la perte de Hnf1 α et de son partenaire Hnf1 β étaient toutes deux nécessaires pour altérer les fonctions de l'épithélium intestinal (D'Angelo *et al*, 2010).

Dans une étude antérieure, notre laboratoire a mis en évidence des modulations de l'architecture et des fonctions intestinales occasionnées par la perte de Hnf1 α (Lussier *et al*, 2010). Les différences constatées avec les études des autres groupes pourraient être dues à l'âge des souris étudiées. En effet, la majorité de nos observations sont réalisées chez des souris adultes, contrairement aux autres études effectuées sur des souris plus jeunes. Or l'expression de Hnf1 α est interrompue de la naissance à la fin de l'allaitement dans l'épithélium intestinal chez la souris, puis reprend (Boudreau *et al*, 2002; Lussier *et al*, 2010), ce qui pourrait expliquer la non altération des fonctions intestinales telles que rapportées pour cet âge (Bosse *et al*, 2006; D'Angelo *et al*, 2010; Lee *et al*, 1998; Pontoglio *et al*, 1996; Shih *et al*, 2001).

Nos observations attribuent un rôle pour Hnf1 α dans les processus de production de divers sous-types de cellules entéroendocrines. En effet, nous avons observé une diminution de la chromogranine A tant au niveau du nombre de cellules qu'au niveau de l'ARNm (Lussier *et al*, 2010), un marqueur communément utilisé pour les cellules entéroendocrines, (Lussier *et al*, 2010). Ce marqueur endocrinien semble apparaître au cours du développement embryonnaire et il est co-exprimé avec la majorité des hormones produites par l'intestin comme le Gip et la Sst (Mellitzer *et al*, 2010; Piper *et al*, 2004). En ce qui concerne la ghréline, celle-ci n'est pas co-exprimée avec la chromogranine A (Gronberg *et al*, 2008). Une étude relate également que Pten régulerait positivement l'expression des cellules Chromogranine A positives mais des différences apparaissent au

niveau de certaines co-localisations contrairement à notre étude et à celle du groupe de Gradwohl (Roy *et al*, 2012). Nous pourrions étudier les modulations de Pten chez nos souris mutantes et ainsi renseigner s'il existe une corrélation entre la présence de Pten et celle de ce marqueur entéroendocrinien.

Les niveaux d'expression du transcrit Glp-1 ne varient pas entre les souris mutantes et les souris contrôles, que ce soit à la naissance ou à l'âge de 4 mois dans le jéjunum. Or, le Glp-1 est une hormone principalement sécrétée par les cellules L au niveau de la partie distale de l'intestin, notamment l'iléon et le côlon (Doyle et Egan, 2007). Il serait donc envisageable d'étudier les niveaux d'expression de ce transcrit dans ces segments de l'intestin et d'observer les modulations entre animaux mutants et contrôles. Des essais préliminaires n'ont pas permis de déceler de variations de la protéine Glp-1 dans le sang entre les animaux mutants et les animaux contrôles (Résultat non montré). Cependant, les méthodes de prélèvement et de dosage sont critiquables dans le cas de cette hormone très instable et nous considérons nos résultats comme étant jusqu'à maintenant inexploitable.

Le transcrit de la somatostatine est, quant à lui, diminué seulement à 4 mois chez les souris $Hnf1\alpha^{-/-}$ et ne varie pas de manière significative à la naissance. Comme évoqué précédemment, l'absence de modulation du transcrit à la naissance pourrait être due à l'interruption de l'expression de $Hnf1\alpha$ de la naissance au sevrage (Boudreau *et al*, 2002). On pourrait aussi penser qu'un phénomène de compensation par un autre acteur pourrait être à l'œuvre comme par exemple le facteur de transcription $Hnf1\beta$ pouvant remplacer $Hnf1\alpha$ (Gu *et al*, 2006). Il existe un lien transcriptionnel entre $Hnf1\alpha$ et la somatostatine. En effet, $Hnf1\alpha$ régule le facteur de transcription Pax4 qui est un progéniteur essentiel à l'établissement des cellules β et δ pancréatiques (Smith *et al*, 2003; Smith *et al*, 2000; Sosa-Pineda *et al*, 1997). Pax4 est exprimé dans l'intestin grêle (Larsson *et al*, 1998). Ainsi la perte de $Hnf1\alpha$ pourrait moduler l'expression de Pax4 et cela modulerait à son tour l'expression de la somatostatine. Nous pourrions ainsi renseigner les niveaux d'expression de ce progéniteur.

Une analyse bioinformatique préliminaire du promoteur du gène codant pour la somatostatine a permis de prédire 7 sites de liaison de Hnfl α sur les 1300 premiers nucléotides en amont du site d'initiation de la transcription, suggérant ainsi que Hnfl α pourrait également réguler directement le gène somatostatine (Résultat non montré). Nous pourrions mener une étude du promoteur du gène codant pour la somatostatine pour déterminer s'il y a un lien physique entre notre facteur de transcription d'intérêt et le promoteur de cette hormone.

Nous avons effectué un dosage de l'hormone circulante par test ELISA et nous avons remarqué une diminution des taux de somatostatine plasmatique chez nos animaux mutants en comparaison à nos animaux contrôles. Ainsi la perte de Hnfl α s'accompagne d'une diminution de somatostatine sécrétée. Nous avons voulu ainsi visualiser la population de cellules produisant cette hormone au niveau du jéjunum mais sans succès. En effet nous n'avons pas pu observer, ni décompter de cellules somatostatine positives chez les souris mutantes. Puisque la production de la somatostatine ne se limite pas seulement qu'à l'intestin et ne sachant pas si notre anticorps dirigé contre cette hormone ou nos conditions d'immunofluorescence étaient adéquates, nous avons décidé de réaliser ce marquage dans un tissu reconnu pour produire de la somatostatine soit le pancréas. Nous avons pu voir la population de cellules productrices de somatostatine dans les cellules δ des îlots de Langerhans (Figure supplémentaire 1). Visuellement on ne dénote pas de différence entre les souris Hnfl $\alpha^{-/-}$ et les souris contrôles. Par la suite nous avons entrepris de quantifier les niveaux d'expression du transcrit somatostatine au niveau pancréatique. Nous avons observé une diminution des niveaux d'expression du transcrit dans le pancréas des animaux mutants comparativement aux animaux contrôles. La perte de Hnfl α altère donc les niveaux d'expression du transcrit également dans le pancréas. Pour réconcilier les expériences d'immunofluorescences et de qPCR, il faut noter que l'utilisation du microscope à notre disposition ne permettait peut être pas d'apprécier une modulation fine du contenu protéiques des cellules δ . Cette approche ne permet d'apporter qu'une information qualitative, il faudrait alors utiliser des concentrations plus limitantes d'anticorps et utiliser la microscopie confocale et procéder à des études morphométriques renseignant les masses et volume des cellules α pancréatiques. Ces expériences peuvent

également être complétées par des tests ELISA au niveau de l'organe en tant que tel et ainsi quantifier le contenu protéique.

La somatostatine, essentiellement d'origine pancréatique, peut également jouer un rôle dans la régulation de la sécrétion de l'insuline ainsi que du glucagon dans les îlots de Langerhans et ce, de manière paracrine et ainsi intervenir dans le métabolisme du glucose (Barnett, 2003). La somatostatine a également été décrite comme pouvant inhiber la sécrétion de ghréline (Broglia *et al*, 2002), s'apparentant au phénotype hyperglycémique des souris mutantes. On pourrait donc envisager que la diminution de la somatostatine circulante puisse concourir à l'établissement d'une hyperglycémie chez nos animaux mutants par altération directe ou indirecte de la sécrétion d'insuline. Dans une étude préliminaire, nous avons traité les souris mutantes et contrôles avec de la somatostatine ss-14 et nous n'avons trouvé aucune modification de la sécrétion de ghréline ni de modulation de la glycémie. La somatostatine doit jouer un rôle sur les sécrétions d'insuline et de ghréline essentiellement de manière paracrine au niveau des îlots pancréatiques et non systémique, comme lors de l'injection de l'hormone de manière sous-cutanée (Stange *et al*, 1984). L'ajout de somatostatine à nos animaux mutants ne permettrait donc pas de lutter contre l'hyperglycémie et ne présente donc pas d'intérêt thérapeutique dans l'état actuel des choses. Nous avons donc décidé de ne pas privilégier un traitement visant à rétablir les taux de somatostatine chez nos animaux mutants.

À la naissance tout comme à 4 mois, les souris $Hnfl\alpha^{-/-}$ présentent une diminution significative des niveaux d'expression du transcrit *Gip*, de même qu'une diminution du nombre de cellules *Gip* positives au niveau du jéjunum des animaux mutants comparativement aux animaux contrôles. La diminution significative de *Gip* à un jour, malgré l'absence normale de $Hnfl\alpha$ de la naissance au sevrage peut s'expliquer par l'absence de compensation par un autre régulateur comme $Hnfl\beta$. Cette hormone, stimulant la sécrétion d'insuline, est produite principalement par les cellules K de la portion proximale de l'intestin (duodénum et jéjunum) (Buffa *et al*, 1975). Des expériences préliminaires de qPCR effectuées dans le duodénum chez des souris âgées de 4 mois révèlent la même tendance observée dans le jéjunum, à savoir une diminution du transcrit

Gip chez les souris mutantes comparativement aux souris contrôles (Résultat non montré). Paradoxalement, nous avons observé une augmentation de cette hormone dans le sang et ce à 1, 4 et 18 mois chez les souris $Hnf1\alpha^{-/-}$ en comparaison avec les souris contrôles. Ces observations rappellent celles observées chez des patients atteints de diabète de type 2. En effet, des études relatent, chez certains patients, un défaut de sécrétion d'insuline et des taux de GIP circulant à la hausse (Theodorakis *et al*, 2004; Vollmer *et al*, 2008). Certains auteurs ont avancé que l'effet incrétine du GIP était réduit ou encore perdu chez ces patients. Pour expliquer cela, deux courants de pensée sont établis. Pour certains auteurs, cette diminution de l'effet insulinothrompique de GIP est attribuée à une désensibilisation des récepteurs au GIP, les GIPR à la surface des cellules β pancréatiques (Tseng *et al*, 1996). D'autres s'orientent plutôt vers une réduction de l'expression des GIPRs dans ces mêmes cellules (Holst *et al*, 1997; Zhou *et al*, 2007).

Nous avons décidé d'envisager deux aspects pour étudier les modulations protéiques de Gip au niveau de notre modèle murin. En premier lieu, nous avons pensé que le Gip véhiculé dans le sang, malgré l'expression du transcrit diminuée et un nombre de cellules Gip positives à la baisse dans le jéjunum, pouvait être accumulé car non dégradé de façon adéquate par une diminution de l'enzyme dipeptidyl peptidase 4 (Dpp4). En effet, il a été établi que le Gip, tout comme Glp-1, pouvait être rapidement dégradé par la Dpp4. Cette dernière va cliver les 2 premiers acides aminés de Gip en seulement 1 à 2 minutes chez la souris pour donner une forme tronquée de Gip qui sera alors inactive (Deacon *et al*, 2000). Nous avons quantifié les niveaux d'expression du transcrit Dpp4 par qPCR dans le jéjunum des souris $Hnf1\alpha^{-/-}$ et contrôles pour mettre en évidence une diminution de l'expression du transcrit Dpp4 chez les souris mutantes. *In vitro*, il a été démontré que HNF1 α était un activateur transcriptionnel de la DPP4 dans les cellules Caco-2 (Erickson *et al*, 2000). Cela a été conforté plus récemment chez la souris, où la perte de Hnf1 α s'accompagnait d'une diminution des niveaux d'expression du gène *Dpp4* (D'Angelo *et al*, 2010).

Nous avons procédé à l'analyse des taux de Dpp4 plasmatiques par test ELISA et nous observons également chez nos souris mutantes une diminution de la protéine Dpp4

circulante. On peut donc penser que les forts taux de Gip circulant peuvent s'expliquer en partie par un problème de dégradation par la Dpp4 diminuée dans les souris $Hnf1\alpha^{-/-}$.

En deuxième lieu nous avons voulu voir si la perte de $Hnf1\alpha$ pouvait, chez la souris mutante, diminuer le nombre de récepteurs au Gip, $Gipr$, à la surface des cellules β pancréatiques et donc baisser le pouvoir insulinothrompique du Gip. Pour réaliser cela, nous avons effectué des expériences de qPCR au niveau d'extraits pancréatiques chez les animaux. Les résultats préliminaires ne montrent pas de diminution significative de l'expression du transcrit $Gipr$ dans le pancréas des souris $Hnf1\alpha^{-/-}$ comparativement aux souris contrôles (Figure supplémentaire 2).

La perte de $Hnf1\alpha$ entraîne une diminution de la protéine leptine dans le sang. La leptine peut trouver son origine dans la graisse blanche essentiellement, mais aussi la graisse brune et des études relatent sa production par l'estomac (Bado *et al*, 1998; Denver *et al*, 2011; Moinat *et al*, 1995; Raucci *et al*, 2013; Sobhani *et al*, 2000). La diminution de la leptine circulante chez nos animaux mutants pourrait être attribuée à l'apparente diminution de la quantité de masse adipeuse des animaux mutants. En effet, les souris $Hnf1\alpha^{-/-}$ ont la particularité d'être plus petites que les contrôles et présentent peu de masse adipeuse (Lussier *et al*, 2010). Cette observation pourrait être mieux quantifiée, notamment en dissociant et en pesant la masse adipeuse entre les souris mutantes et contrôles, ou en appréciant, par coloration au lysochrome «Oil-red-O», la composition adipeuse des tissus ou encore par résonance magnétique nucléaire. Nous avons voulu voir si la perte de $Hnf1\alpha$ pouvait influencer la production de leptine gastrique, nous avons évalué les niveaux d'expression du transcrit par qPCR. Nous n'observons aucune modulation significative entre les souris $Hnf1\alpha^{-/-}$ et les souris contrôles. Il serait possible d'affiner nos observations en étudiant le contenu protéique en leptine des estomacs des 2 groupes d'animaux par test ELISA et ainsi, pour voir s'il y a un défaut dans la production de leptine dans nos souris mutantes au niveau gastrique.

Il a été démontré que les souris ob/ob présentaient une hyperglycémie et une hyperinsulinémie (Lindstrom, 2007; Zhang *et al*, 1994). Des injections de leptine ont eu

pour effet de normaliser l'hyperglycémie et l'hyperinsulinémie chez les souris déficientes pour le gène *Obese* (Pelleymounter *et al*, 1995). De manière préliminaire, nous avons traité des souris mutantes avec des injections intrapéritonéales de leptine à raison de 1 mg/kg durant 5 jours et nous avons constaté une diminution de la glycémie chez ces animaux (Résultat non montré). Des expériences complémentaires pourraient être conduites pour étudier les effets thérapeutiques d'un traitement basé sur l'utilisation de la leptine pour contrer l'hyperglycémie des souris mutantes. Des études confortent le potentiel thérapeutique de la leptine pour le traitement de souris diabétiques (Naito *et al*, 2011).

La leptine peut également intervenir dans le contrôle de la glycémie en jouant sur la sécrétion de GLP-1. En effet, il a été démontré que la leptine stimule les sécrétions de GLP-1 (Anini et Brubaker, 2003). Dans notre projet de recherche, nous ne pouvons pas confirmer cela, il faudrait refaire nos manipulations de manière optimale afin d'obtenir des résultats exploitables en ce qui concerne les taux plasmatiques de Glp-1.

Dans une autre étude on peut voir une résistance au développement de l'obésité, comme c'est le cas chez les souris *Gipr^{-/-} ob/ob* (Miyawaki *et al*, 2002). Nos souris mutantes ont la particularité d'avoir une petite taille, un taux élevé de Gip circulant, dénotant un défaut dans la signalisation liée à cette hormone, de même qu'une diminution des taux de leptine plasmatique ; on peut donc penser que nos souris vont privilégier l'utilisation des graisses alimentaires comme carburant énergétique plutôt que leur stockage dans le tissu adipeux.

Il est actuellement avancé que HNF1 α est un régulateur transcriptionnel important de l'insuline. Des précédentes études chez le rat et la souris, montrent que le facteur de transcription Hnf1 α transactive le gène *Insulin 1 (Ins1)* mais n'a aucun effet sur le deuxième exemplaire allélique *Insulin 2 (Ins2)* (Emens *et al*, 1992; Shih *et al*, 2001). Ces études étant relativement anciennes, les outils d'étude et de quantification ne permettaient peut être pas d'écarter toutes modulations du gène *Ins2* en présence ou en absence du facteur de transcription Hnf1 α . Cette hormone étant produite par les cellules β pancréatiques, nous avons étudié l'impact de la perte du facteur de transcription Hnf1 α sur

les niveaux d'expression du transcrit *Ins1* dans le pancréas des animaux et nous avons mis en évidence que les souris $Hnf1\alpha^{-/-}$ présentent une diminution de l'expression du gène *Ins1* codant pour l'insuline au niveau du pancréas. Toutefois, nous n'avons pas caractérisé les niveaux d'expression du gène *Ins2* et nous ne pouvons donc pas écarter une possible compensation de ce dernier au regard de la diminution de l'expression du gène *Ins1*. Nous pourrions ainsi entreprendre de renseigner ces niveaux d'expression.

A l'heure actuelle nous ne pouvons pas établir une corrélation entre cette diminution du transcrit et celle de la protéine insuline car nous n'avons pas évalué la masse des cellules β pancréatiques. En effet, la mesure d'une masse fonctionnelle de cellules β est un facteur important dans la régulation de l'homéostasie du glucose. Le pancréas est soumis à un processus dynamique qui va subir des augmentations ou des diminutions pour maintenir la glycémie (Bonner-Weir, 2000; Bonner-Weir, 2001). Les îlots pancréatiques s'adaptent à long terme à la demande d'insuline, il y a donc nécessité d'établir un équilibre entre survie et mort des cellules β pancréatiques, la survie correspondant à la néogenèse et à la prolifération des cellules alors que la mort des cellules comprend la nécrose et l'apoptose. Pour vérifier que la diminution des taux d'insuline circulante lors de la perte d' $Hnf1\alpha$ peut s'expliquer par une diminution de l'expression du transcrit correspondant il faudrait alors connaître la masse des cellules β pancréatiques chez nos animaux mutants et nos animaux contrôles.

Une étude relatant la réexpression du facteur de transcription $Hnf1\alpha$ dans le pancréas des souris mutantes ne montre aucun impact sur l'hyperglycémie (Lin *et al*, 2008). Dans cette étude les auteurs ont permis la réexpression de $Hnf1\alpha$ dans les cellules β pancréatiques par le biais de croisement entre souris hétérozygotes $Hnf1\alpha^{+/-}$ et des souris transgéniques *ins2.cre*, puis par un deuxième croisement des souris résultantes avec des souris knock inactive, souris $Hnf1\alpha^{kin/+}$, pour obtenir des souris $Hnf1\alpha^{kin/-}$ et 2 allèles Cre permettant la réexpression de $Hnf1\alpha$. Les souris exprimant à nouveau la protéine $Hnf1\alpha$ dans les cellules β des îlots de Langerhans présentaient une augmentation des taux d'insuline circulante mais souffraient toujours d'hyperglycémie. Ces résultats laissent supposer que la réintroduction de $Hnf1\alpha$ dans le pancréas ne suffit pas à restaurer une

glycémie normale malgré une insulinémie en augmentation. Ainsi les animaux mutants semblent présenter une altération de la sensibilité à l'insuline des tissus cibles que sont le foie, les muscles squelettiques et le tissu adipeux (Muoio, 2010; Poitout *et al*, 2006). Nous avons mené des expériences d'immunofluorescences pour mettre en évidence la population de cellules β pancréatiques, produisant l'insuline, de nos souris $Hnf1\alpha^{-/-}$ et nous les avons comparées à celles menées chez les souris contrôles. L'observation microscopique des pancréas des 2 groupes d'animaux ne nous permet pas de déceler de différence au niveau de cette composante cellulaire. Comme nous n'avons pas procédé au décompte des cellules β pancréatiques au sein de l'îlot de Langerhans et procéder à une étude morphométrique, nous n'avons pas effectué la quantification de cette approche. Il faudrait compter le nombre de cellules positives et évaluer leur masse pour les animaux mutants et contrôles. Il a également été démontré, dans la littérature, par des expériences d'immunofluorescence, que les souris mutantes présentaient des marquages d'insuline, comparables aux contrôles (Parrizas *et al*, 2001). Les cellules semblent gorgées d'un contenu protéique équivalent. Pour s'assurer de cela et/ou mettre en évidence une possible accumulation d'insuline dans les cellules il faudrait alors effectuer une quantification de la protéine dans ce tissu d'intérêt par des expériences de dosage ELISA et procéder à des expériences d'immunofluorescence en microscopie confocale avec des concentrations plus faibles d'anticorps.

Nous savons que l'insuline est une hormone indispensable au contrôle de l'homéostasie du glucose, qu'en est-il du glucagon ? Ce dernier est une hormone hyperglycémiant. C'est elle qui donne à l'organisme l'information de libérer le glucose stocké pour son utilisation en cas de besoin. Nous pourrions donc penser que l'hyperglycémie pourrait être due, en partie, à une augmentation du glucagon. Nous avons donc mesuré les taux de glucagon circulant chez les souris $Hnf1\alpha^{-/-}$ et contrôles par test ELISA (Figure supplémentaire 3). Ces résultats ne mettent en évidence aucune variation du glucagon circulant entre les animaux mutants et contrôles. L'hyperglycémie constatée lors de la perte de la protéine $Hnf1\alpha$ n'est donc pas attribuable à une augmentation de glucagon chez ces animaux. Nous avons affiné tout de même notre étude en nous intéressant aux niveaux d'expression du transcrit glucagon au niveau pancréatique, lieu de production de cette hormone par les cellules α pancréatiques. Nous ne mettons en évidence

aucune modification de l'expression du gène glucagon malgré la perte de Hnf1 α (Résultat non montré). Des expériences d'immunofluorescences menées dans une autre étude ne montrent aucune différence au niveau du nombre et du marquage de ces cellules α pancréatiques entre les souris mutantes et contrôles (Parrizas *et al*, 2001). Ainsi nous avons confirmé que l'hyperglycémie constatée chez nos animaux mutants est associée à de faibles taux d'insuline circulante et non à un excès de glucagon.

En ce qui concerne la ghréline, nous avons mis en évidence que celle-ci augmentait pour ce qui est de son transcrit, de ses taux circulants sous forme totale et active ainsi qu'au niveau du nombre des cellules ghréline positives du jéjunum des souris mutantes comparativement aux souris contrôles. Cette hormone intervenant dans l'homéostasie du glucose en inhibant la sécrétion d'insuline, nous voulions savoir si celle-ci pouvait être une des causes du phénotype hyperglycémique de nos animaux mutants.

La ghréline peut être produite par l'estomac, l'intestin et le pancréas (Andralojc *et al*, 2009; Heller *et al*, 2005). Nous avons entrepris de quantifier les niveaux d'expression du transcrit ainsi que la production de l'hormone, sous sa forme bioactive, dans ces différents tissus.

Nous avons, tout d'abord, réussi à caractériser les niveaux d'expression du transcrit ghréline dans l'estomac et le pancréas des souris mutantes et contrôles. Au niveau de l'estomac, nous voyons une diminution du transcrit chez nos souris mutantes. Nous pouvons penser qu'un mécanisme de compensation ou qu'une régulation indépendante au niveau de l'estomac pour la ghréline intervient.

Pour ce qui est de la compensation possible de Hnf1 α par un autre facteur, il a été démontré que Hnf1 α pouvait s'hétérodimériser avec la protéine Hnf1 β (Mendel *et al*, 1991a; Mendel *et al*, 1991b). Ces deux facteurs de transcription se liant aux mêmes séquences d'ADN, nous avons voulu savoir si la perte de Hnf1 α pouvait s'accompagner d'une modulation de Hnf1 β et étudier les effets éventuels d'une compensation de la protéine partenaire. Il a été démontré que la perte de Hnf1 α n'altérait pas les niveaux

d'expression de Hnf1 β dans l'intestin (D'Angelo *et al*, 2010). Nous avons réalisé la quantification des niveaux d'expression du transcrite Hnf1 β par qPCR dans l'estomac et dans le pancréas (Figure supplémentaire 4). Les souris mutantes ne montrent aucune différence d'expression de ce transcrite au niveau des tissus gastriques et pancréatiques chez les souris mutantes comparativement aux souris contrôles. On peut donc penser que le partenaire de notre facteur de transcription d'intérêt Hnf1 α , ici Hnf1 β , ne compense pas l'absence de notre facteur de transcription d'intérêt. S'il existe un phénomène compensant la perte de Hnf1 α dans l'estomac de nos souris mutantes cela doit passer par un autre facteur.

Dans l'estomac, on ne note aucune modification au niveau des taux de ghréline active entre les animaux mutants et les animaux contrôles. Des études révèlent qu'il peut exister différents programmes de différenciation pour des cellules endocrines entre l'intestin, le pancréas et l'estomac. Ainsi les souris pour lesquelles le gène codant pour le facteur de transcription Neurogénine 3 a été invalidé ne présentaient plus de cellules ghréline dans l'intestin mais les cellules produisant l'hormone étaient quant à elles présentes dans l'estomac (Jenny *et al*, 2002; Mellitzer *et al*, 2010).

La diminution du transcrite chez nos animaux mutants, ne corrèle pas avec les taux équivalents de protéine au sein du tissu gastrique entre les souris mutantes et les souris contrôles. Cette différence entre les niveaux d'expression du transcrite et les taux protéiques peut s'expliquer, tout comme dans le cas de l'insuline pancréatique discuté précédemment, par des modulations de la stabilité de l'ARNm et de la protéine.

Au niveau du pancréas, par contre nous relevons une augmentation du transcrite ghréline chez nos animaux Hnf1 α ^{-/-} comparativement aux animaux contrôles, comme ce fut le cas dans le jéjunum proximal des animaux mutants. Nous ne sommes pas parvenus à obtenir de résultats exploitables pour ce qui est de la quantification de la ghréline bioactive par ELISA dans cet organe. Le pancréas est riche en enzymes capables de dégrader les protéines telles que la ghréline.

De manière préliminaire, nous sommes toutefois parvenus à effectuer des immunofluorescences permettant le marquage des cellules productrices de ghréline au niveau du pancréas donnant, par la même, un aperçu sur le contenu protéique de cette hormone dans ce tissu (Figure supplémentaire 5). Les souris *Hnf1 α ^{-/-}* semblent produire plus de ghréline que les souris contrôles. Par contre nous n'arrivons pas nettement à identifier une sous-population de cellules ghréline positives, nous avons l'impression que la majorité des cellules de l'îlot de Langerhans produisent cette hormone. Il faudrait affiner quelque peu cette étude, ou les conditions expérimentales pour répondre avec précision sur l'origine de cette ghréline pancréatique et si possible compléter cela par une quantification des cellules productrices de ghréline. D'autre part, certaines études relatent la production possible de ghréline par les cellules α pancréatiques (Date *et al*, 2002) en plus des cellules ϵ (Assmann *et al*, 2009). Pour étudier la production possible par d'autres cellules endocrines pancréatiques, nous pourrions mener des expériences d'immunofluorescence de co-localisation avec les différents types cellulaires de la portion endocrine présents. Une production locale de ghréline au niveau du pancréas pourrait avoir un impact direct sur la sécrétion d'insuline dans le cas de nos animaux mutants comme il a été démontré dans une étude précédente chez les rongeurs (Dezaki *et al*, 2004). La ghréline inhiberait de manière permanente la libération d'insuline.

Pour ce qui est de l'intestin, nous avons mis en évidence une augmentation des taux de ghréline bioactive. Néanmoins, nous n'avons testé qu'une portion de l'intestin grêle, le jéjunum proximal. Malgré le fait que les cellules entéroendocrines ne représentent que 1% des cellules épithéliales, l'intestin représente le plus important organe endocrinien du corps (Ahlman et Nilsson, 2001; Schonhoff *et al*, 2004). Les cellules ghréline positives sont présentes tout le long de l'intestin : jéjunum, iléon et côlon, or ici nous n'avons exploré qu'un segment de l'intestin grêle, il faudrait affiner notre étude et caractériser les différents segments et ainsi s'assurer que la ghréline active est augmentée tout au long de l'intestin.

Il a été démontré que la ghréline pouvait réguler la sécrétion d'insuline au niveau des cellules β pancréatiques lorsqu'elle est sous sa forme active, correspondant à la présence d'un groupement acyl sur la sérine en position 3 (Dezaki *et al*, 2007).

L'augmentation de la ghréline acylée, donc bioactive, laisse supposer que cette augmentation de ghréline active dans le sang pourrait influencer l'homéostasie du glucose en inhibant la sécrétion d'insuline par les cellules β pancréatiques. Nous avons donc décidé d'axer la suite du projet de recherche sur la relation potentielle entre la ghréline et l'hyperglycémie caractéristique de nos souris mutantes pour la suite de notre étude.

Chez l'homme, le MODY3 est assimilé à un diabète qui trouve son origine dans un défaut de sécrétion de l'insuline (Byrne *et al*, 1996). Pour les souris, certains auteurs pensent qu'il s'agit également d'un problème de sécrétion (Pontoglio *et al*, 1998). Une étude révèle qu'une dépolarisation de la membrane des cellules β pancréatiques avec du KCL, chez les souris mutantes, permet la libération d'insuline et cela de manière comparable à ce qu'il se passerait pour les souris contrôles, renforçant ainsi le fait que ces cellules peuvent toujours produire de l'insuline pour réguler les fluctuations de la glycémie et que l'hyperglycémie serait bien due à un défaut de sécrétion de l'insuline (Dukes *et al*, 1998). Nous avons mis en évidence une diminution des niveaux d'expression du transcrit *Ins1* et que cela ne corrèle pas avec les taux d'insuline circulante, comme discuté précédemment il faudrait procéder à une mesure des taux protéiques d'insuline produite par les cellules β pancréatiques des animaux mutants et voir si les quantités de l'hormone produites sont suffisantes pour restaurer la glycémie.

Nous avons démontré que les souris *Hnf1 α ^{-/-}* avaient des taux de ghréline active circulante élevés et ce, quel que soit l'âge. La ghréline étant une hormone capable d'intervenir dans l'homéostasie du glucose en inhibant la sécrétion d'insuline, nos résultats suggèrent que les taux élevés de ghréline bioactive puissent être responsables de la diminution de l'insuline circulante et par conséquent l'hyperglycémie liée de nos animaux mutants.

Il a été démontré que la ghréline inhibe la sécrétion d'insuline par sa liaison au récepteur GHSR1a présent à la surface des cellules β pancréatiques (Broglio *et al*, 2001; Broglio *et al*, 2002; Date *et al*, 2002; Dezaki *et al*, 2007; Dezaki *et al*, 2008; Reimer *et al*, 2003). L'administration de ghréline par injection intrapéritonéale augmente d'ailleurs la glycémie (Dezaki *et al*, 2004). De manière réciproque, des traitements avec des inhibiteurs

du récepteur GHSR1a occasionnent une augmentation de la sécrétion d'insuline et une diminution de la glycémie (Dezaki *et al*, 2004). Dans ces études on peut voir que l'effet hyperglycémique de la ghréline est aboli par l'utilisation d'un antagoniste du récepteur à cette hormone, le [D-Lys³]-GHRP6, confirmant que l'action de la ghréline sur l'homéostasie du glucose se fait par l'intermédiaire de ce récepteur situé à la surface des cellules β pancréatiques. En traitant les souris avec cet antagoniste, nous souhaitons bloquer la liaison de la ghréline à son récepteur, de manière à diminuer également la glycémie par un rétablissement de la sécrétion d'insuline. Le traitement avec cet antagoniste n'affecte pas la glycémie des souris contrôles contrairement aux animaux mutants qui présentent une diminution de la glycémie durant les 6 jours de traitement, qui se rapproche de la glycémie moyenne observée chez les animaux contrôles. Les animaux contrôles doivent pouvoir s'adapter au traitement, grâce à leur système hormonal, à une meilleure perception de la glycémie permettant un ajustement de l'homéostasie du glucose. Les souris contrôles avant traitement ont, des taux circulants des différents acteurs hormonaux étudiés, à savoir l'insuline, le Gip, la somatostatine, la leptine et la ghréline normaux. Nous devrions mesurer les modulations de ces acteurs après traitement et ainsi renseigner une possible adaptation de l'organisme de ces animaux contrôles.

Nous avons étudié la récupération des souris $Hnfl\alpha^{-/-}$ ayant subi le traitement à l'antagoniste du récepteur à la ghréline. Nous avons constaté que la glycémie réaugmentait de manière lente et progressive puisqu'il faut attendre environ 23 jours pour retrouver une glycémie équivalente à celle du début du traitement. La dose injectée quotidiennement semble suffisante pour diminuer et maintenir la glycémie pendant plusieurs jours. Cet antagoniste est décrit comme un compétiteur de la ghréline. Nous pouvons penser que les récepteurs à la ghréline GHSR1a sont saturés, désensibilisés ou encore internalisés, et qu'il faut un délai de plusieurs jours pour leur réexpression à la surface des membranes des cellules β pancréatiques (Camina *et al*, 2004; Camina *et al*, 2003; Pazos *et al*, 2007). La lenteur du retour à la glycémie initiale des souris mutantes avant traitement à l'antagoniste peut être due à des modulations d'autres hormones participant à la régulation de la glycémie comme Gip ou Glp-1, par exemple. Il serait envisageable de mesurer au cours du temps les différentes hormones étudiées. On pourrait ainsi spéculer que le retour lent de la

glycémie après l'arrêt du traitement soit lié à une diminution progressive des taux d'insuline circulante. Le traitement pourrait également jouer un rôle dans la production de l'insuline par les cellules β pancréatiques, nous pourrions de nouveau procéder à la mesure des niveaux d'expression du transcrite correspondant et à la détermination de la masse de ces cellules après traitement puis au cours de la phase de récupération.

Nous avons voulu mettre en évidence un lien entre cette diminution de la concentration de glucose sanguin et les modulations des taux d'insuline circulante. Nous avons alors procédé au dosage de cette hormone par test ELISA le lendemain du dernier jour de traitement avec l'antagoniste ou avec une solution de saline chez nos souris mutantes préalablement mises à jeun. Nous avons alors pu constater que les souris $Hnf1\alpha^{-/-}$ traitées avec l'antagoniste montraient une augmentation des taux d'insuline circulante en comparaison avec les souris mutantes traitées avec la solution de saline. L'utilisation de ce composé a permis aux souris mutantes de sécréter une plus grande quantité d'insuline et ainsi diminuer l'hyperglycémie qui les caractérisait. Il est intéressant de remarquer que les taux d'insuline mesurés après traitement avec l'antagoniste au récepteur à la ghréline sont proches de ceux mesurés chez les souris contrôles sans traitement. Le traitement avec l'antagoniste a ainsi permis la restauration d'une sécrétion insulinaire adéquate pour diminuer la glycémie de nos animaux mutants. Dans notre étude, la synthèse d'insuline par les cellules β pancréatiques semble donc suffisante pour assurer une libération nécessaire d'insuline afin de contrecarrer l'hyperglycémie des animaux mutants, et cela malgré des niveaux d'expression du transcrite correspondant à l'insuline diminués dans le pancréas des souris $Hnf1\alpha^{-/-}$ comme discuté précédemment. Ainsi, les niveaux du transcrite insuline ne reflètent pas les taux de protéines dans ce cas. La corrélation entre la quantité d'un transcrite et celle de la protéine peut ne pas être vérifiée dans certains cas, autrement dit une molécule d'ARNm ne donnera pas obligatoirement une protéine (de Sousa Abreu *et al*, 2009; Vogel et Marcotte, 2012). Une étude révèle que la corrélation entre les quantités d'ARNm et de protéine se vérifie dans 40% des cas (Vogel et Marcotte, 2012). Chez les mammifères, la transcription de l'ADN en ARNm est plus lente que la traduction puisqu'une cellule de mammifère fournira deux copies d'ARNm alors que plusieurs dizaines de copies de la protéine seront produites par heure. Il a été démontré que les ARNm sont également moins

stables que les protéines (Schwanhauser *et al*, 2011; Yen *et al*, 2008). L'expression d'un gène peut être modulée au niveau transcriptionnel, au niveau post-transcriptionnel comme avec l'épissage alternatif, la stabilité de l'ARNm, et au niveau de la traduction en protéine puis de sa stabilité. On peut également ajouter que dans le cas du pancréas, la stabilité des ARNs est encore plus courte en raison de la richesse enzymatique de cet organe et peut accroître la différence entre les extraits de transcrits *post mortem* et l'insuline plasmatique prélevée sur des animaux vivants. Normalement l'insuline est synthétisée et sécrétée en réponse à une augmentation de la glycémie (Itoh *et al*, 1978). Les niveaux du transcrit de l'hormone augmentent alors et sont régulés par des facteurs tels que les *RNA-binding proteins* (RBPs), les *microRNAs* (miRNAs) ou encore les *long non-coding RNAs* (lncRNAs) (Bartel, 2009; Lee et Gorospe, 2010; Panda *et al*, 2013; Yoon *et al*, 2012). Parmi les RBPs, on trouve les protéines *polypyrimidine tract-binding protein* (PTBP), *protein-disulfide isomerase* (PDI) et *poly(A)-binding protein* (PABP) qui peuvent augmenter la demi-vie de l'ARNm et par là même augmenter la biosynthèse de l'insuline (Garcia-Blanco *et al*, 1989; Kulkarni *et al*, 2011; Sawicka *et al*, 2008). L'insuline peut être éliminée au niveau du foie, des reins essentiellement et peut être dégradée également par l'*insuline-degrading enzyme* (IDE) (Duckworth *et al*, 1998; Farris *et al*, 2003; Fernandez-Gamba *et al*, 2009). Nous pourrions étudier la présence et la quantification de ces éléments régulateurs comme par exemple, PTBP et PDI pouvant accroître la stabilité des ARNs ou alors les taux de IDE qui, s'ils sont diminués, pourraient permettre de ralentir la dégradation de l'insuline.

Par ailleurs, nous avons également voulu étudier l'effet du traitement à l'antagoniste du récepteur à la ghréline GHSR1a sur les taux de Gip circulant chez les animaux mutants. Nous avons dosé cette hormone par test ELISA et mis en évidence une diminution des taux de Gip circulant chez les souris *Hnf1 α ^{-/-}* traitées avec l'antagoniste comparativement aux souris traitées avec la solution de saline. Ainsi le traitement à l'antagoniste s'accompagne d'une diminution du Gip circulant. Les taux observés sont proches de ceux mesurés chez les souris contrôles sans traitement. Le traitement chez les souris mutantes a permis de diminuer la sécrétion de Gip ; cependant nous ne savons pas si c'est l'augmentation d'insuline dans le sang perçue par l'organisme qui informe à son tour les cellules

produisant le Gip ou alors si c'est la diminution de la glycémie par l'action de l'insuline qui est ressentie par les cellules Gip positives. Certains auteurs ont démontré que l'insuline pouvait réguler les taux de Gip circulant chez le rat, laissant entrevoir qu'une augmentation de l'insuline circulante pouvait diminuer les taux de Gip (Bryer-Ash *et al*, 1994). D'autres études relatent, quant à elles, l'effet de la glycémie sur l'expression du récepteur GIPR à la surface des cellules β pancréatiques chez les patients diabétiques (Lynn *et al*, 2003).

La ghréline est décrite comme une hormone orexigénique, c'est à dire que celle-ci va stimuler l'appétit. Nous voulions donc savoir si l'augmentation des taux de ghréline active circulante chez les souris mutantes pouvait influencer la prise alimentaire et ainsi augmenter la glycémie des animaux. Dans le modèle murin mis au point par Pontoglio, il est mentionné que les souris mutantes présentaient une polyphagie, avec une augmentation de la prise alimentaire de l'ordre de 30% après le sevrage (Dukes *et al*, 1998; Pontoglio *et al*, 1996). Il est possible de penser que les méthodes d'obtention de la souris mutante proposée par l'équipe de Pontoglio et celle proposée par l'équipe de Gonzalez, modèle dont nous disposons, conduisent toutes les deux à la même résultante soit l'absence de production du facteur de transcription Hnf1 α (Lee *et al*, 1998; Pontoglio *et al*, 1996) et que nos souris mutantes ont une prise alimentaire modulée. De plus, nous avons également constaté, dans notre étude, une diminution de la leptine circulante chez nos animaux mutants comparativement aux animaux contrôles. La leptine, étant une hormone anorexigénique, peut concourir à l'augmentation de la prise alimentaire des souris mutantes (Cowley *et al*, 2001; Cui *et al*, 2005; Denver *et al*, 2011; Kmiec, 2011).

Nous avons donc étudié le comportement alimentaire du modèle murin à notre disposition. Pour cela nous avons utilisé des cages métaboliques, permettant de suivre les animaux mutants et contrôles et de mesurer les paramètres tels que la prise alimentaire, les volumes de prise de boisson, de miction ainsi que les quantités de fèces. Sur une durée de 5 jours, nous avons mis en évidence que les souris Hnf1 α ^{-/-} avaient une prise alimentaire supérieure aux souris contrôles. Ce résultat est en accord avec l'augmentation de ghréline active de ces animaux. La ghréline bioactive interagit donc avec les récepteurs situés sur les noyaux arqués de l'hypothalamus pour renseigner l'organisme. Cette signalisation est

donc activée de manière dose-dépendante. Les animaux mutants produisent également plus de fèces que les animaux contrôles. Pour expliquer cela, nous pouvons penser, premièrement, que le fait de manger plus peut contribuer à produire plus de déchets. De plus, il a été démontré que la ghréline agissait sur la motilité gastrique et intestinale (Wren *et al*, 2001; Wren *et al*, 2000). Cette hormone a la particularité de stimuler le complexe moteur de migration du bol alimentaire résultant en une augmentation de la vidange gastrique et en augmentant également le transport tout au long de l'intestin et la production de selles (Charoenthongtrakul *et al*, 2009; Fujino *et al*, 2003; Murray *et al*, 2005; Tack *et al*, 2006; Wang *et al*, 2007). Des traitements basés sur l'administration orale d'agonistes ciblant les récepteurs à la ghréline sont actuellement à l'étude pour lutter contre l'hypomotilité gastrointestinale (Charoenthongtrakul *et al*, 2009; Venkova *et al*, 2007).

Les souris $Hnfl\alpha^{-/-}$ ont également une augmentation du volume de boisson par rapport aux souris contrôles. L'augmentation de la polydipsie fait partie intégrante des symptômes recherchés chez une personne diabétique. À la polydipsie s'ajoute également chez les souris mutantes une polyurie observée qui, elle aussi, est un symptôme connu chez les patients diabétiques. Ainsi, les souris $Hnfl\alpha^{-/-}$ représentent un modèle de souris diabétiques.

Le traitement avec l'antagoniste faisant baisser la glycémie chez nos souris $Hnfl\alpha^{-/-}$, nous avons voulu nous assurer que cela n'était pas le fait d'une diminution de la prise alimentaire. En effet, l'utilisation d'un tel antagoniste pourrait cibler tous les récepteurs GHSR1a de l'organisme y compris ceux des noyaux arqués et ainsi diminuer la prise alimentaire par une réduction de l'appétit. Une étude dans laquelle cet antagoniste a été utilisé révèle une modulation de la prise alimentaire des animaux où le gène codant pour la leptine a été invalidé (Asakawa *et al*, 2003). Pour évaluer cela dans nos souris mutantes et contrôles, nous avons effectué des traitements à l'antagoniste en utilisant les cages métaboliques. Nous avons ainsi pu mesurer différents paramètres, dont la prise alimentaire. En comparant la prise alimentaire entre le premier et le dernier jour de traitement, on constate que le traitement à l'antagoniste du récepteur à la ghréline ne modifie pas la prise de nourriture des souris mutantes de même que celle des souris contrôles. Ainsi la

diminution de la glycémie à la fin du traitement pour les souris mutantes n'est pas liée à une diminution de l'appétit de ces souris. On peut penser que l'antagoniste utilisé ne passe pas la barrière céphalorachidienne et n'agit donc pas sur les récepteurs régissant la prise alimentaire. On n'observe pas non plus de modification de la quantité de fèces produite entre les 2 groupes d'animaux.

Nous avons également voulu rechercher comment les souris mutantes traitées avec l'antagoniste au récepteur GHSR1a répondaient à un stress glycémique pour étudier la modulation de la tolérance au glucose après un tel traitement. Nous avons donc mené des expériences de test de tolérance au glucose par injection intrapéritonéale. Dans notre précédente étude, nous avons cette fois procédé à un test de tolérance au glucose mais en administrant le glucose par voie orale, en procédant à un gavage. Nous avons alors vu que le transport du glucose au travers de la paroi intestinale était ralenti (Lussier *et al*, 2010). Dans cette même étude, nous avons démontré un passage transmembranaire et paracellulaire altéré. Pour supprimer ces paramètres, nous avons choisi d'administrer le glucose par injection intrapéritonéale et ainsi mesurer la réponse des animaux à une augmentation directe de la concentration de glucose sanguin. Les souris contrôles traitées avec l'antagoniste au récepteur à la ghréline GHSR1a ou traitées avec la solution de saline vont répondre de la même manière à l'injection de sucre par voie intrapéritonéale, avec un pic de la glycémie au bout de 15 minutes. Les souris contrôles ne répondent donc pas au traitement et ce dernier n'affecte pas leur réponse au test de tolérance au glucose intrapéritonéal. On peut penser que, chez les animaux contrôles, les facultés à ressentir le glucose et à traiter l'information ne sont pas altérées par le traitement et que d'autres hormones prennent le relais pour adapter le déficit de la signalisation passant par la ghréline. Les souris mutantes traitées avec l'antagoniste au récepteur ont une glycémie plus basse que les souris mutantes traitées avec une solution saline démontrant ainsi que le traitement a bien diminué la glycémie chez nos souris mutantes. Les souris mutantes traitées à l'antagoniste préalablement ont un pic glycémique moins élevé à 15 minutes que celles ayant reçues de la saline. Il est possible que cette différence soit due au fait que les souris traitées à l'antagoniste ont une glycémie au début de l'expérimentation plus basse que les souris mutantes traitées à la saline. Au bout de 2 heures, les souris mutantes traitées

avec l'antagoniste voient leur glycémie redescendre à une concentration proche de celle qu'elles avaient au départ, avant injection de glucose alors que celles traitées avec une solution de saline présentent une glycémie qui reste très élevée, prouvant donc que ces animaux mutants sont intolérants au glucose. Nous pouvons envisager que le traitement à l'antagoniste a donc permis de restaurer une réponse adéquate à une augmentation forcée de la glycémie comme après un repas. Comment ces souris traitées avec l'antagoniste au récepteur à la ghréline peuvent-elles répondre de manière adaptée à ce stress ?

L'étape suivante a été de corrélérer cette adaptation à un stimulus engendré par l'injection de glucose à la quantité et la rapidité d'insuline sécrétée en réponse à ce choc glucidique. Pour cela nous nous sommes intéressés aux taux d'insuline après injection de glucose. Les souris contrôles, traitées ou non avec l'antagoniste réagissent de la même manière en sécrétant les mêmes quantités d'insuline en réponse à l'injection de glucose, les souris contrôles libèrent de l'insuline et ces taux d'insuline diminuent progressivement dans les minutes suivantes et cela conformément à ce que nous avons mis en évidence précédemment avec des profils de courbe glycémique semblables. On peut penser que le traitement n'occasionne pas d'amélioration de la sensibilité vis à vis du glucose et de la réponse engendrée chez les animaux contrôles. Encore une fois, l'organisme de la souris contrôle doit donc s'adapter à l'inactivation de la signalisation faisant intervenir la ghréline au niveau pancréatique. En ce qui concerne les souris mutantes traitées à l'antagoniste du récepteur à la ghréline, on a pu mettre en évidence une meilleure réponse au stress glycémique en déclenchant une plus grande sécrétion d'insuline que chez les souris $Hnfl\alpha^{-/-}$ traitées avec une solution de saline. Il semble que le traitement à l'antagoniste pour les souris mutantes leur permette de retrouver leur capacité à sécréter l'insuline et cela même en condition de stress glucidique. Leur sécrétion d'insuline est ponctuelle et décroît peu à peu en corrélation avec la glycémie chez ces animaux. Le traitement avec cet antagoniste a donc amélioré la tolérance des souris mutantes au glucose et cela par une meilleure sécrétion d'insuline. Des observations similaires ont été mises en évidence notamment en utilisant des souris doubles mutantes où les gènes codant pour la leptine et la ghréline ont été invalidés. Ces souris ont la particularité d'avoir une augmentation de la sécrétion d'insuline en réponse à un choc glycémique en plus de développer une sensibilité à

l'insuline accrue (Ahima, 2006; Sun *et al*, 2006). Les auteurs ont rapporté que la perte de la ghréline engendrait une diminution de l'expression de la protéine mitochondriale *uncoupling protein-2* (Ucp2) qui régule la production d'ATP. La diminution d'Ucp2 s'accompagne d'une augmentation du ratio ATP/ADP nécessaire à la fermeture des canaux K^+ /voltage-dépendants entraînant une dépolarisation de la membrane plasmique permettant l'entrée de Ca^{2+} et par conséquent la libération d'insuline par exocytose (Sun *et al*, 2006). Les souris Ucp2^{-/-}ob/ob, présentent également une amélioration vis à vis de la tolérance au glucose (Zhang *et al*, 2001). On peut donc penser que la ghréline a un impact sur la sensibilité des cellules β pancréatiques à répondre au glucose en régulant l'expression d'Ucp2. Le traitement avec l'antagoniste pourrait diminuer l'expression de cette protéine mitochondriale et donc augmenter la sécrétion d'insuline. Il serait envisageable, dans un premier temps, de renseigner les niveaux d'expression du transcrit d'Ucp2, puis de la protéine chez nos animaux mutants et contrôles.

Les souris mutantes traitées avec des injections de saline conservent de grandes quantités de Gip circulant, et nous ne voyons aucune modulation entre les différents temps. Cette incrétine est, comme nous l'avons vu précédemment, augmentée dans le sang chez les animaux mutants et ce, malgré une diminution du nombre de ces cellules la produisant dans le jéjunum. Des auteurs ont démontré qu'elle perdait son effet insulinothrompique, par désensibilisation ou diminution du nombre de ses récepteurs à la surface des cellules β pancréatiques (Holst *et al*, 1997; Nauck *et al*, 1993; Zhou *et al*, 2007). Nous avons mis en évidence que cette augmentation de Gip dans le sang pouvait être due, en partie, à l'accumulation de l'hormone à cause d'un défaut de sa dégradation par la Dpp4 qui est diminuée chez les animaux mutants. Il serait envisageable de mesurer l'effet du traitement à l'antagoniste sur la dégradation du Gip en réalisant un ELISA pour visualiser les modulations de Dpp4 chez les animaux après traitement. Les animaux Hnf1 α ^{-/-} qui ont été traités à l'antagoniste durant 6 jours puis stimulés par une injection intrapéritonéale de glucose présentent des taux de Gip circulant diminués si on les compare avec les animaux mutants ayant reçu des injections de saline. Cette diminution des taux de Gip circulant semble être adéquate à la quantité de glucose circulante et à une quantité d'insuline moindre, tout comme les animaux contrôles traités avec une solution de saline. Les

quantités de Gip circulant diminuent à 120 minutes pour se rapprocher de celles des souris contrôles ayant reçu un traitement à l'antagoniste. Le traitement avec l'antagoniste au récepteur à la ghréline a donc permis pour les souris $Hnf1\alpha^{-/-}$ d'observer une diminution de Gip dans le sang.

Les souris mutantes ainsi traitées présentent une meilleure tolérance au glucose avec une réponse adéquate des 2 hormones hypoglycémiantes que sont l'insuline et indirectement le Gip. Comme abordé plus haut, nous ne savons pas si la diminution de l'hormone Gip circulante observée chez les animaux mutants traités avec l'antagoniste est liée directement ou indirectement au traitement. Cet antagoniste ne ciblant pas les mêmes récepteurs liant Gip, on peut penser que la diminution de Gip est liée à la diminution de la glycémie ou à la diminution des taux d'insuline circulante.

Les cellules K produisant le Gip au niveau de la partie proximale de l'intestin sont des cellules entéroendocrines comportant un pôle apical au contact de la lumière intestinale (Buffa *et al*, 1975). Ces cellules productrices de Gip présentent à leur surface des récepteurs capables de ressentir la concentration en sucres de la lumière, ce sont les *taste receptors* T1R2 et T1R3 (Greenfield et Chisholm, 2013). Si la concentration intestinale de sucre arrive à une valeur seuil, les cellules entéroendocrines déversent dans la circulation sanguine Gip qui ira se fixer sur ses récepteurs à la surface des cellules β pancréatiques pour augmenter la production et la libération d'insuline et ainsi contrecarrer l'augmentation de la glycémie. Nous pourrions cette fois mener un test de tolérance au glucose par voie orale après traitement des animaux avec l'antagoniste au récepteur à la ghréline et ainsi voir si les modulations de Gip sont consécutives à la glycémie perçue dans le tube digestif ou plutôt la conséquence de la diminution de l'insuline circulante. Nous pourrions également reproduire une expérience de test de tolérance au glucose par injection intrapéritonéale en effectuant des prélèvements plus précoces après l'injection et ainsi voir si les taux de Gip réagissent en premier lieu aux modulations de l'insuline ou aux fluctuations de la glycémie.

Les souris $Hnf1\alpha^{-/-}$ au premier jour du traitement avec l'antagoniste du récepteur GHSR1a mettent en évidence, pour la majorité d'entre elles, une glycosurie élevée alors

qu'à la fin du traitement celle-ci est diminuée. Le traitement à l'antagoniste a pour effet de diminuer la glycosurie chez les souris mutantes. L'équipe de Pontoglio a rapporté que les souris $Hnf1\alpha^{-/-}$ souffraient du syndrome de Fanconi caractérisé par une polyurie, glycosurie, phosphaturie, et une aminoacidurie (Pontoglio *et al*, 1996). Plus tard cette même équipe attribua la glycosurie de ces animaux à un défaut de réabsorption du glucose au niveau des tubules proximaux des reins avec une diminution de l'expression du co-transporteur Sglt2 (Pontoglio *et al*, 2000). Dans notre étude, nous montrons que la glycosurie des animaux $Hnf1\alpha^{-/-}$ peut être diminuée par un traitement avec l'antagoniste de la ghréline laissant penser que c'est une conséquence de la diminution de la glycémie dans le sang et non entièrement dû à un défaut de réabsorption du glucose au niveau des reins.

Nos résultats sont cependant critiquables. Le diabète de type 2 est caractérisé par une perturbation de la sécrétion d'hormones notamment l'insuline mais également une perturbation des effets de cette hormone sur les tissus cibles. Dans notre étude, nous avons omis d'étudier un aspect important qu'est celui de la sensibilité à l'insuline des autres tissus périphériques. L'insuline est l'hormone qui régule la glycémie en contrôlant la production du glucose par le foie et son utilisation par le muscle. En cas d'exercice ou de jeûne, l'organisme peut aussi utiliser, au niveau du tissu adipeux, les triglycérides via la lipolyse adipocytaire donnant des acides gras. Pour ce qui est de nos souris mutantes comme précédemment mentionné, celles-ci sont de petite taille et semblent dépourvues de graisse blanche qui représente un espace de stockage important de l'énergie sous forme de triglycérides. Il faudrait comparer la composante adipeuse de ces souris aux souris contrôles. Nous avons, par ailleurs, constaté que les souris mutantes présentaient de grosses vacuoles blanches dans les hépatocytes laissant présumer une stéatose hépatique lors de l'observation des foies des animaux après coloration à l'hématoxyline et à l'éosine (résultats non montrés). Nous n'avons pas caractérisé d'avantage cette observation, une coloration adéquate permettant de mettre en évidence les lipides présents aurait été judicieuse. On peut penser que cette stéatose hépatique est une compensation de stockage de lipides, en raison du peu de graisse blanche observée chez les animaux mutants. Notre précédente étude avait également mis en évidence une hépatomégalie et, grâce à notre micropuce à ADN, un dysfonctionnement du métabolisme et du transport lipidique avec

une diminution des gènes codant pour l'alpha-fétoprotéine, les apolipoprotéines A-IV, C-II et la FABP1L (Lussier *et al*, 2010). Les caractérisations du modèle par Pontoglio et par Lee faisaient également état de dysfonctionnement hépatique avec une augmentation des aminotransférases AST et ALT, et du métabolisme lipidique avec une hypercholestérolémie alors que les taux circulants de triglycérides chez les souris mutantes étaient restés inchangés (Lee *et al*, 1998; Pontoglio *et al*, 1996). L'abondance de lipides au niveau du foie pourrait s'accompagner d'une perturbation de la sensibilité de cet organe vis à vis de l'insuline, on parlera alors de lipotoxicité. Cette dernière pourra conduire à une diminution de la sensibilité à l'insuline au niveau du foie menant à la résistance à l'insuline et l'instauration du diabète de type 2 (Trauner *et al*, 2010). Des études montrent que la signalisation de l'insuline peut être altérée par les lipides, le diacylglycérol ou encore les céramides (Kotronen *et al*, 2009; Koyama *et al*, 1997; Puri *et al*, 2007; Szendroedi et Roden, 2009; Thomas *et al*, 2013). Il serait alors envisageable de mesurer chez les souris mutantes et les souris contrôles traitées ou non à l'antagoniste la résistance à l'insuline au niveau hépatique et en s'intéressant aux altérations des mitochondries et au stress du réticulum endoplasmique (Abdul-Ghani *et al*, 2007).

La lipotoxicité peut aussi être à l'œuvre au niveau du pancréas et pourrait également influencer, en plus de la glucotoxicité, la transcription du gène codant pour l'insuline en diminuant celle-ci (Poitout *et al*, 2006). L'expression des récepteurs aux incrétines à la surface des cellules β pancréatiques peut également être altérée par la lipotoxicité (Poitout, 2013). Nous pourrions alors renseigner les modulations de ces acteurs de l'homéostasie du glucose entre animaux contrôles et mutants, en absence ou après traitement avec l'antagoniste du récepteur à la ghréline.

Le muscle squelettique, comme mentionné précédemment, est lui aussi un site important en ce qui concerne le métabolisme glucidique. La lipotoxicité y joue aussi un rôle influençant la signalisation de l'insuline en inhibant en particulier, la translocation du cotransporteur GLUT4 au niveau de la membrane plasmique et donc en diminuant l'entrée de glucose dans la cellule et par conséquent augmentant la glycémie (Garvey *et al*, 1998; Hue et Taegtmeyer, 2009). Chez l'homme une corrélation a également été établie entre le

contenu intramusculaire lipidique et la sensibilité à l'insuline de ce tissu (Muoio, 2010). Il serait donc opportun d'étudier les différences de contenu lipidique musculaire de même que la présence de GLUT4 entre les animaux contrôles et mutants avant et après traitement à l'antagoniste.

Le glucose et son exposition chronique à fortes doses peuvent également occasionner des effets néfastes sur les cellules β pancréatiques. A court terme, on pourra voir une hyperplasie des cellules produisant l'insuline et à long terme des désordres métaboliques apparaîtront alors. L'excès de glucose va entraîner la formation exagérée de radicaux oxygénés par les mitochondries, la diminution de la masse des cellules et leur apoptose (Brownlee, 2005; D'Alessandris *et al*, 2004; Newsholme *et al*, 2007; Poitout et Robertson, 2002).

Pour déterminer les changements de sensibilité des différents tissus comme le foie et le muscle nous pourrions procéder à des expériences de clamp euglycémique hyperinsulinémique. Cette technique va permettre de mesurer la production de glucose par le foie et l'utilisation de glucose par le tissu adipeux et les muscles squelettiques à l'état basal et au cours d'une euglycémie et d'une hyperinsulinémie. On perfuse de l'insuline par voie intraveineuse à débit constant pour stimuler l'utilisation du glucose par les tissus périphériques, pour inhiber la production hépatique de glucose et maintenir une concentration plasmatique stable d'insuline. Pour maintenir la glycémie constante du glucose est à son tour ajouté par voie intraveineuse, la quantité de glucose perfusée est alors égale à celle utilisée si la production de glucose par le foie est totalement inhibée. Une injection de glucose radioactif est à son tour ajoutée. On peut ainsi suivre les vitesses de glycolyse et de stockage du glucose en glycogène, la transformation de glucose radioactif donnera la vitesse d'oxydation du glucose (Yamazaki *et al*, 2014).

Ainsi, ce traitement à l'antagoniste au récepteur GHSR1a permet aux souris $Hnfl\alpha^{-/-}$ de diminuer leur glycémie de manière significative par une libération adéquate d'insuline. Cela a pour conséquence d'abaisser les taux de Gip circulant, de diminuer la polydipsie et la polyurie, qui sont des symptômes reconnus chez certains patients atteints de diabète de

type 2. Le traitement va également accroître la tolérance au glucose, améliorant la réponse à une augmentation de la glycémie, des animaux mutants. Toutefois il faudrait s'assurer que c'est bien cette augmentation de ghréline produite par le tractus digestif qui est responsable de l'inhibition de la sécrétion d'insuline par les cellules β pancréatiques en agissant sur son récepteur. Si nous disposions d'animaux mutants dans lesquels le gène *Hnf1 α* était invalidé uniquement dans l'intestin, nous pourrions affiner notre étude et répondre à la question qui est de savoir si c'est bien la ghréline produite par les cellules entéroendocrines intestinales qui est responsable de l'inhibition de la sécrétion d'insuline et conséquemment de l'hyperglycémie. Ainsi nous éliminerions par la même occasion le rôle des autres sources de ghréline de l'organisme dans l'inhibition de la sécrétion d'insuline. Enfin, on pourrait penser à obtenir un modèle murin double mutant *Hnf1 α ^{-/-} Ghsl^{-/-}* et ainsi évaluer si, en bloquant la signalisation activée par la ghréline, on pourrait obtenir un rétablissement de la glycémie du même ordre que lors de l'utilisation d'un antagoniste à ce même récepteur comme nous l'avons mis en évidence.

Nos études chez la souris suggèrent donc qu'un antagoniste du récepteur à la ghréline GHSR1a pourrait avoir un impact thérapeutique intéressant pour augmenter la sécrétion d'insuline chez les diabétiques atteints du MODY3 et ainsi améliorer leur contrôle glycémique. En terme de thérapie de l'hyperglycémie liée à la ghréline par son action inhibitrice sur la sécrétion d'insuline, on peut penser à 3 concepts. Le premier serait de procéder par neutralisation à l'aide d'anticorps spécifiques dirigés contre la forme acylée de la ghréline. Plusieurs études relatent l'utilisation de tels vaccins (Lu *et al*, 2009; Sangiao-Alvarellos *et al*, 2011). L'inconvénient de ce type de traitement est que son action est systémique et qu'il affecterait ainsi d'autres fonctions attribuées à la ghréline comme son rôle orexigénique. C'est ce que l'on peut voir notamment avec l'emploi de l'anticorps bloquant 33A ciblant la ghréline active qui a pour effet de diminuer la prise alimentaire des souris (Lu *et al*, 2009). Une seconde approche serait d'utiliser un agoniste inverse à la ghréline. Ce composé pourrait se lier au récepteur à la ghréline et par conséquent l'inactiver. L'emploi d'un agoniste inverse est utile sur un récepteur spontanément activé mais peut créer des effets indirects. Actuellement des études visent à développer de tels composés mais aucun essai clinique n'est en cours (Holst *et al*, 2006; Mear *et al*, 2013;

Sivertsen *et al*, 2013). La troisième stratégie thérapeutique est basée sur l'utilisation d'un antagoniste qui se fixe et empêche l'activation du récepteur GHSR1a. Certaines études cliniques sont actuellement en cours. Elixir pharmaceuticals conduit l'étude de l'antagoniste EX-1350 en phase 2 et Tranzyme Pharma a débuté la phase pré-clinique pour étudier le composé TZP-301.

À long terme il serait possible d'envisager une étude sur les patients atteints du MODY3. Nous travaillons actuellement, en collaboration avec la Docteure Marie-France Hivert, à l'établissement d'une banque de patients atteints par ce sous-type de diabète au niveau du Centre hospitalier universitaire de Sherbrooke. L'accès à une telle banque permettrait de mesurer les variations de la ghréline ainsi que d'autres hormones comme le GIP, le GLP-1, la leptine, la somatostatine, l'insuline et le glucagon. Nous pourrions aussi doser la DPP4. L'accès à la banque permettrait également d'associer de façon statistique si les mutations du gène codant pour HNF1 α corrélaient avec une augmentation de ghréline totale et de la ghréline active dans le sang.

Une fois cette banque de patients constituée, la ghréline sera dosée par test immunologique ELISA. Les patients devront compléter un questionnaire médical pour renseigner leurs antécédents médicaux et leurs médicaments. Les patients devront observer un jeun de 12 heures avant la visite. Nous procéderons à leur prise de poids, de taille, tour de taille et des signes vitaux. Un premier prélèvement sanguin sera fait à leur arrivée. Les patients mangeront un déjeuner composé de deux tranches de pains grillées avec confiture de fraises ainsi qu'un verre de jus d'orange. Par la suite, de nouveaux prélèvements sanguins seront réalisés à la fin du repas. Les échantillons de sang seront traités de manière à récupérer le sérum pour les dosages ELISA de la ghréline active et totale.

Nous proposons également d'étudier les variations d'autres hormones comme le GIP, le GLP-1, la leptine, la somatostatine, l'insuline et le glucagon. Nous pourrions aussi doser la DPP4. L'accès à la banque permettra également de renseigner quelles mutations du gène codant pour HNF1 α sont associées à l'augmentation de ghréline totale et de la ghréline active dans le sang.

Nous avons mis en évidence dans cette étude que la perte de Hnf1 α chez la souris, s'accompagnait d'une augmentation des niveaux d'expression du transcrite correspondant à la ghréline dans le jéjunum et dans le pancréas. Dans la majorité des cas, HNF1 α a été décrit comme un activateur de la transcription de ses gènes cibles (Dohda *et al*, 2004; Rollier *et al*, 1993; Staloch *et al*, 2005; Zhu *et al*, 2010). Cependant, il est de plus en plus envisagé qu'un facteur de transcription puisse agir de façon positive ou encore négative sur la transcription en fonction du contexte particulier d'un gène. Nous avons ainsi émis l'hypothèse que le facteur de transcription Hnf1 α pourrait agir comme un répresseur transcriptionnel du gène codant pour la ghréline.

Dans un deuxième temps, nous avons constaté l'augmentation des niveaux d'expression du gène ghréline lors de l'infection des cellules MIN6 avec le shARN dirigé contre le transcrite de Hnf1 α . Idéalement, pour nous rapprocher le plus possible de nos observations *in vivo* chez la souris, il aurait été envisageable de partir de cultures primaires de cellules entéroendocrines produisant de la ghréline. Nous nous sommes heurtés au fait que l'ensemble des cellules entéroendocrines dans l'intestin ne représente que 1% de la totalité des cellules épithéliales intestinales (Schonhoff *et al*, 2004). Cette rareté, accompagnée de la difficulté de réaliser des cultures primaires de cellules épithéliales, nous a amené à envisager d'autres options. Une autre possibilité aurait été de travailler avec des îlots de Langerhans isolés à partir de nos souris mutantes et contrôles. En effet les îlots pancréatiques renferment des cellules productrices de ghréline, les cellules ϵ mais dans ce cas les cellules en cultures auraient été hétérogènes puisque renfermant plusieurs types cellulaires (Andralojc *et al*, 2009; Wierup *et al*, 2002). Dans une approche préliminaire nous nous sommes tournés vers l'utilisation lignées cellulaires immortalisées en connaissant les désavantages liés à cette utilisation : mutations de gènes, perturbations, du cycle cellulaire, de la signalisation cellulaire et de l'apoptose. Notre choix d'utiliser les cellules MIN6 pour nos expériences de culture cellulaire s'explique par le fait qu'elle est une des rares lignées à exprimer la ghréline, la Sst et l'insuline. Nous avons, par ailleurs, observé une relevance dans la perte d'expression de Hnf1 α et l'expression de ces gènes dans le pancréas de la souris. La perte de Hnf1 α n'affecte pas les niveaux d'expression des gènes qui codent pour l'insuline et la somatostatine. Pour ce qui est de l'insuline, une étude

révèle que les cellules MIN6 cultivées à partir d'un nombre de passages cellulaires compris entre 30 et 40 présentaient une diminution de la sécrétion d'insuline en réponse au glucose, de même qu'une réduction de l'expression de la proinsuline (Cheng *et al*, 2012). Nous avons utilisé des cellules en culture avec 39 à 42 passages. Les niveaux du transcrite correspondant à l'insuline sont peut être déjà diminués dans ces cellules ayant subi de nombreux passages. Cela pourrait expliquer pourquoi la perte de Hnf1 α n'altère pas d'avantage la transcription du gène insuline. Il pourrait en être de même pour le transcrite Sst et même avoir un impact sur celui de la ghréline. Il faudrait alors reproduire nos expériences avec des cellules MIN6 ayant subi moins de passages cellulaires. Nous pourrions également valider nos observations dans d'autres lignées cellulaires susceptibles de produire de la ghréline comme les cellules TT originaires d'un carcinome de la thyroïde humain (Kanamoto *et al*, 2001), les cellules HL-60, THP-1, SupT1 ou HELL provenant de leucocytes (De Vriese et Delporte, 2007; De Vriese *et al*, 2005) qui furent utilisées pour étudier la production de ghréline. Plus récemment, une nouvelle lignée cellulaire a été identifiée. Il s'agit des cellules MGN3-1 qui proviennent d'un ghrélinome gastrique et qui ont la particularité de pouvoir produire d'importantes quantités de ghréline bioactive (Iwakura *et al*, 2011; Iwakura *et al*, 2010).

Pour réguler la transcription du gène ghréline, il est attendu que le facteur de transcription Hnf1 α puisse se fixer de façon spécifique sur l'ADN du gène en question. L'analyse des 2500 premiers nucléotides adjacents au site initiateur de la transcription du gène ghréline a permis d'identifier 10 sites de liaison pour Hnf1 α . Nous avons démontré que Hnf1 α se liait sur 4 des 5 régions renfermant les 10 sites prédits. La présence possible de Hnf1 α en autant de sites de liaison et sur une petite portion du génome laisse penser que le gène ghréline est hautement régulé par Hnf1 α .

Puisque le facteur de transcription Hnf1 α peut donc interagir physiquement avec le promoteur de la ghréline en plusieurs points, il fallait désormais établir si cette présence pouvait être corrélée à une répression de la transcription du gène ghréline. Aucune étude ne relate ce facteur de transcription comme un répresseur transcriptionnel. Pour savoir si la transcription d'un gène est activée ou réprimée, il est possible de mesurer l'état de la

chromatine par des marques épigénétiques. En effet une chromatine ouverte, décondensée sera propice à la transcription de gènes (Kobayashi et Kikyo, 2014). L'ADN sera alors accessible au recrutement des protéines régulatrices constituant la machinerie transcriptionnelle. A l'inverse une chromatine compacte, condensée sera dite inactive et ne permettra pas la transcription de gènes. Ainsi le remodelage de la chromatine est essentiel pour conditionner la régulation des gènes (Swygert et Peterson, 2014a). Ce remodelage est tributaire de modifications des extrémités N-terminales des histones comme des méthylations. Certaines méthylations des histones représentent des marques de répression ou d'activation de la transcription des gènes (Rivera *et al*, 2014). Nous avons décidé de porter notre attention sur deux marques précises de méthylation. Ainsi, on a pu démontrer que la présence de Hnfl α sur le gène ghréline pouvait être associée à une méthylation répressive alors que l'inverse était observé en absence de Hnfl α . Nous pourrions compléter ces observations et continuer à documenter la régulation de la transcription du gène ghréline par le facteur Hnfl α en allant identifier les partenaires requis pour cette répression de la transcription. Par exemple, en utilisant une approche par spectrométrie de masse, nous pourrions identifier certains cofacteurs associés à Hnfl α dans ce contexte tels que le *polycomb repressive complex* (PRC), les histones déacétylases, ou encore les remodeleurs de la chromatine comme SWI/SNF (Cao *et al*, 2002; Taghavi et van Lohuizen, 2006). Nous pourrions également réaliser des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine sur tissu en utilisant des sections de jéjunum proximal provenant des souris mutantes et des souris contrôles (Garrison *et al*, 2006).

Dans le cas de la triméthylation répressive de l'histone H3 sur la lysine en position 27, il a été rapporté que des membres de la famille des protéines « Polycomb Group proteins » (PcG) pouvaient intervenir pour permettre la répression des gènes, comme PRC1 et PRC2 méthylant spécifiquement l'histone H3 sur la lysine 27 (Simon et Kingston, 2009). Nous pourrions ainsi aller valider la présence de ces partenaires et donc la répression du gène ghréline par des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine tout comme précédemment, c'est à dire dans les cellules MIN6 après infections lentivirales avec le shNT ou le shHNF1 α . Pour la triméthylation activatrice H3K36me3, nous pourrions étudier la présence d'un partenaire essentiel comme CHD1 « chromodomain containing

remodeler » (Sims et Reinberg, 2009; Smolle *et al*, 2012). De même, nous pourrions valider le recrutement de marques activatrices de la transcription du gène ghréline réalisant des expériences d'immunoprécipitation de manière similaire. D'autres marques de répression/activation de la transcription du gène ghréline comme la méthylation des arginines par les peptidylarginine methyltransferases (PRMTs) pourraient également être étudiées (Bedford, 2007).

Enfin, le facteur de transcription Hnf1 α semble être un acteur important de l'homéostasie du glucose en modulant la transcription d'autres gènes intervenant dans le métabolisme glucidique comme la sucrase isomaltase, SGLT1, SGLT2 (Balakrishnan *et al*, 2008; Boudreau *et al*, 2001; Freitas *et al*, 2008). Une étude révèle que l'activité de liaison à l'ADN de Hnf1 α peut être rythmée par son état de phosphorylation (Carriere *et al*, 2001). Ainsi lorsque Hnf1 α est hyperphosphorylée, notamment suite à l'inhibition des protéines phosphatases 1/2A qui sont impliquées dans la régulation du métabolisme glucidique, sa capacité de liaison à l'ADN tout comme sa stabilité décroissent. Nous pourrions ainsi envisager de renseigner l'état de phosphorylation et la stabilité de Hnf1 α en fonction de la glycémie. Des expériences menées sur les cellules MIN6 cultivées à différentes concentrations en glucose permettraient de mesurer les niveaux d'expression et les quantités de Hnf1 α puis de ghréline qui en découlent.

Conclusion

Tout au long de notre étude, nous avons pu évaluer l'impact de la perte du facteur de transcription *Hnf1 α* sur l'homéostasie du glucose. Dans notre modèle murin où le gène *Hnf1 α* a été invalidé, nous avons caractérisé une augmentation des niveaux d'expression du transcrit ghréline, corrélée à une augmentation des taux plasmatiques de l'hormone sous sa forme active. La ghréline bioactive est un acteur essentiel de la régulation de la glycémie, puisque cette hormone peut inhiber la sécrétion de l'hormone hypoglycémisante indispensable : l'insuline. Il était déjà connu que la ghréline peut se fixer sur son récepteur GHSR1a à la surface des cellules β pancréatiques sécrétant l'insuline et ainsi inhiber l'exocytose des granules de sécrétion.

Les souris *Hnf1 α ^{-/-}* présentent une hyperglycémie liée à une diminution de la sécrétion de l'insuline. Nous avons entrepris de traiter les souris mutantes avec un antagoniste du récepteur à la ghréline. Au bout de 6 jours de traitement, la glycémie des animaux mutants est diminuée et elle est comparable à celle des animaux contrôles. Cette diminution de la glycémie est la conséquence de taux de sécrétion d'insuline restaurés. Les souris *Hnf1 α ^{-/-}* traitées à l'antagoniste retrouvent également une polydipsie et une polyurie normales, signes d'un rétablissement des troubles liés au diabète. Ce rétablissement est également visible en observant la glycosurie, où l'on peut voir que le glucose urinaire est en nette diminution après traitement. Les souris mutantes traitées présentent également une meilleure tolérance au glucose en cas de stress glycémique, avec une réponse adéquate et rapide de la libération d'insuline. L'attribution de l'hyperglycémie des animaux mutants à l'augmentation de la ghréline active circulante semble être démontrée toutefois nous ne pouvons, pour le moment, affirmer que c'est la ghréline d'origine intestinale qui en est l'entière responsable. En effet, nos résultats ne permettent pas d'écarter toute autre contribution par des tissus producteurs de ghréline, notamment le pancréas où l'on décele une augmentation du transcrit correspondant à cette hormone. Les cellules ϵ pancréatiques

sont contenues dans les îlots de Langerhans et à proximité des cellules β pancréatiques laissant penser à une action paracrine de la ghréline produite par le pancréas.

Hnf1 α étant un facteur de transcription, nous avons pensé que Hnf1 α pourrait jouer un rôle de répresseur transcriptionnel vis à vis du gène ghréline chez la souris. Dans le modèle cellulaire β pancréatique MIN6, la perte de Hnf1 α s'accompagne également d'une augmentation des niveaux d'expression du transcrite ghréline, supportant les observations chez l'animal. Nous avons démontré que le facteur de transcription pouvait se lier en plusieurs sites sur la région promotrice proche du site initiateur de la transcription du gène ghréline. Hnf1 α étant décrit comme un transactivateur, nous avons tenté d'apporter des éléments visant à démontrer qu'il peut également jouer le rôle de répresseur de la transcription de gènes. Nous nous sommes intéressés à des marques épigénétiques de l'état de la chromatine et donc sur la répression/activation de la transcription du gène ghréline. En présence de Hnf1 α , la chromatine est compacte donc moins active comme on peut le voir avec la présence de la marque répressive H3K27me3. Par contre et en absence de Hnf1 α , nous voyons la présence de la triméthylation H3K36me3, signe d'une chromatine décondensée et apte au recrutement de la machinerie nécessaire à la transcription du gène ghréline. Nous proposons le modèle de régulation suivant :

En présence du facteur de transcription Hnf1 α :

Hnf1 α se fixe en plusieurs sites sur le promoteur du gène codant pour la ghréline. La présence du facteur de transcription est associée à la triméthylation de l'histone H3 sur la lysine en position 27. La chromatine se trouve donc dans une conformation condensée, la transcription du gène ghréline est donc amoindrie ce qui correspond éventuellement à une diminution de la production de l'hormone. Les cellules β pancréatiques réagissent ainsi à l'arrivée du glucose et l'insuline est alors sécrétée (Figure 24).

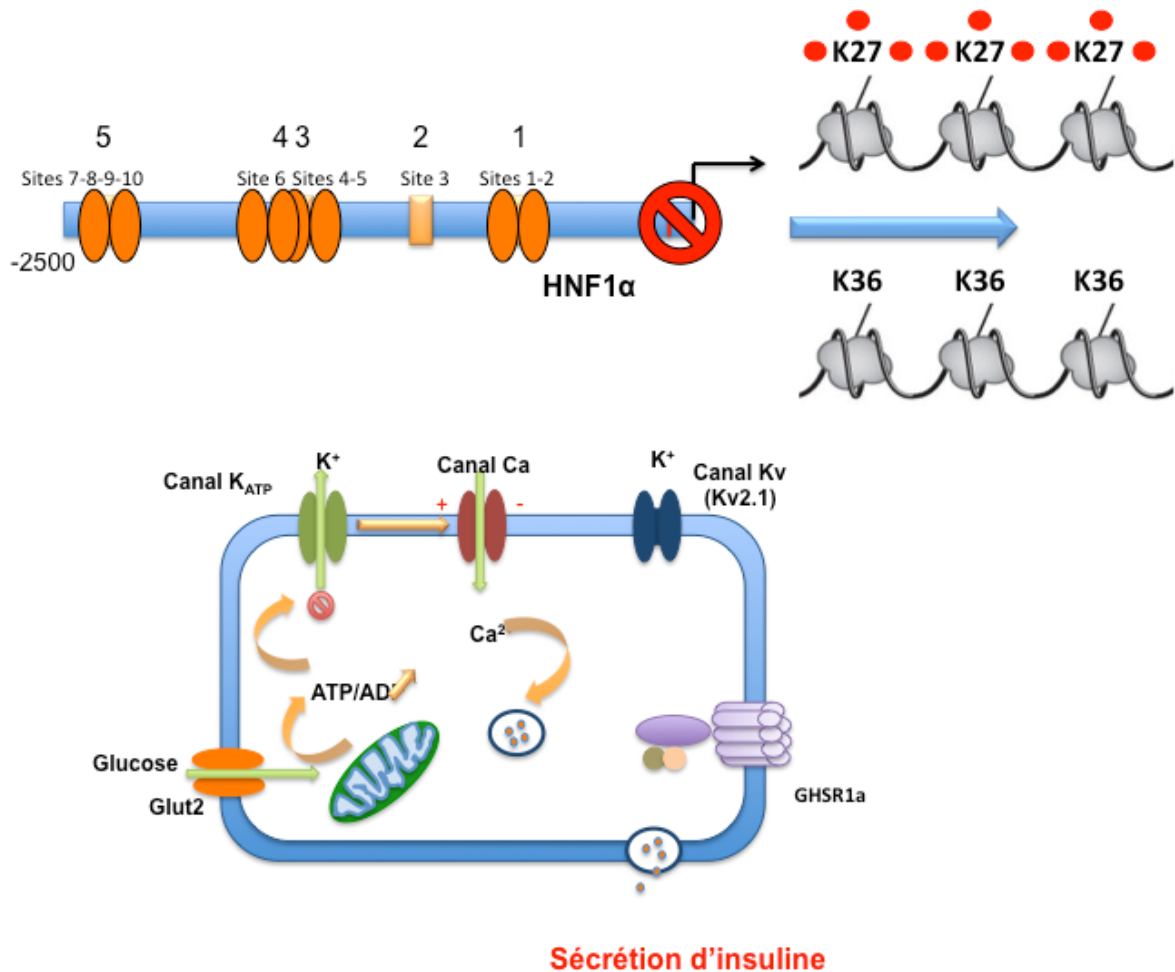


Figure 24 : la présence de Hnf1α permet la régulation de la sécrétion d'insuline par la répression de la transcription du gène ghréline.

En absence de Hnf1α :

L'absence du facteur de transcription est associée à la triméthylation de l'histone H3 sur la lysine en position 36. La chromatine se trouve alors sous une conformation décondensée, la transcription du gène ghréline peut être augmentée, la production de l'hormone peut éventuellement être aussi augmentée. La ghréline se lie à son récepteur Ghsr1a présent à la surface les cellules β pancréatiques. La sécrétion de l'insuline est alors inhibée (Figure 25).

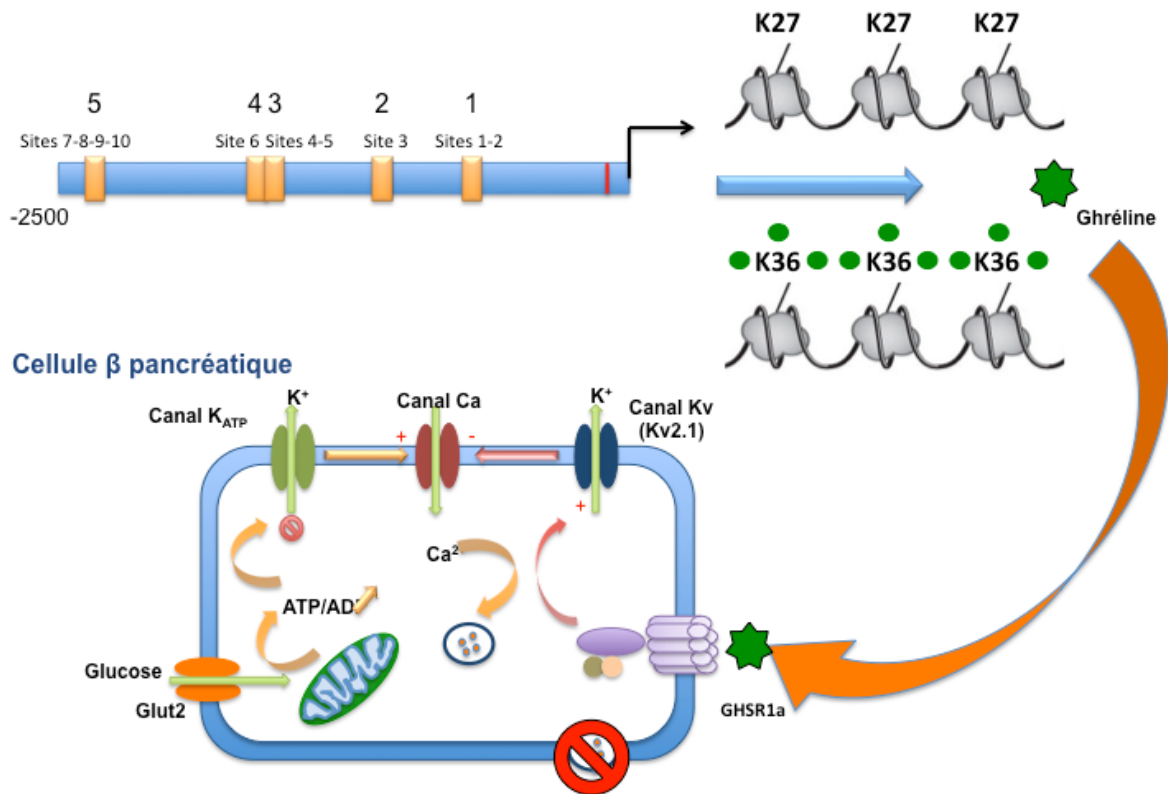


Figure 25 : La perte de Hnf1 α entraîne la dérégulation de la sécrétion d'insuline par l'absence de répression de la transcription du gène ghréline.

En absence de Hnf1 α et traitement à l'antagoniste du récepteur à la ghréline.

Le traitement à l'antagoniste du récepteur à la ghréline GHSR1a bloque la liaison de l'hormone à son récepteur permettant ainsi de restaurer la sécrétion d'insuline chez les animaux Hnf1 α ^{-/-} (Figure 26).

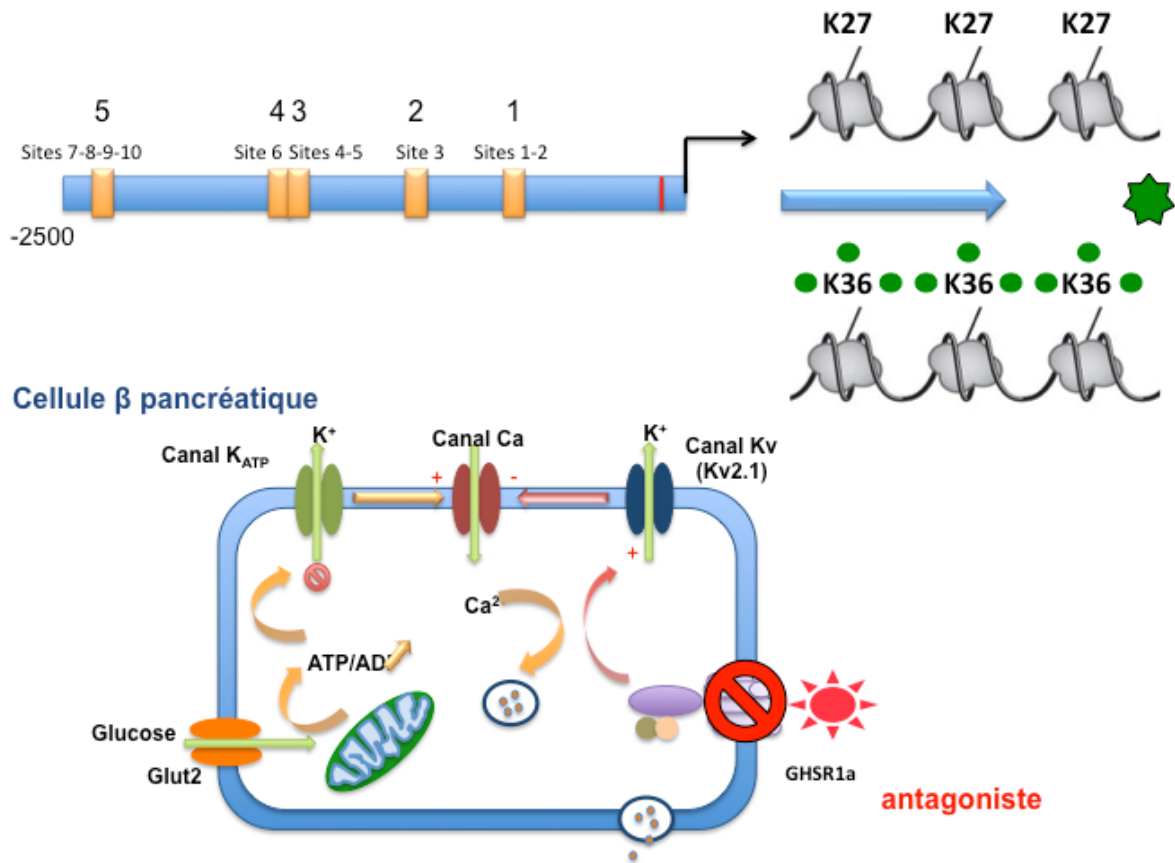


Figure 26 : Le traitement à l'antagoniste du récepteur à la ghréline GHSR1a restaure une sécrétion d'insuline adéquate pour la régulation de l'homéostasie du glucose malgré l'absence du répresseur Hnf1 α .

Ainsi Hnf1 α joue un rôle dans l'homéostasie du glucose en réprimant le gène ghréline. Actuellement, il n'existe pas assez de données chez l'humain pour un consensus sur la physiologie de la ghréline. Il serait donc envisageable d'étudier les variations des niveaux de ghréline totale et active chez les patients atteints de MODY3 et de les comparer à des sujets sains ou diagnostiqués pour d'autres diabètes. Le traitement visant à bloquer la liaison de la ghréline à son récepteur semble une voie thérapeutique prometteuse et envisageable chez l'homme.

Listes des références

Abdul-Ghani MA, Matsuda M, Balas B, DeFronzo RA (2007) Muscle and liver insulin resistance indexes derived from the oral glucose tolerance test. *Diabetes Care* **30**: 89-94

Aguilar AJ, Conde-Sieira M, Lopez-Patino MA, Miguez JM, Soengas JL (2011) In vitro leptin treatment of rainbow trout hypothalamus and hindbrain affects glucosensing and gene expression of neuropeptides involved in food intake regulation. *Peptides* **32**: 232-240

Ahima RS (2006) Ghrelin--a new player in glucose homeostasis? *Cell Metab* **3**: 301-302

Ahlman H, Nilsson (2001) The gut as the largest endocrine organ in the body. *Ann Oncol* **12 Suppl 2**: S63-68

Ahren B, Landin-Olsson M, Jansson PA, Svensson M, Holmes D, Schweizer A (2004) Inhibition of dipeptidyl peptidase-4 reduces glycemia, sustains insulin levels, and reduces glucagon levels in type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* **89**: 2078-2084

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 (2002) Inhibition of dipeptidyl peptidase IV improves metabolic control over a 4-week study period in type 2 diabetes. *Diabetes Care* **25**: 869-875

Aiello L, Guilfoyle R, Huebner K, Weinmann R (1979) Adenovirus 5 DNA sequences present and RNA sequences transcribed in transformed human embryo kidney cells (HEK-Ad-5 or 293). *Virology* **94**: 460-469

Akarte AS, Srinivasan BP, Gandhi S (2012) A novel long acting DPP-IV inhibitor PKF-275-055 stimulates beta-cell proliferation resulting in improved glucose homeostasis in diabetic rats. *Biochem Pharmacol* **83**: 241-252

Albarran-Zeckler RG, Sun Y, Smith RG (2011) Physiological roles revealed by ghrelin and ghrelin receptor deficient mice. *Peptides* **32**: 2229-2235

Anderson JM, Van Itallie CM (2009) Physiology and function of the tight junction. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **1**: a002584

Andralojc KM, Mercalli A, Nowak KW, Albarello L, Calcagno R, Luzi L, Bonifacio E, Doglioni C, Piemonti L (2009) Ghrelin-producing epsilon cells in the developing and adult human pancreas. *Diabetologia* **52**: 486-493

Angeli FS, Shannon RP (2014) Incretin-based therapies: can we achieve glycemic control and cardioprotection? *J Endocrinol* **221**: T17-30

Anini Y, Brubaker PL (2003) Role of leptin in the regulation of glucagon-like peptide-1 secretion. *Diabetes* **52**: 252-259

Arnes L, Hill JT, Gross S, Magnuson MA, Sussel L (2012) Ghrelin expression in the mouse pancreas defines a unique multipotent progenitor population. *PLoS One* **7**: e52026

Asakawa A, Inui A, Kaga T, Katsuura G, Fujimiya M, Fujino MA, Kasuga M (2003) Antagonism of ghrelin receptor reduces food intake and body weight gain in mice. *Gut* **52**: 947-952

Assmann A, Hinault C, Kulkarni RN (2009) Growth factor control of pancreatic islet regeneration and function. *Pediatr Diabetes* **10**: 14-32

Augeri DJ, Robl JA, Betebenner DA, Magnin DR, Khanna A, Robertson JG, Wang A, Simpkins LM, Taunk P, Huang Q, Han SP, Abboa-Offei B, Cap M, Xin L, Tao L, Tozzo E, Welzel GE, Egan DM, Marcinkeviciene J, Chang SY, Biller SA, Kirby MS, Parker RA, Hamann LG (2005) Discovery and preclinical profile of Saxagliptin (BMS-477118): a highly potent, long-acting, orally active dipeptidyl peptidase IV inhibitor for the treatment of type 2 diabetes. *J Med Chem* **48**: 5025-5037

Babon JJ, Nicola NA (2012) The biology and mechanism of action of suppressor of cytokine signaling 3. *Growth Factors* **30**: 207-219

Bach I, Pontoglio M, Yaniv M (1992) Structure of the gene encoding hepatocyte nuclear factor 1 (HNF1). *Nucleic Acids Res* **20**: 4199-4204

Bacha P, Murphy JR, Reichlin S (1983) Organ-specific binding of a thyrotropin-releasing hormone-diphtheria toxin complex after intravenous administration to rats. *Endocrinology* **113**: 1072-1076

Bado A, Levasseur S, Attoub S, Kermorgant S, Laigneau JP, Bortoluzzi MN, Moizo L, Lehy T, Guerre-Millo M, Le Marchand-Brustel Y, Lewin MJ (1998) The stomach is a source of leptin. *Nature* **394**: 790-793

Baggio L, Kieffer TJ, Drucker DJ (2000) Glucagon-like peptide-1, but not glucose-dependent insulinotropic peptide, regulates fasting glycemia and nonenteral glucose clearance in mice. *Endocrinology* **141**: 3703-3709

Baggio LL, Drucker DJ (2007) Biology of incretins: GLP-1 and GIP. *Gastroenterology* **132**: 2131-2157

Balakrishnan A, Stearns AT, Rhoads DB, Ashley SW, Tavakkolizadeh A (2008) Defining the transcriptional regulation of the intestinal sodium-glucose cotransporter using RNA-interference mediated gene silencing. *Surgery* **144**: 168-173

Baldassano S, Bellanca AL, Serio R, Mule F (2012) Food intake in lean and obese mice after peripheral administration of glucagon-like peptide 2. *J Endocrinol* **213**: 277-284

Balkan B, Kwasnik L, Miserendino R, Holst JJ, Li X (1999) Inhibition of dipeptidyl peptidase IV with NVP-DPP728 increases plasma GLP-1 (7-36 amide) concentrations and improves oral glucose tolerance in obese Zucker rats. *Diabetologia* **42**: 1324-1331

Ban N, Yamada Y, Someya Y, Miyawaki K, Ihara Y, Hosokawa M, Toyokuni S, Tsuda K, Seino Y (2002) Hepatocyte nuclear factor-1alpha recruits the transcriptional co-activator p300 on the GLUT2 gene promoter. *Diabetes* **51**: 1409-1418

Banting FG, Best CH, Collip JB, Campbell WR, Fletcher AA (1922) Pancreatic Extracts in the Treatment of Diabetes Mellitus. *Can Med Assoc J* **12**: 141-146

Barker N, van de Wetering M, Clevers H (2008) The intestinal stem cell. *Genes Dev* **22**: 1856-1864

Barnett BP, Hwang Y, Taylor MS, Kirchner H, Pfluger PT, Bernard V, Lin YY, Bowers EM, Mukherjee C, Song WJ, Longo PA, Leahy DJ, Hussain MA, Tschop MH, Boeke JD, Cole PA (2010) Glucose and weight control in mice with a designed ghrelin O-acyltransferase inhibitor. *Science* **330**: 1689-1692

Barnett P (2003) Somatostatin and somatostatin receptor physiology. *Endocrine* **20**: 255-264

Barr VA, Malide D, Zarnowski MJ, Taylor SI, Cushman SW (1997) Insulin stimulates both leptin secretion and production by rat white adipose tissue. *Endocrinology* **138**: 4463-4472

Bartel DP (2009) MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* **136**: 215-233

Baruah MP, Chaudhury T, Sethi BK, Dharmalingam M (2012) Liraglutide in type 2 diabetes mellitus. *J Indian Med Assoc* **110**: 335-338

Baumhueter S, Mendel DB, Conley PB, Kuo CJ, Turk C, Graves MK, Edwards CA, Courtois G, Crabtree GR (1990) HNF-1 shares three sequence motifs with the POU domain proteins and is identical to LF-B1 and APF. *Genes Dev* **4**: 372-379

Bedford MT (2007) Arginine methylation at a glance. *J Cell Sci* **120**: 4243-4246

Bedford MT, Clarke SG (2009) Protein arginine methylation in mammals: who, what, and why. *Mol Cell* **33**: 1-13

Bell GI, Xiang KS, Newman MV, Wu SH, Wright LG, Fajans SS, Spielman RS, Cox NJ (1991) Gene for non-insulin-dependent diabetes mellitus (maturity-onset diabetes of the young subtype) is linked to DNA polymorphism on human chromosome 20q. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**: 1484-1488

Ben-Haroush A, Yogeve Y, Hod M (2004) Epidemiology of gestational diabetes mellitus and its association with Type 2 diabetes. *Diabet Med* **21**: 103-113

Bjerknes M, Cheng H (1981) The stem-cell zone of the small intestinal epithelium. I. Evidence from Paneth cells in the adult mouse. *Am J Anat* **160**: 51-63

Bjerknes M, Cheng H (1999) Clonal analysis of mouse intestinal epithelial progenitors. *Gastroenterology* **116**: 7-14

Bjerknes M, Cheng H (2002) Multipotential stem cells in adult mouse gastric epithelium. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **283**: G767-777

Blumenfeld M, Maury M, Chouard T, Yaniv M, Condamine H (1991) Hepatic nuclear factor 1 (HNF1) shows a wider distribution than products of its known target genes in developing mouse. *Development* **113**: 589-599

Bock KW, Kohle C (2005) UDP-glucuronosyltransferase 1A6: structural, functional, and regulatory aspects. *Methods Enzymol* **400**: 57-75

Bonner-Weir S (2000) Islet growth and development in the adult. *J Mol Endocrinol* **24**: 297-302

Bonner-Weir S (2001) beta-cell turnover: its assessment and implications. *Diabetes* **50 Suppl 1**: S20-24

Bornhorst GM, Paul Singh R (2014) Gastric digestion in vivo and in vitro: how the structural aspects of food influence the digestion process. *Annu Rev Food Sci Technol* **5**: 111-132

Borowiec M, Liew CW, Thompson R, Boonyasrisawat W, Hu J, Mlynarski WM, El Khattabi I, Kim SH, Marselli L, Rich SS, Krolewski AS, Bonner-Weir S, Sharma A, Sale M, Mychaleckyj JC, Kulkarni RN, Doria A (2009) Mutations at the BLK locus linked to maturity onset diabetes of the young and beta-cell dysfunction. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**: 14460-14465

Bosse T, van Wering HM, Gielen M, Dowling LN, Fialkovich JJ, Piaseckyj CM, Gonzalez FJ, Akiyama TE, Montgomery RK, Grand RJ, Krasinski SD (2006) Hepatocyte nuclear factor-1alpha is required for expression but dispensable for histone acetylation of the lactase-phlorizin hydrolase gene in vivo. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **290**: G1016-1024

Boudreau F, Rings EH, van Wering HM, Kim RK, Swain GP, Krasinski SD, Moffett J, Grand RJ, Suh ER, Traber PG (2002) Hepatocyte nuclear factor-1 alpha, GATA-4, and caudal related homeodomain protein Cdx2 interact functionally to modulate intestinal gene transcription. Implication for the developmental regulation of the sucrase-isomaltase gene. *J Biol Chem* **277**: 31909-31917

Boudreau F, Zhu Y, Traber PG (2001) Sucrase-isomaltase gene transcription requires the hepatocyte nuclear factor-1 (HNF-1) regulatory element and is regulated by the ratio of HNF-1 alpha to HNF-1 beta. *J Biol Chem* **276**: 32122-32128

Bouloumie A, Drexler HC, Lafontan M, Busse R (1998) Leptin, the product of Ob gene, promotes angiogenesis. *Circ Res* **83**: 1059-1066

Bouloumie A, Marumo T, Lafontan M, Busse R (1999) Leptin induces oxidative stress in human endothelial cells. *Faseb J* **13**: 1231-1238

Boulton TG, Nye SH, Robbins DJ, Ip NY, Radziejewska E, Morgenbesser SD, DePinho RA, Panayotatos N, Cobb MH, Yancopoulos GD (1991) ERKs: a family of protein-serine/threonine kinases that are activated and tyrosine phosphorylated in response to insulin and NGF. *Cell* **65**: 663-675

Brazeau P, Vale W, Burgus R, Ling N, Butcher M, Rivier J, Guillemin R (1973) Hypothalamic polypeptide that inhibits the secretion of immunoreactive pituitary growth hormone. *Science* **179**: 77-79

Broglio F, Arvat E, Benso A, Gottero C, Muccioli G, Papotti M, van der Lely AJ, Deghenghi R, Ghigo E (2001) Ghrelin, a natural GH secretagogue produced by the stomach, induces hyperglycemia and reduces insulin secretion in humans. *J Clin Endocrinol Metab* **86**: 5083-5086

Broglio F, Koetsveld P, Benso A, Gottero C, Prodam F, Papotti M, Muccioli G, Gauna C, Hofland L, Deghenghi R, Arvat E, Van Der Lely AJ, Ghigo E (2002) Ghrelin secretion is inhibited by either somatostatin or cortistatin in humans. *J Clin Endocrinol Metab* **87**: 4829-4832

Broide E, Bloch O, Ben-Yehudah G, Cantrell D, Shirin H, Rapoport MJ (2013) GLP-1 receptor is expressed in human stomach mucosa: analysis of its cellular association and distribution within gastric glands. *J Histochem Cytochem* **61**: 649-658

Brooks AR, Levy-Wilson B (1992) Hepatocyte nuclear factor 1 and C/EBP are essential for the activity of the human apolipoprotein B gene second-intron enhancer. *Mol Cell Biol* **12**: 1134-1148

Brown H, Sanger F, Kitai R (1955) The structure of pig and sheep insulins. *Biochem J* **60**: 556-565

Brownlee M (2005) The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. *Diabetes* **54**: 1615-1625

Brubaker PL (2010) Minireview: update on incretin biology: focus on glucagon-like peptide-1. *Endocrinology* **151**: 1984-1989

Brubaker PL, Drucker DJ (2004) Minireview: Glucagon-like peptides regulate cell proliferation and apoptosis in the pancreas, gut, and central nervous system. *Endocrinology* **145**: 2653-2659

Bryer-Ash M, Cheung A, Pederson RA (1994) Feedback regulation of glucose-dependent insulinotropic polypeptide (GIP) secretion by insulin in conscious rats. *Regul Pept* **51**: 101-109

Buchanan TA, Xiang AH, Page KA (2012) Gestational diabetes mellitus: risks and management during and after pregnancy. *Nat Rev Endocrinol* **8**: 639-649

Buffa R, Polak JM, Pearse AG, Solcia E, Grimelius L, Capella C (1975) Identification of the intestinal cell storing gastric inhibitory peptide. *Histochemistry* **43**: 249-255

Butler AE, Janson J, Bonner-Weir S, Ritzel R, Rizza RA, Butler PC (2003) Beta-cell deficit and increased beta-cell apoptosis in humans with type 2 diabetes. *Diabetes* **52**: 102-110

Byrne MM, Sturis J, Menzel S, Yamagata K, Fajans SS, Dronsfield MJ, Bain SC, Hattersley AT, Velho G, Froguel P, Bell GI, Polonsky KS (1996) Altered insulin secretory responses to glucose in diabetic and nondiabetic subjects with mutations in the diabetes susceptibility gene MODY3 on chromosome 12. *Diabetes* **45**: 1503-1510

Calanna S, Christensen M, Holst JJ, Laferrere B, Gluud LL, Vilsboll T, Knop FK (2013a) Secretion of glucagon-like peptide-1 in patients with type 2 diabetes mellitus: systematic review and meta-analysis of clinical studies. *Diabetologia* **56**: 965-972

Calanna S, Christensen M, Holst JJ, Laferrere B, Gluud LL, Vilsboll T, Knop FK (2013b) Secretion of glucose-dependent insulinotropic polypeptide in patients with type 2 diabetes: systematic review and meta-analysis of clinical studies. *Diabetes Care* **36**: 3346-3352

Camina JP, Carreira MC, El Messari S, Llorens-Cortes C, Smith RG, Casanueva FF (2004) Desensitization and endocytosis mechanisms of ghrelin-activated growth hormone secretagogue receptor 1a. *Endocrinology* **145**: 930-940

Camina JP, Carreira MC, Micic D, Pombo M, Kelestimur F, Dieguez C, Casanueva FF (2003) Regulation of ghrelin secretion and action. *Endocrine* **22**: 5-12

Cao R, Wang L, Wang H, Xia L, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Jones RS, Zhang Y (2002) Role of histone H3 lysine 27 methylation in Polycomb-group silencing. *Science* **298**: 1039-1043

Carriere V, Lacasa M, Rousset M (2001) Activity of hepatocyte nuclear factor 1alpha and hepatocyte nuclear factor 1beta isoforms is differently affected by the inhibition of protein phosphatases 1/2A. *Biochem J* **354**: 301-308

Casabiell X, Pineiro V, Peino R, Lage M, Camina J, Gallego R, Vallejo LG, Dieguez C, Casanueva FF (1998) Gender differences in both spontaneous and stimulated leptin secretion by human omental adipose tissue in vitro: dexamethasone and estradiol stimulate leptin release in women, but not in men. *J Clin Endocrinol Metab* **83**: 2149-2155

Cassuto H, Olswang Y, Livoff AF, Nechushtan H, Hanson RW, Reshef L (1997) Involvement of HNF-1 in the regulation of phosphoenolpyruvate carboxykinase gene expression in the kidney. *FEBS Lett* **412**: 597-602

Ceddia RB, William WN, Jr., Carpinelli AR, Curi R (1999) Modulation of insulin secretion by leptin. *Gen Pharmacol* **32**: 233-237

Cha B, Jho EH (2012) Protein arginine methyltransferases (PRMTs) as therapeutic targets. *Expert Opin Ther Targets* **16**: 651-664

Charoenthongtrakul S, Giuliana D, Longo KA, Govek EK, Nolan A, Gagne S, Morgan K, Hixon J, Flynn N, Murphy BJ, Hernandez AS, Li J, Tino JA, Gordon DA, DiStefano PS, Geddes BJ (2009) Enhanced gastrointestinal motility with orally active ghrelin receptor agonists. *J Pharmacol Exp Ther* **329**: 1178-1186

Chen L, Magliano DJ, Zimmet PZ (2012) The worldwide epidemiology of type 2 diabetes mellitus--present and future perspectives. *Nat Rev Endocrinol* **8**: 228-236

Cheng H, Leblond CP (1974) Origin, differentiation and renewal of the four main epithelial cell types in the mouse small intestine. V. Unitarian Theory of the origin of the four epithelial cell types. *Am J Anat* **141**: 537-561

Cheng K, Delghingaro-Augusto V, Nolan CJ, Turner N, Hallahan N, Andrikopoulos S, Gunton JE (2012) High passage MIN6 cells have impaired insulin secretion with impaired glucose and lipid oxidation. *PLoS One* **7**: e40868

Cheng LK, O'Grady G, Du P, Egbuji JU, Windsor JA, Pullan AJ (2010) Gastrointestinal system. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med* **2**: 65-79

Chia CW, Carlson OD, Kim W, Shin YK, Charles CP, Kim HS, Melvin DL, Egan JM (2009) Exogenous glucose-dependent insulinotropic polypeptide worsens post prandial hyperglycemia in type 2 diabetes. *Diabetes* **58**: 1342-1349

Chisholm C, Greenberg GR (2002) Somatostatin-28 regulates GLP-1 secretion via somatostatin receptor subtype 5 in rat intestinal cultures. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **283**: E311-317

Chouard T, Blumenfeld M, Bach I, Vandekerckhove J, Cereghini S, Yaniv M (1990) A distal dimerization domain is essential for DNA-binding by the atypical HNF1 homeodomain. *Nucleic Acids Res* **18**: 5853-5863

Chu S, Schubert ML (2012) Gastric secretion. *Curr Opin Gastroenterol* **28**: 587-593

Chu ZL, Carroll C, Alfonso J, Gutierrez V, He H, Lucman A, Pedraza M, Mondala H, Gao H, Bagnol D, Chen R, Jones RM, Behan DP, Leonard J (2008) A role for intestinal endocrine cell-expressed g protein-coupled receptor 119 in glycemic control by enhancing glucagon-like Peptide-1 and glucose-dependent insulinotropic Peptide release. *Endocrinology* **149**: 2038-2047

Clapier CR, Cairns BR (2009) The biology of chromatin remodeling complexes. *Annu Rev Biochem* **78**: 273-304

Cobb MH, Robbins DJ, Boulton TG (1991) ERKs, extracellular signal-regulated MAP-2 kinases. *Curr Opin Cell Biol* **3**: 1025-1032

Coleman-Derr D, Zilberman D (2012) Deposition of histone variant H2A.Z within gene bodies regulates responsive genes. *PLoS Genet* **8**: e1002988

Considine RV, Sinha MK, Heiman ML, Kriauciunas A, Stephens TW, Nyce MR, Ohannesian JP, Marco CC, McKee LJ, Bauer TL, et al. (1996) Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *N Engl J Med* **334**: 292-295

Cote CD, Zadeh-Tahmasebi M, Rasmussen BA, Duca FA, Lam TK (2014) Hormonal signaling in the gut. *J Biol Chem* **289**: 11642-11649

Courtois G, Baumhueter S, Crabtree GR (1988) Purified hepatocyte nuclear factor 1 interacts with a family of hepatocyte-specific promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**: 7937-7941

Courtois G, Morgan JG, Campbell LA, Fourel G, Crabtree GR (1987) Interaction of a liver-specific nuclear factor with the fibrinogen and alpha 1-antitrypsin promoters. *Science* **238**: 688-692

Cowley MA, Smart JL, Rubinstein M, Cerdan MG, Diano S, Horvath TL, Cone RD, Low MJ (2001) Leptin activates anorexigenic POMC neurons through a neural network in the arcuate nucleus. *Nature* **411**: 480-484

Crosnier C, Stamatakis D, Lewis J (2006) Organizing cell renewal in the intestine: stem cells, signals and combinatorial control. *Nat Rev Genet* **7**: 349-359

Csaba Z, Dournaud P (2001) Cellular biology of somatostatin receptors. *Neuropeptides* **35**: 1-23

Csaba Z, Peineau S, Dournaud P (2012) Molecular mechanisms of somatostatin receptor trafficking. *J Mol Endocrinol* **48**: R1-12

Cui H, Cai F, Belsham DD (2005) Anorexigenic hormones leptin, insulin, and alpha-melanocyte-stimulating hormone directly induce neurotensin (NT) gene expression in novel NT-expressing cell models. *J Neurosci* **25**: 9497-9506

Cummings DE, Purnell JQ, Frayo RS, Schmidova K, Wisse BE, Weigle DS (2001) A preprandial rise in plasma ghrelin levels suggests a role in meal initiation in humans. *Diabetes* **50**: 1714-1719

D'Alessandris C, Andreozzi F, Federici M, Cardellini M, Brunetti A, Ranalli M, Del Guerra S, Lauro D, Del Prato S, Marchetti P, Lauro R, Sesti G (2004) Increased O-glycosylation of insulin signaling proteins results in their impaired activation and enhanced susceptibility to apoptosis in pancreatic beta-cells. *Faseb J* **18**: 959-961

D'Angelo A, Bluteau O, Garcia-Gonzalez MA, Gresh L, Doyen A, Garbay S, Robine S, Pontoglio M (2010) Hepatocyte nuclear factor 1alpha and beta control terminal differentiation and cell fate commitment in the gut epithelium. *Development* **137**: 1573-1582

Date Y, Nakazato M, Hashiguchi S, Dezaki K, Mondal MS, Hosoda H, Kojima M, Kangawa K, Arima T, Matsuo H, Yada T, Matsukura S (2002) Ghrelin is present in pancreatic alpha-cells of humans and rats and stimulates insulin secretion. *Diabetes* **51**: 124-129

De Leon DD, Stanley CA (2007) Mechanisms of Disease: advances in diagnosis and treatment of hyperinsulinism in neonates. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* **3**: 57-68

De Mey JR, Freund JN (2013) Understanding epithelial homeostasis in the intestine: An old battlefield of ideas, recent breakthroughs and remaining controversies. *Tissue Barriers* **1**: e24965

de Sousa Abreu R, Penalva LO, Marcotte EM, Vogel C (2009) Global signatures of protein and mRNA expression levels. *Mol Biosyst* **5**: 1512-1526

De Vriese C, Delporte C (2007) Autocrine proliferative effect of ghrelin on leukemic HL-60 and THP-1 cells. *J Endocrinol* **192**: 199-205

De Vriese C, Gregoire F, De Neef P, Robberecht P, Delporte C (2005) Ghrelin is produced by the human erythroleukemic HEL cell line and involved in an autocrine pathway leading to cell proliferation. *Endocrinology* **146**: 1514-1522

Deacon CF, Hughes TE, Holst JJ (1998) Dipeptidyl peptidase IV inhibition potentiates the insulinotropic effect of glucagon-like peptide 1 in the anesthetized pig. *Diabetes* **47**: 764-769

Deacon CF, Nauck MA, Meier J, Hucking K, Holst JJ (2000) Degradation of endogenous and exogenous gastric inhibitory polypeptide in healthy and in type 2 diabetic subjects as revealed using a new assay for the intact peptide. *J Clin Endocrinol Metab* **85**: 3575-3581

Deacon CF, Wamberg S, Bie P, Hughes TE, Holst JJ (2002) Preservation of active incretin hormones by inhibition of dipeptidyl peptidase IV suppresses meal-induced incretin secretion in dogs. *J Endocrinol* **172**: 355-362

Delgado M, Ganea D (2013) Vasoactive intestinal peptide: a neuropeptide with pleiotropic immune functions. *Amino Acids* **45**: 25-39

Deloose E, Janssen P, Depoortere I, Tack J (2012) The migrating motor complex: control mechanisms and its role in health and disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* **9**: 271-285

Delporte C (2013) Structure and physiological actions of ghrelin. *Scientifica (Cairo)* **2013**: 518909

Denroche HC, Quong WL, Bruin JE, Tuduri E, Asadi A, Glavas MM, Fox JK, Kieffer TJ (2013) Leptin administration enhances islet transplant performance in diabetic mice. *Diabetes* **62**: 2738-2746

Denver RJ, Bonett RM, Boorse GC (2011) Evolution of leptin structure and function. *Neuroendocrinology* **94**: 21-38

Dezaki K (2013) Ghrelin function in insulin release and glucose metabolism. *Endocr Dev* **25**: 135-143

Dezaki K, Hosoda H, Kakei M, Hashiguchi S, Watanabe M, Kangawa K, Yada T (2004) Endogenous ghrelin in pancreatic islets restricts insulin release by attenuating Ca²⁺ signaling in beta-cells: implication in the glycemic control in rodents. *Diabetes* **53**: 3142-3151

Dezaki K, Kakei M, Yada T (2007) Ghrelin uses Galphai2 and activates voltage-dependent K⁺ channels to attenuate glucose-induced Ca²⁺ signaling and insulin release in islet beta-cells: novel signal transduction of ghrelin. *Diabetes* **56**: 2319-2327

Dezaki K, Sone H, Yada T (2008) Ghrelin is a physiological regulator of insulin release in pancreatic islets and glucose homeostasis. *Pharmacol Ther* **118**: 239-249

Ding SY, Nkobena A, Kraft CA, Markwardt ML, Rizzo MA (2011) Glucagon-like peptide 1 stimulates post-translational activation of glucokinase in pancreatic beta cells. *J Biol Chem* **286**: 16768-16774

Dittrich HM, Hahn von Dorsche H (1978) [The anatomical and histological investigation of the pancreas in the 19th century and till the discovery of insulin (1921). 2. The pancreas research from the discovery of islets (1869) till the discovery of pancreas-diabetes (1889) (author's transl)]. *Anat Anz* **143**: 231-241

Divine JK, Staloch LJ, Haveri H, Jacobsen CM, Wilson DB, Heikinheimo M, Simon TC (2004) GATA-4, GATA-5, and GATA-6 activate the rat liver fatty acid binding protein gene in concert with HNF-1alpha. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **287**: G1086-1099

Docherty K, Clark AR (1994) Nutrient regulation of insulin gene expression. *Faseb J* **8**: 20-27

Dohda T, Kaneoka H, Inayoshi Y, Kamihira M, Miyake K, Iijima S (2004) Transcriptional coactivators CBP and p300 cooperatively enhance HNF-1alpha-mediated expression of the albumin gene in hepatocytes. *J Biochem* **136**: 313-319

Doyle ME, Egan JM (2007) Mechanisms of action of glucagon-like peptide 1 in the pancreas. *Pharmacol Ther* **113**: 546-593

Dreyer C, Sablin MP, Faivre S, Raymond E (2009) [Topics in mTOR pathway and its inhibitors]. *Bull Cancer* **96**: 87-94

Drucker DJ (2006) The biology of incretin hormones. *Cell Metab* **3**: 153-165

Drucker DJ (2013) Incretin action in the pancreas: potential promise, possible perils, and pathological pitfalls. *Diabetes* **62**: 3316-3323

Duckworth WC, Bennett RG, Hamel FG (1998) Insulin degradation: progress and potential. *Endocr Rev* **19**: 608-624

Dukes ID, Sreenan S, Roe MW, Levisetti M, Zhou YP, Ostrega D, Bell GI, Pontoglio M, Yaniv M, Philipson L, Polonsky KS (1998) Defective pancreatic beta-cell glycolytic signaling in hepatocyte nuclear factor-1alpha-deficient mice. *J Biol Chem* **273**: 24457-24464

Dunmore SJ, Brown JE (2013) The role of adipokines in beta-cell failure of type 2 diabetes. *J Endocrinol* **216**: T37-45

Eckhardt M, Langkopf E, Mark M, Tadayyon M, Thomas L, Nar H, Pfrengle W, Guth B, Lotz R, Sieger P, Fuchs H, Himmelsbach F (2007) 8-(3-(R)-aminopiperidin-1-yl)-7-but-2-ynyl-3-methyl-1-(4-methyl-quinazolin-2-ylmethyl)-3,7-dihydropurine-2,6-dione (BI 1356), a highly potent, selective, long-acting, and orally bioavailable DPP-4 inhibitor for the treatment of type 2 diabetes. *J Med Chem* **50**: 6450-6453

Edfalk S, Steneberg P, Edlund H (2008) Gpr40 is expressed in enteroendocrine cells and mediates free fatty acid stimulation of incretin secretion. *Diabetes* **57**: 2280-2287

Edgerton DS, Cherrington AD (2011) Glucagon as a critical factor in the pathology of diabetes. *Diabetes* **60**: 377-380

Edwards CM, Todd JF, Mahmoudi M, Wang Z, Wang RM, Ghatei MA, Bloom SR (1999) Glucagon-like peptide 1 has a physiological role in the control of postprandial glucose in humans: studies with the antagonist exendin 9-39. *Diabetes* **48**: 86-93

Egan JM, Margolskee RF (2008) Taste cells of the gut and gastrointestinal chemosensation. *Mol Interv* **8**: 78-81

Ehses JA, Lee SS, Pederson RA, McIntosh CH (2001) A new pathway for glucose-dependent insulinotropic polypeptide (GIP) receptor signaling: evidence for the involvement of phospholipase A2 in GIP-stimulated insulin secretion. *J Biol Chem* **276**: 23667-23673

Ehses JA, Pelech SL, Pederson RA, McIntosh CH (2002) Glucose-dependent insulinotropic polypeptide activates the Raf-Mek1/2-ERK1/2 module via a cyclic AMP/cAMP-dependent protein kinase/Rap1-mediated pathway. *J Biol Chem* **277**: 37088-37097

Eissele R, Goke R, Willemer S, Harthus HP, Vermeer H, Arnold R, Goke B (1992) Glucagon-like peptide-1 cells in the gastrointestinal tract and pancreas of rat, pig and man. *Eur J Clin Invest* **22**: 283-291

Elahi D, Raizes GS, Andres R, Hershcopf RJ, Muller DC, Tobin JD, Andersen DK (1982) Interaction of arginine and gastric inhibitory polypeptide on insulin release in man. *Am J Physiol* **242**: E343-351

Elias CF, Purohit D (2013) Leptin signaling and circuits in puberty and fertility. *Cell Mol Life Sci* **70**: 841-862

Ellard S (2000) Hepatocyte nuclear factor 1 alpha (HNF-1 alpha) mutations in maturity-onset diabetes of the young. *Hum Mutat* **16**: 377-385

Emens LA, Landers DW, Moss LG (1992) Hepatocyte nuclear factor 1 alpha is expressed in a hamster insulinoma line and transactivates the rat insulin I gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**: 7300-7304

Erdel F, Krug J, Langst G, Rippe K (2011) Targeting chromatin remodelers: signals and search mechanisms. *Biochim Biophys Acta* **1809**: 497-508

Erickson RH, Lai RS, Kim YS (2000) Role of hepatocyte nuclear factor 1alpha and 1beta in the transcriptional regulation of human dipeptidyl peptidase IV during differentiation of Caco-2 cells. *Biochem Biophys Res Commun* **270**: 235-239

Eriksson PR, Ganguli D, Nagarajavel V, Clark DJ (2012) Regulation of histone gene expression in budding yeast. *Genetics* **191**: 7-20

Ervinna N, Mita T, Yasunari E, Azuma K, Tanaka R, Fujimura S, Sukmawati D, Nomiyama T, Kanazawa A, Kawamori R, Fujitani Y, Watada H (2013) Anagliptin, a DPP-4 inhibitor, suppresses proliferation of vascular smooth muscles and monocyte inflammatory reaction and attenuates atherosclerosis in male apo E-deficient mice. *Endocrinology* **154**: 1260-1270

Euskirchen G, Auerbach RK, Snyder M (2012) SWI/SNF chromatin-remodeling factors: multiscale analyses and diverse functions. *J Biol Chem* **287**: 30897-30905

Evertts AG, Manning AL, Wang X, Dyson NJ, Garcia BA, Collier HA (2013) H4K20 methylation regulates quiescence and chromatin compaction. *Mol Biol Cell* **24**: 3025-3037

Fahrenkrug J (2010) VIP and PACAP. *Results Probl Cell Differ* **50**: 221-234

Falbo KB, Shen X (2012) Function of the INO80 chromatin remodeling complex in DNA replication. *Front Biosci (Landmark Ed)* **17**: 970-975

Fanning AS, Van Itallie CM, Anderson JM (2012) Zonula occludens-1 and -2 regulate apical cell structure and the zonula adherens cytoskeleton in polarized epithelia. *Mol Biol Cell* **23**: 577-590

Farilla L, Bulotta A, Hirshberg B, Li Calzi S, Khoury N, Noushmehr H, Bertolotto C, Di Mario U, Harlan DM, Perfetti R (2003) Glucagon-like peptide 1 inhibits cell apoptosis and improves glucose responsiveness of freshly isolated human islets. *Endocrinology* **144**: 5149-5158

Farre R, Tack J (2013) Food and symptom generation in functional gastrointestinal disorders: physiological aspects. *Am J Gastroenterol* **108**: 698-706

Farris W, Mansourian S, Chang Y, Lindsley L, Eckman EA, Frosch MP, Eckman CB, Tanzi RE, Selkoe DJ, Guenette S (2003) Insulin-degrading enzyme regulates the levels of insulin, amyloid beta-protein, and the beta-amyloid precursor protein intracellular domain in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 4162-4167

Fehmman HC, Goke B (1995) Characterization of GIP(1-30) and GIP(1-42) as stimulators of proinsulin gene transcription. *Peptides* **16**: 1149-1152

Fehmman HC, Peiser C, Bode HP, Stamm M, Staats P, Hedetoft C, Lang RE, Goke B (1997) Leptin: a potent inhibitor of insulin secretion. *Peptides* **18**: 1267-1273

Feng J, Zhang Z, Wallace MB, Stafford JA, Kaldor SW, Kassel DB, Navre M, Shi L, Skene RJ, Asakawa T, Takeuchi K, Xu R, Webb DR, Gwaltney SL, 2nd (2007) Discovery of alogliptin: a potent, selective, bioavailable, and efficacious inhibitor of dipeptidyl peptidase IV. *J Med Chem* **50**: 2297-2300

Fernandez-Gamba A, Leal MC, Morelli L, Castano EM (2009) Insulin-degrading enzyme: structure-function relationship and its possible roles in health and disease. *Curr Pharm Des* **15**: 3644-3655

Ferrer J, Gomis R, Fernandez Alvarez J, Casamitjana R, Vilardell E (1993) Signals derived from glucose metabolism are required for glucose regulation of pancreatic islet GLUT2 mRNA and protein. *Diabetes* **42**: 1273-1280

Flamez D, Van Breusegem A, Scrocchi LA, Quartier E, Pipeleers D, Drucker DJ, Schuit F (1998) Mouse pancreatic beta-cells exhibit preserved glucose competence after disruption of the glucagon-like peptide-1 receptor gene. *Diabetes* **47**: 646-652

Flatt PR, Kwasowski P, Bailey CJ (1989) Stimulation of gastric inhibitory polypeptide release in ob/ob mice by oral administration of sugars and their analogues. *J Nutr* **119**: 1300-1303

Franke TF, Kaplan DR, Cantley LC (1997) PI3K: downstream AKTion blocks apoptosis. *Cell* **88**: 435-437

Freitas HS, Anhe GF, Melo KF, Okamoto MM, Oliveira-Souza M, Bordin S, Machado UF (2008) Na(+)-glucose transporter-2 messenger ribonucleic acid expression in kidney of diabetic rats correlates with glycemic levels: involvement of hepatocyte nuclear factor-1alpha expression and activity. *Endocrinology* **149**: 717-724

Fried SK, Ricci MR, Russell CD, Laferrere B (2000) Regulation of leptin production in humans. *J Nutr* **130**: 3127S-3131S

Froguel P, Vaxillaire M, Sun F, Velho G, Zouali H, Butel MO, Lesage S, Vionnet N, Clement K, Fougousse F, et al. (1992) Close linkage of glucokinase locus on chromosome 7p to early-onset non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Nature* **356**: 162-164

Fu Z, Gilbert ER, Liu D (2013) Regulation of insulin synthesis and secretion and pancreatic Beta-cell dysfunction in diabetes. *Curr Diabetes Rev* **9**: 25-53

Fujimoto K, Sasaki T, Hiki Y, Nemoto M, Utsunomiya Y, Yokoo T, Nakai N, Ohashi T, Hosoya T, Eto Y, Tajima N (2007) In vitro and pathological investigations of MODY5 with the R276X-HNF1beta (TCF2) mutation. *Endocr J* **54**: 757-764

Fujino K, Inui A, Asakawa A, Kihara N, Fujimura M, Fujimiya M (2003) Ghrelin induces fasted motor activity of the gastrointestinal tract in conscious fed rats. *J Physiol* **550**: 227-240

Fujiwara M, Namba N, Miura K, Kitaoka T, Hirai H, Kondou H, Shimotsuji T, Numakura C, Ozono K (2013) Detection and characterization of two novel mutations in the HNF4A gene in maturity-onset diabetes of the young type 1 in two Japanese families. *Horm Res Paediatr* **79**: 220-226

Gahete MD, Rincon-Fernandez D, Villa-Osaba A, Hormaechea-Agulla D, Ibanez-Costa A, Martinez-Fuentes AJ, Gracia-Navarro F, Castano JP, Luque RM (2014) Ghrelin gene products, receptors, and GOAT enzyme: biological and pathophysiological insight. *J Endocrinol* **220**: R1-24

Galan M, Garcia-Herrero CM, Azriel S, Gargallo M, Duran M, Gorgojo JJ, Andia VM, Navas MA (2011) Differential effects of HNF-1alpha mutations associated with familial young-onset diabetes on target gene regulation. *Mol Med* **17**: 256-265

Garcia-Blanco MA, Jamison SF, Sharp PA (1989) Identification and purification of a 62,000-dalton protein that binds specifically to the polypyrimidine tract of introns. *Genes Dev* **3**: 1874-1886

Gardner-Stephen DA, Mackenzie PI (2007) Isolation of the UDP-glucuronosyltransferase 1A3 and 1A4 proximal promoters and characterization of their dependence on the transcription factor hepatocyte nuclear factor 1alpha. *Drug Metab Dispos* **35**: 116-120

Garrison WD, Battle MA, Yang C, Kaestner KH, Sladek FM, Duncan SA (2006) Hepatocyte nuclear factor 4alpha is essential for embryonic development of the mouse colon. *Gastroenterology* **130**: 1207-1220

Garvey WT, Maianu L, Zhu JH, Brechtel-Hook G, Wallace P, Baron AD (1998) Evidence for defects in the trafficking and translocation of GLUT4 glucose transporters in skeletal muscle as a cause of human insulin resistance. *J Clin Invest* **101**: 2377-2386

Gautron L, Elmquist JK (2011) Sixteen years and counting: an update on leptin in energy balance. *J Clin Invest* **121**: 2087-2093

Gehart H, Kumpf S, Ittner A, Ricci R (2010) MAPK signalling in cellular metabolism: stress or wellness? *EMBO Rep* **11**: 834-840

Gerich JE (1993) Control of glycaemia. *Baillieres Clin Endocrinol Metab* **7**: 551-586

Gershon MD (2013) 5-Hydroxytryptamine (serotonin) in the gastrointestinal tract. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* **20**: 14-21

Gomez E, Pritchard C, Herbert TP (2002) cAMP-dependent protein kinase and Ca²⁺ influx through L-type voltage-gated calcium channels mediate Raf-independent activation of extracellular regulated kinase in response to glucagon-like peptide-1 in pancreatic beta-cells. *J Biol Chem* **277**: 48146-48151

Granata R, Ghigo E (2013) Products of the ghrelin gene, the pancreatic beta-cell and the adipocyte. *Endocr Dev* **25**: 144-156

Green J, Naot D, Cooper G (2003) Hepatocyte nuclear factor 1 negatively regulates amylin gene expression. *Biochem Biophys Res Commun* **310**: 464-469

Greenfield JR, Chisholm DJ (2013) How sweet it is: intestinal sweet taste receptors in type 2 diabetes. *Diabetes* **62**: 3336-3337

Gregorieff A, Clevers H (2005) Wnt signaling in the intestinal epithelium: from endoderm to cancer. *Genes Dev* **19**: 877-890

Gregory PA, Gardner-Stephen DA, Rogers A, Michael MZ, Mackenzie PI (2006) The caudal-related homeodomain protein Cdx2 and hepatocyte nuclear factor 1alpha cooperatively regulate the UDP-glucuronosyltransferase 2B7 gene promoter. *Pharmacogenet Genomics* **16**: 527-536

Gregory PA, Lewinsky RH, Gardner-Stephen DA, Mackenzie PI (2004) Coordinate regulation of the human UDP-glucuronosyltransferase 1A8, 1A9, and 1A10 genes by hepatocyte nuclear factor 1alpha and the caudal-related homeodomain protein 2. *Mol Pharmacol* **65**: 953-963

Gromada J, Bokvist K, Ding WG, Barg S, Buschard K, Renstrom E, Rorsman P (1997) Adrenaline stimulates glucagon secretion in pancreatic A-cells by increasing the Ca²⁺ current and the number of granules close to the L-type Ca²⁺ channels. *J Gen Physiol* **110**: 217-228

Gromada J, Franklin I, Wollheim CB (2007) Alpha-cells of the endocrine pancreas: 35 years of research but the enigma remains. *Endocr Rev* **28**: 84-116

Gronberg M, Tsolakis AV, Magnusson L, Janson ET, Saras J (2008) Distribution of obestatin and ghrelin in human tissues: immunoreactive cells in the gastrointestinal tract, pancreas, and mammary glands. *J Histochem Cytochem* **56**: 793-801

Groschwitz KR, Hogan SP (2009) Intestinal barrier function: molecular regulation and disease pathogenesis. *J Allergy Clin Immunol* **124**: 3-20; quiz 21-22

Gu C, Stein GH, Pan N, Goebbels S, Hornberg H, Nave KA, Herrera P, White P, Kaestner KH, Sussel L, Lee JE (2010) Pancreatic beta cells require NeuroD to achieve and maintain functional maturity. *Cell Metab* **11**: 298-310

Gu N, Adachi T, Matsunaga T, Takeda J, Tsujimoto G, Ishihara A, Yasuda K, Tsuda K (2006) Mutant HNF-1alpha and mutant HNF-1beta identified in MODY3 and MODY5 downregulate DPP-IV gene expression in Caco-2 cells. *Biochem Biophys Res Commun* **346**: 1016-1023

Gu N, Tsuda M, Matsunaga T, Adachi T, Yasuda K, Ishihara A, Tsuda K (2008) Glucose regulation of dipeptidyl peptidase IV gene expression is mediated by hepatocyte nuclear factor-1alpha in epithelial intestinal cells. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **35**: 1433-1439

Guo J, Qian L, Li XP, Li XM, Wang GS, Fang X (2013) [Peptidyl arginine deiminase 4 participates in the pathogenesis of rheumatoid arthritis by influencing histone methylation]. *Zhonghua Nei Ke Za Zhi* **52**: 928-931

Guo S (2014) Insulin signaling, resistance, and the metabolic syndrome: insights from mouse models into disease mechanisms. *J Endocrinol* **220**: T1-T23

Gutierrez JA, Solenberg PJ, Perkins DR, Willency JA, Knierman MD, Jin Z, Witcher DR, Luo S, Onyia JE, Hale JE (2008) Ghrelin octanoylation mediated by an orphan lipid transferase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**: 6320-6325

Gutniak M, Orskov C, Holst JJ, Ahren B, Efendic S (1992) Antidiabetogenic effect of glucagon-like peptide-1 (7-36)amide in normal subjects and patients with diabetes mellitus. *N Engl J Med* **326**: 1316-1322

Hale MW, Raison CL, Lowry CA (2013) Integrative physiology of depression and antidepressant drug action: implications for serotonergic mechanisms of action and novel therapeutic strategies for treatment of depression. *Pharmacol Ther* **137**: 108-118

Hallbrink M, Holmqvist T, Olsson M, Ostenson CG, Efendic S, Langel U (2001) Different domains in the third intracellular loop of the GLP-1 receptor are responsible for Galpha(s) and Galpha(i)/Galpha(o) activation. *Biochim Biophys Acta* **1546**: 79-86

Hansen L, Deacon CF, Orskov C, Holst JJ (1999) 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

Hansotia T, Baggio LL, Delmeire D, Hinke SA, Yamada Y, Tsukiyama K, Seino Y, Holst JJ, Schuit F, Drucker DJ (2004) 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

Harvey J, Ashford ML (2003) Leptin in the CNS: much more than a satiety signal. *Neuropharmacology* **44**: 845-854

Hattersley AT (1998) Maturity-onset diabetes of the young: clinical heterogeneity explained by genetic heterogeneity. *Diabet Med* **15**: 15-24

Hattersley AT, Pearson ER (2006) Minireview: pharmacogenetics and beyond: the interaction of therapeutic response, beta-cell physiology, and genetics in diabetes. *Endocrinology* **147**: 2657-2663

Hatziavramidis DT, Karatzas TM, Chrousos GP (2013) Pancreatic islet cell transplantation: an update. *Ann Biomed Eng* **41**: 469-476

Havel PJ, Uriu-Hare JY, Liu T, Stanhope KL, Stern JS, Keen CL, Ahren B (1998) Marked and rapid decreases of circulating leptin in streptozotocin diabetic rats: reversal by insulin. *Am J Physiol* **274**: R1482-1491

Heller RS, Jenny M, Collombat P, Mansouri A, Tomasetto C, Madsen OD, Mellitzer G, Gradwohl G, Serup P (2005) Genetic determinants of pancreatic epsilon-cell development. *Dev Biol* **286**: 217-224

Herrmann C, Goke R, Richter G, Fehmann HC, Arnold R, Goke B (1995) Glucagon-like peptide-1 and glucose-dependent insulin-releasing polypeptide plasma levels in response to nutrients. *Digestion* **56**: 117-126

Hino K, Tsuchiya K, Fukao T, Kiga K, Okamoto R, Kanai T, Watanabe M (2008) Inducible expression of microRNA-194 is regulated by HNF-1alpha during intestinal epithelial cell differentiation. *Rna* **14**: 1433-1442

Hirasawa A, Tsumaya K, Awaji T, Katsuma S, Adachi T, Yamada M, Sugimoto Y, Miyazaki S, Tsujimoto G (2005) Free fatty acids regulate gut incretin glucagon-like peptide-1 secretion through GPR120. *Nat Med* **11**: 90-94

Hochman JA, Sciaky D, Whitaker TL, Hawkins JA, Cohen MB (1997) Hepatocyte nuclear factor-1alpha regulates transcription of the guanylin gene. *Am J Physiol* **273**: G833-841

Hocker M, Wiedenmann B (1998) Molecular mechanisms of enteroendocrine differentiation. *Ann N Y Acad Sci* **859**: 160-174

Holst B, Lang M, Brandt E, Bach A, Howard A, Frimurer TM, Beck-Sickinger A, Schwartz TW (2006) Ghrelin receptor inverse agonists: identification of an active peptide core and its interaction epitopes on the receptor. *Mol Pharmacol* **70**: 936-946

Holst JJ (1997) Enteroglucagon. *Annu Rev Physiol* **59**: 257-271

Holst JJ, Gromada J (2004) Role of incretin hormones in the regulation of insulin secretion in diabetic and nondiabetic humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **287**: E199-206

Holst JJ, Gromada J, Nauck MA (1997) The pathogenesis of NIDDM involves a defective expression of the GIP receptor. *Diabetologia* **40**: 984-986

Holz GG, Chepurny OG, Leech CA (2013) Leptin-stimulated KATP channel trafficking: a new paradigm for beta-cell stimulus-secretion coupling? *Islets* **5**: 229-232

Holzer P, Reichmann F, Farzi A (2012) Neuropeptide Y, peptide YY and pancreatic polypeptide in the gut-brain axis. *Neuropeptides* **46**: 261-274

Horikawa Y, Iwasaki N, Hara M, Furuta H, Hinokio Y, Cockburn BN, Lindner T, Yamagata K, Ogata M, Tomonaga O, Kuroki H, Kasahara T, Iwamoto Y, Bell GI (1997) Mutation in hepatocyte nuclear factor-1 beta gene (TCF2) associated with MODY. *Nat Genet* **17**: 384-385

Howard AD, Feighner SD, Cully DF, Arena JP, Liberators PA, Rosenblum CI, Hamelin M, Hreniuk DL, Palyha OC, Anderson J, Paress PS, Diaz C, Chou M, Liu KK, McKee KK, Pong SS, Chaung LY, Elbrecht A, Dashkevich M, Heavens R, Rigby M, Sirinathsinghji DJ, Dean DC, Melillo DG, Patchett AA, Nargund R, Griffin PR, DeMartino JA, Gupta SK, Schaeffer JM, Smith RG, Van der Ploeg LH (1996) A receptor in pituitary and hypothalamus that functions in growth hormone release. *Science* **273**: 974-977

Hoyer D, Bell GI, Berelowitz M, Epelbaum J, Feniuk W, Humphrey PP, O'Carroll AM, Patel YC, Schonbrunn A, Taylor JE, et al. (1995) Classification and nomenclature of somatostatin receptors. *Trends Pharmacol Sci* **16**: 86-88

Hue L, Taegtmeier H (2009) The Randle cycle revisited: a new head for an old hat. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **297**: E578-591

Irwin N, Green BD, Mooney MH, Greer B, Harriott P, Bailey CJ, Gault VA, O'Harte FP, Flatt PR (2005) A novel, long-acting agonist of glucose-dependent insulinotropic polypeptide suitable for once-daily administration in type 2 diabetes. *J Pharmacol Exp Ther* **314**: 1187-1194

Ishihara H, Asano T, Tsukuda K, Katagiri H, Inukai K, Anai M, Kikuchi M, Yazaki Y, Miyazaki JI, Oka Y (1993) Pancreatic beta cell line MIN6 exhibits characteristics of glucose metabolism and glucose-stimulated insulin secretion similar to those of normal islets. *Diabetologia* **36**: 1139-1145

Ishii H, Sato Y, Takei M, Nishio S, Komatsu M (2011) Glucose-incretin interaction revisited. *Endocr J* **58**: 519-525

Itoh N, Sei T, Nose K, Okamoto H (1978) Glucose stimulation of the proinsulin synthesis in isolated pancreatic islets without increasing amount of proinsulin mRNA. *FEBS Lett* **93**: 343-347

Iwakura H, Ariyasu H, Hosoda H, Yamada G, Hosoda K, Nakao K, Kangawa K, Akamizu T (2011) Oxytocin and dopamine stimulate ghrelin secretion by the ghrelin-producing cell line, MGN3-1 in vitro. *Endocrinology* **152**: 2619-2625

Iwakura H, Li Y, Ariyasu H, Hosoda H, Kanamoto N, Bando M, Yamada G, Hosoda K, Nakao K, Kangawa K, Akamizu T (2010) Establishment of a novel ghrelin-producing cell line. *Endocrinology* **151**: 2940-2945

Janssen P, Rotondo A, Mule F, Tack J (2013) Review article: a comparison of glucagon-like peptides 1 and 2. *Aliment Pharmacol Ther* **37**: 18-36

Jeltsch A, Jurkowska RZ (2014) New concepts in DNA methylation. *Trends Biochem Sci*

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

Jensen J (2004) Gene regulatory factors in pancreatic development. *Dev Dyn* **229**: 176-200

Jespersen MJ, Knop FK, Christensen M (2013) GLP-1 agonists for type 2 diabetes: pharmacokinetic and toxicological considerations. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* **9**: 17-29

Jiang G, Zhang BB (2003) Glucagon and regulation of glucose metabolism. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **284**: E671-678

Jo W, Endo M, Ishizu K, Nakamura A, Tajima T (2011) A novel PAX4 mutation in a Japanese patient with maturity-onset diabetes of the young. *Tohoku J Exp Med* **223**: 113-118

Juillerat-Jeanneret L (2014) Dipeptidyl peptidase IV and its inhibitors: therapeutics for type 2 diabetes and what else? *J Med Chem* **57**: 2197-2212

Kahn SE, Hull RL, Utzschneider KM (2006) Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature* **444**: 840-846

Kanamoto N, Akamizu T, Hosoda H, Hataya Y, Ariyasu H, Takaya K, Hosoda K, Saijo M, Moriyama K, Shimatsu A, Kojima M, Kangawa K, Nakao K (2001) Substantial production of ghrelin by a human medullary thyroid carcinoma cell line. *J Clin Endocrinol Metab* **86**: 4984-4990

Karam SM (1999) Lineage commitment and maturation of epithelial cells in the gut. *Front Biosci* **4**: D286-298

Kekuda R, Saha P, Sundaram U (2008) Role of Sp1 and HNF1 transcription factors in SGLT1 regulation during chronic intestinal inflammation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **294**: G1354-1361

Kellerer M, Koch M, Metzinger E, Mushack J, Capp E, Haring HU (1997) Leptin activates PI-3 kinase in C2C12 myotubes via janus kinase-2 (JAK-2) and insulin receptor substrate-2 (IRS-2) dependent pathways. *Diabetologia* **40**: 1358-1362

Kiefer JC (2003) Molecular mechanisms of early gut organogenesis: a primer on development of the digestive tract. *Dev Dyn* **228**: 287-291

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 (2005) (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

Kim W, Egan JM (2008) The role of incretins in glucose homeostasis and diabetes treatment. *Pharmacol Rev* **60**: 470-512

Kirchner H, Gutierrez JA, Solenberg PJ, Pfluger PT, Czyzyk TA, Willency JA, Schurmann A, Joost HG, Jandacek RJ, Hale JE, Heiman ML, Tschop MH (2009) GOAT links dietary lipids with the endocrine control of energy balance. *Nat Med* **15**: 741-745

Klip A, Sun Y, Chiu TT, Foley KP (2014) Signal transduction meets vesicle traffic: the software and hardware of GLUT4 translocation. *Am J Physiol Cell Physiol* **306**: C879-886

Klose RJ, Zhang Y (2007) Regulation of histone methylation by demethylination and demethylation. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**: 307-318

Klupa T, Skupien J, Malecki MT (2012) Monogenic models: what have the single gene disorders taught us? *Curr Diab Rep* **12**: 659-666

Kmiec Z (2011) Aging and peptide control of food intake. *Curr Protein Pept Sci* **12**: 271-279

Kobayashi H, Kikyo N (2014) Epigenetic regulation of open chromatin in pluripotent stem cells. *Transl Res*

Kojima M, Hosoda H, Date Y, Nakazato M, Matsuo H, Kangawa K (1999) Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature* **402**: 656-660

Kojima M, Kangawa K (2005) Ghrelin: structure and function. *Physiol Rev* **85**: 495-522

Kolligs F, Fehmman HC, Goke R, Goke B (1995) Reduction of the incretin effect in rats by the glucagon-like peptide 1 receptor antagonist exendin (9-39) amide. *Diabetes* **44**: 16-19

Komatsu M, Takei M, Ishii H, Sato Y (2013) Glucose-stimulated insulin secretion: A newer perspective. *J Diabetes Investig* **4**: 511-516

Konturek JW (1994) Cholecystokinin in the control of gastric acid and plasma gastrin and somatostatin secretion in healthy subjects and duodenal ulcer patients before and after eradication of *Helicobacter pylori*. *J Physiol Pharmacol* **45**: 3-66

Korner M, Stockli M, Waser B, Reubi JC (2007) GLP-1 receptor expression in human tumors and human normal tissues: potential for in vivo targeting. *J Nucl Med* **48**: 736-743

Kotronen A, Seppanen-Laakso T, Westerbacka J, Kiviluoto T, Arola J, Ruskeepaa AL, Oresic M, Yki-Jarvinen H (2009) Hepatic stearoyl-CoA desaturase (SCD)-1 activity and diacylglycerol but not ceramide concentrations are increased in the nonalcoholic human fatty liver. *Diabetes* **58**: 203-208

Koyama K, Chen G, Lee Y, Unger RH (1997) Tissue triglycerides, insulin resistance, and insulin production: implications for hyperinsulinemia of obesity. *Am J Physiol* **273**: E708-713

Krishnan S, Trievel RC (2013) Structural and functional analysis of JMJD2D reveals molecular basis for site-specific demethylation among JMJD2 demethylases. *Structure* **21**: 98-108

Krutzfeldt J, Rosch N, Hausser J, Manoharan M, Zavolan M, Stoffel M (2012) MicroRNA-194 is a target of transcription factor 1 (Tcf1, HNF1alpha) in adult liver and controls expression of frizzled-6. *Hepatology* **55**: 98-107

Kulkarni SD, Muralidharan B, Panda AC, Bakthavachalu B, Vindu A, Seshadri V (2011) Glucose-stimulated translation regulation of insulin by the 5' UTR-binding proteins. *J Biol Chem* **286**: 14146-14156

Kumar U, Grant M (2010) Somatostatin and somatostatin receptors. *Results Probl Cell Differ* **50**: 137-184

Lamont BJ, Andrikopoulos S (2014) Hope and fear for new classes of type 2 diabetes drugs: is there preclinical evidence that incretin-based therapies alter pancreatic morphology? *J Endocrinol* **221**: T43-61

Lancha A, Fruhbeck G, Gomez-Ambrosi J (2012) Peripheral signalling involved in energy homeostasis control. *Nutr Res Rev* **25**: 223-248

Larsson LI, St-Onge L, Hougaard DM, Sosa-Pineda B, Gruss P (1998) Pax 4 and 6 regulate gastrointestinal endocrine cell development. *Mech Dev* **79**: 153-159

Laugesen A, Helin K (2014) Chromatin Repressive Complexes in Stem Cells, Development, and Cancer. *Cell Stem Cell* **14**: 735-751

Lee EK, Gorospe M (2010) Minireview: posttranscriptional regulation of the insulin and insulin-like growth factor systems. *Endocrinology* **151**: 1403-1408

Lee GH, Proenca R, Montez JM, Carroll KM, Darvishzadeh JG, Lee JI, Friedman JM (1996) Abnormal splicing of the leptin receptor in diabetic mice. *Nature* **379**: 632-635

Lee YH, Sauer B, Gonzalez FJ (1998) Laron dwarfism and non-insulin-dependent diabetes mellitus in the Hnf-1alpha knockout mouse. *Mol Cell Biol* **18**: 3059-3068

Lerario AM, Brito LP, Mariani BM, Fragoso MC, Machado MA, Teixeira R (2010) A missense TCF1 mutation in a patient with mody-3 and liver adenomatosis. *Clinics (Sao Paulo)* **65**: 1059-1060

Li C, Lu W, Lu C, Xiao W, Shen X, Huang J, Liu G, Tang Y (2012) Identification of diverse dipeptidyl peptidase IV inhibitors via structure-based virtual screening. *J Mol Model* **18**: 4033-4042

Li Y, Ding L, Hassan W, Abdelkader D, Shang J (2013) Adipokines and hepatic insulin resistance. *J Diabetes Res* **2013**: 170532

Licinio J, Negro AB, Mantzoros C, Kaklamani V, Wong ML, Bongiorno PB, Negro PP, Mulla A, Veldhuis JD, Cearnal L, Flier JS, Gold PW (1998) Sex differences in circulating human leptin pulse amplitude: clinical implications. *J Clin Endocrinol Metab* **83**: 4140-4147

Lim GE, Huang GJ, Flora N, LeRoith D, Rhodes CJ, Brubaker PL (2009) Insulin regulates glucagon-like peptide-1 secretion from the enteroendocrine L cell. *Endocrinology* **150**: 580-591

Lin B, Morris DW, Chou JY (1997) The role of HNF1alpha, HNF3gamma, and cyclic AMP in glucose-6-phosphatase gene activation. *Biochemistry* **36**: 14096-14106

Lin WY, Hu YJ, Lee YH (2008) Hepatocyte nuclear factor-1alpha regulates glucocorticoid receptor expression to control postnatal body growth. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **295**: G542-551

Lindstrom P (2007) The physiology of obese-hyperglycemic mice [ob/ob mice]. *ScientificWorldJournal* **7**: 666-685

Liu SY, Gonzalez FJ (1995) Role of the liver-enriched transcription factor HNF-1 alpha in expression of the CYP2E1 gene. *DNA Cell Biol* **14**: 285-293

Liu Y, Liu K, Qin S, Xu C, Min J (2014) Epigenetic targets and drug discovery: Part 1: Histone methylation. *Pharmacol Ther*

Liu Y, Zhong Y, Pei J, Zhu Y, Hu Y, Chi S, Kaye AD (2009) Inhibitory effect of leptin on growth hormone secretion of GH3 cells: involvement of cell proliferation, apoptosis and intracellular free Ca²⁺. *Cytokine* **46**: 245-250

Lomberk G, Grzenda A, Mathison A, Escande C, Zhang JS, Calvo E, Miller LJ, Iovanna J, Chini EN, Fernandez-Zapico ME, Urrutia R (2013) Kruppel-like factor 11 regulates the expression of metabolic genes via an evolutionarily conserved protein interaction domain functionally disrupted in maturity onset diabetes of the young. *J Biol Chem* **288**: 17745-17758

Lonnqvist F, Wennlund A, Arner P (1997) Relationship between circulating leptin and peripheral fat distribution in obese subjects. *Int J Obes Relat Metab Disord* **21**: 255-260

Lorenz M, Evers A, Wagner M (2013) Recent progress and future options in the development of GLP-1 receptor agonists for the treatment of diabetes. *Bioorg Med Chem Lett* **23**: 4011-4018

Lu SC, Xu J, Chinookoswong N, Liu S, Steavenson S, Gegg C, Brankow D, Lindberg R, Veniant M, Gu W (2009) An acyl-ghrelin-specific neutralizing antibody inhibits the acute ghrelin-mediated orexigenic effects in mice. *Mol Pharmacol* **75**: 901-907

Lund A, Knop FK, Vilsboll T (2014) Glucagon-like peptide-1 receptor agonists for the treatment of type 2 diabetes: Differences and similarities. *Eur J Intern Med* **25**: 407-414

Lussier CR, Brial F, Roy SA, Langlois MJ, Verdu EF, Rivard N, Perreault N, Boudreau F (2010) Loss of hepatocyte-nuclear-factor-1alpha impacts on adult mouse intestinal epithelial cell growth and cell lineages differentiation. *PLoS One* **5**: e12378

Lynn FC, Thompson SA, Pospisilik JA, Ehes JA, Hinke SA, Pamir N, McIntosh CH, Pederson RA (2003) A novel pathway for regulation of glucose-dependent insulinotropic polypeptide (GIP) receptor expression in beta cells. *Faseb J* **17**: 91-93

Madsen LW, Knauf JA, Gotfredsen C, Pilling A, Sjogren I, Andersen S, Andersen L, de Boer AS, Manova K, Barlas A, Vundavalli S, Nyborg NC, Knudsen LB, Moelck AM, Fagin JA (2012) GLP-1 receptor agonists and the thyroid: C-cell effects in mice are mediated via the GLP-1 receptor and not associated with RET activation. *Endocrinology* **153**: 1538-1547

Maffei M, Halaas J, Ravussin E, Pratley RE, Lee GH, Zhang Y, Fei H, Kim S, Lallone R, Ranganathan S, et al. (1995) Leptin levels in human and rodent: measurement of plasma leptin and ob RNA in obese and weight-reduced subjects. *Nat Med* **1**: 1155-1161

Malecki MT, Jhala US, Antonellis A, Fields L, Doria A, Orban T, Saad M, Warram JH, Montminy M, Krolewski AS (1999) Mutations in NEUROD1 are associated with the development of type 2 diabetes mellitus. *Nat Genet* **23**: 323-328

Maletti M, Portha B, Carlquist M, Kergoat M, Laburthe M, Marie JC, Rosselin G (1984) Evidence for and characterization of specific high affinity binding sites for the gastric inhibitory polypeptide in pancreatic beta-cells. *Endocrinology* **115**: 1324-1331

Mann S, Beedie C, Balducci S, Zanuso S, Allgrove J, Bertiato F, Jimenez A (2013) Changes in Insulin Sensitivity in Response to Different Modalities of Exercise: a review of the evidence. *Diabetes Metab Res Rev*

Margetic S, Gazzola C, Pegg GG, Hill RA (2002) Leptin: a review of its peripheral actions and interactions. *Int J Obes Relat Metab Disord* **26**: 1407-1433

Marguet D, Baggio L, Kobayashi T, Bernard AM, Pierres M, Nielsen PF, Ribel U, Watanabe T, Drucker DJ, Wagtmann N (2000) Enhanced insulin secretion and improved glucose tolerance in mice lacking CD26. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 6874-6879

Martin C, Zhang Y (2005) The diverse functions of histone lysine methylation. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**: 838-849

Martinez-Rodriguez R, Gil A (2012) Nutrient-mediated modulation of incretin gene expression: a systematic review. *Nutr Hosp* **27**: 46-53

McDonald TJ, Ellard S (2013) Maturity onset diabetes of the young: identification and diagnosis. *Ann Clin Biochem* **50**: 403-415

McIntosh CH, Wheeler MB, Gelling RW, Brown JC, Pederson RA (1996) GIP receptors and signal-transduction mechanisms. *Acta Physiol Scand* **157**: 361-365

Mear Y, Enjalbert A, Thirion S (2013) GHS-R1a constitutive activity and its physiological relevance. *Front Neurosci* **7**: 87

Meier JJ, Nauck MA (2004) GIP as a potential therapeutic agent? *Horm Metab Res* **36**: 859-866

Mellitzer G, Beucher A, Lobstein V, Michel P, Robine S, Kedinger M, Gradwohl G (2010) Loss of enteroendocrine cells in mice alters lipid absorption and glucose homeostasis and impairs postnatal survival. *J Clin Invest* **120**: 1708-1721

Melloul D, Marshak S, Cerasi E (2002) Regulation of insulin gene transcription. *Diabetologia* **45**: 309-326

Mendel DB, Hansen LP, Graves MK, Conley PB, Crabtree GR (1991a) HNF-1 alpha and HNF-1 beta (vHNF-1) share dimerization and homeo domains, but not activation domains, and form heterodimers in vitro. *Genes Dev* **5**: 1042-1056

Mendel DB, Khavari PA, Conley PB, Graves MK, Hansen LP, Admon A, Crabtree GR (1991b) Characterization of a cofactor that regulates dimerization of a mammalian homeodomain protein. *Science* **254**: 1762-1767

Mentlein R, Gallwitz B, Schmidt WE (1993) Dipeptidyl-peptidase IV hydrolyses gastric inhibitory polypeptide, glucagon-like peptide-1(7-36)amide, peptide histidine methionine and is responsible for their degradation in human serum. *Eur J Biochem* **214**: 829-835

Menzel R, Kaisaki PJ, Rjasanowski I, Heinke P, Kerner W, Menzel S (1998) A low renal threshold for glucose in diabetic patients with a mutation in the hepatocyte nuclear factor-1alpha (HNF-1alpha) gene. *Diabet Med* **15**: 816-820

Menzel S, Yamagata K, Trabb JB, Nerup J, Permutt MA, Fajans SS, Menzel R, Iwasaki N, Omori Y, Cox NJ, et al. (1995) Localization of MODY3 to a 5-cM region of human chromosome 12. *Diabetes* **44**: 1408-1413

Merkwitz C, Blaschuk OW, Schulz A, Lochhead P, Meister J, Ehrlich A, Ricken AM (2013) The ductal origin of structural and functional heterogeneity between pancreatic islets. *Prog Histochem Cytochem* **48**: 103-140

Michel MC, Wieland T, Tsujimoto G (2009) How reliable are G-protein-coupled receptor antibodies? *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **379**: 385-388

Mitani H, Takimoto M, Hughes TE, Kimura M (2002) Dipeptidyl peptidase IV inhibition improves impaired glucose tolerance in high-fat diet-fed rats: study using a Fischer 344 rat substrain deficient in its enzyme activity. *Jpn J Pharmacol* **88**: 442-450

Mitchelmore C, Troelsen JT, Spodsberg N, Sjostrom H, Noren O (2000) Interaction between the homeodomain proteins Cdx2 and HNF1alpha mediates expression of the lactase-phlorizin hydrolase gene. *Biochem J* **346 Pt 2**: 529-535

Miyamoto Y, Banno Y, Yamashita T, Fujimoto T, Oi S, Moritoh Y, Asakawa T, Kataoka O, Yashiro H, Takeuchi K, Suzuki N, Ikedo K, Kosaka T, Tsubotani S, Tani A, Sasaki M, Funami M, Amano M, Yamamoto Y, Aertgeerts K, Yano J, Maezaki H (2011) Discovery

of a 3-pyridylacetic acid derivative (TAK-100) as a potent, selective and orally active dipeptidyl peptidase IV (DPP-4) inhibitor. *J Med Chem* **54**: 831-850

Miyawaki K, Yamada Y, Ban N, Ihara Y, Tsukiyama K, Zhou H, Fujimoto S, Oku A, Tsuda K, Toyokuni S, Hiai H, Mizunoya W, Fushiki T, Holst JJ, Makino M, Tashita A, Kobara Y, Tsubamoto Y, Jinnouchi T, Jomori T, Seino Y (2002) Inhibition of gastric inhibitory polypeptide signaling prevents obesity. *Nat Med* **8**: 738-742

Miyawaki K, Yamada Y, Yano H, Niwa H, Ban N, Ihara Y, Kubota A, Fujimoto S, Kajikawa M, Kuroe A, Tsuda K, Hashimoto H, Yamashita T, Jomori T, Tashiro F, Miyazaki J, Seino Y (1999) Glucose intolerance caused by a defect in the entero-insular axis: a study in gastric inhibitory polypeptide receptor knockout mice. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 14843-14847

Miyazaki J, Araki K, Yamato E, Ikegami H, Asano T, Shibasaki Y, Oka Y, Yamamura K (1990) Establishment of a pancreatic beta cell line that retains glucose-inducible insulin secretion: special reference to expression of glucose transporter isoforms. *Endocrinology* **127**: 126-132

Moens K, Heimberg H, Flamez D, Huypens P, Quartier E, Ling Z, Pipeleers D, Gremlich S, Thorens B, Schuit F (1996) Expression and functional activity of glucagon, glucagon-like peptide I, and glucose-dependent insulinotropic peptide receptors in rat pancreatic islet cells. *Diabetes* **45**: 257-261

Moinat M, Deng C, Muzzin P, Assimacopoulos-Jeannet F, Seydoux J, Dulloo AG, Jacobino JP (1995) Modulation of obese gene expression in rat brown and white adipose tissues. *FEBS Lett* **373**: 131-134

Molven A, Ringdal M, Nordbo AM, Raeder H, Stoy J, Lipkind GM, Steiner DF, Philipson LH, Bergmann I, Aarskog D, Undlien DE, Joner G, Sovik O, Bell GI, Njolstad PR (2008) Mutations in the insulin gene can cause MODY and autoantibody-negative type 1 diabetes. *Diabetes* **57**: 1131-1135

Montague CT, Farooqi IS, Whitehead JP, Soos MA, Rau H, Wareham NJ, Sewter CP, Digby JE, Mohammed SN, Hurst JA, Cheetham CH, Earley AR, Barnett AH, Prins JB, O'Rahilly S (1997) Congenital leptin deficiency is associated with severe early-onset obesity in humans. *Nature* **387**: 903-908

Moodie SA, Willumsen BM, Weber MJ, Wolfman A (1993) Complexes of Ras.GTP with Raf-1 and mitogen-activated protein kinase kinase. *Science* **260**: 1658-1661

Muoio DM (2010) Intramuscular triacylglycerol and insulin resistance: guilty as charged or wrongly accused? *Biochim Biophys Acta* **1801**: 281-288

Murray CD, Martin NM, Patterson M, Taylor SA, Ghatei MA, Kamm MA, Johnston C, Bloom SR, Emmanuel AV (2005) Ghrelin enhances gastric emptying in diabetic gastroparesis: a double blind, placebo controlled, crossover study. *Gut* **54**: 1693-1698

Mustain WC, Rychahou PG, Evers BM (2011) The role of neurotensin in physiologic and pathologic processes. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* **18**: 75-82

Muzzin P, Eisensmith RC, Copeland KC, Woo SL (1996) Correction of obesity and diabetes in genetically obese mice by leptin gene therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 14804-14808

Myers RD (1981) Serotonin and thermoregulation: old and new views. *J Physiol (Paris)* **77**: 505-513

Naito M, Fujikura J, Ebihara K, Miyanaga F, Yokoi H, Kusakabe T, Yamamoto Y, Son C, Mukoyama M, Hosoda K, Nakao K (2011) Therapeutic impact of leptin on diabetes, diabetic complications, and longevity in insulin-deficient diabetic mice. *Diabetes* **60**: 2265-2273

Nakashima K, Kanda Y, Hirokawa Y, Kawasaki F, Matsuki M, Kaku K (2009) MIN6 is not a pure beta cell line but a mixed cell line with other pancreatic endocrine hormones. *Endocr J* **56**: 45-53

Nauck MA, El-Ouaghlidi A, Gabrys B, Hucking K, Holst JJ, Deacon CF, Gallwitz B, Schmidt WE, Meier JJ (2004) Secretion of incretin hormones (GIP and GLP-1) and incretin effect after oral glucose in first-degree relatives of patients with type 2 diabetes. *Regul Pept* **122**: 209-217

Nauck MA, Heimesaat MM, Orskov C, Holst JJ, Ebert R, Creutzfeldt W (1993) Preserved incretin activity of glucagon-like peptide 1 [7-36 amide] but not of synthetic human gastric inhibitory polypeptide in patients with type-2 diabetes mellitus. *J Clin Invest* **91**: 301-307

Nekrasova O, Green KJ (2013) Desmosome assembly and dynamics. *Trends Cell Biol*

Neve B, Fernandez-Zapico ME, Ashkenazi-Katalan V, Dina C, Hamid YH, Joly E, Vaillant E, Benmezroua Y, Durand E, Bakaher N, Delannoy V, Vaxillaire M, Cook T, Dalling-Thie GM, Jansen H, Charles MA, Clement K, Galan P, Hercberg S, Helbecque N, Charpentier G, Prentki M, Hansen T, Pedersen O, Urrutia R, Melloul D, Froguel P (2005) Role of transcription factor KLF11 and its diabetes-associated gene variants in pancreatic beta cell function. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 4807-4812

Newsholme P, Haber EP, Hirabara SM, Rebelato EL, Procopio J, Morgan D, Oliveira-Emilio HC, Carpinelli AR, Curi R (2007) Diabetes associated cell stress and dysfunction: role of mitochondrial and non-mitochondrial ROS production and activity. *J Physiol* **583**: 9-24

Nicosia A, Monaci P, Tomei L, De Francesco R, Nuzzo M, Stunnenberg H, Cortese R (1990) A myosin-like dimerization helix and an extra-large homeodomain are essential elements of the tripartite DNA binding structure of LFB1. *Cell* **61**: 1225-1236

Noah TK, Donahue B, Shroyer NF (2011) Intestinal development and differentiation. *Exp Cell Res* **317**: 2702-2710

Nolten LA, Steenbergh PH, Sussenbach JS (1995) Hepatocyte nuclear factor 1 alpha activates promoter 1 of the human insulin-like growth factor I gene via two distinct binding sites. *Mol Endocrinol* **9**: 1488-1499

Olsen J, Laustsen L, Troelsen J (1994) HNF1 alpha activates the aminopeptidase N promoter in intestinal (Caco-2) cells. *FEBS Lett* **342**: 325-328

Ostoft SH, Bagger JI, Hansen T, Pedersen O, Faber J, Holst JJ, Knop FK, Vilsboll T (2014) Glucose-Lowering Effects and Low Risk of Hypoglycemia in Patients With Maturity-Onset Diabetes of the Young When Treated With a GLP-1 Receptor Agonist: A Double-Blind, Randomized, Crossover Trial. *Diabetes Care* **37**: 1797-1805

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

Pamir N, Lynn FC, Buchan AM, Ehses J, Hinke SA, Pospisilik JA, Miyawaki K, Yamada Y, Seino Y, McIntosh CH, Pederson RA (2003) Glucose-dependent insulinotropic polypeptide receptor null mice exhibit compensatory changes in the enteroinsular axis. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **284**: E931-939

Pan FC, Wright C (2011) Pancreas organogenesis: from bud to plexus to gland. *Dev Dyn* **240**: 530-565

Panda AC, Grammatikakis I, Yoon JH, Abdelmohsen K (2013) Posttranscriptional regulation of insulin family ligands and receptors. *Int J Mol Sci* **14**: 19202-19229

Panjwani N, Mulvihill EE, Longuet C, Yusta B, Campbell JE, Brown TJ, Streutker C, Holland D, Cao X, Baggio LL, Drucker DJ (2013) GLP-1 receptor activation indirectly reduces hepatic lipid accumulation but does not attenuate development of atherosclerosis in diabetic male ApoE(-/-) mice. *Endocrinology* **154**: 127-139

Parrizas M, Maestro MA, Boj SF, Paniagua A, Casamitjana R, Gomis R, Rivera F, Ferrer J (2001) Hepatic nuclear factor 1-alpha directs nucleosomal hyperacetylation to its tissue-specific transcriptional targets. *Mol Cell Biol* **21**: 3234-3243

Pazos Y, Alvarez CJ, Camina JP, Casanueva FF (2007) Lysophosphatidic acid inhibits ghrelin secretion in the human gastric adenocarcinoma AGS cell line: role of mitogenic activated protein kinase signaling pathway. *Febs J* **274**: 5714-5726

Pearson ER, Starkey BJ, Powell RJ, Gribble FM, Clark PM, Hattersley AT (2003) Genetic cause of hyperglycaemia and response to treatment in diabetes. *Lancet* **362**: 1275-1281

Pederson RA, Satkunarajah M, McIntosh CH, Scrocchi LA, Flamez D, Schuit F, Drucker DJ, Wheeler MB (1998) Enhanced glucose-dependent insulinotropic polypeptide secretion and insulinotropic action in glucagon-like peptide 1 receptor -/- mice. *Diabetes* **47**: 1046-1052

Pelleymounter MA, Cullen MJ, Baker MB, Hecht R, Winters D, Boone T, Collins F (1995) Effects of the obese gene product on body weight regulation in ob/ob mice. *Science* **269**: 540-543

Perfetti R, Zhou J, Doyle ME, Egan JM (2000) Glucagon-like peptide-1 induces cell proliferation and pancreatic-duodenum homeobox-1 expression and increases endocrine cell mass in the pancreas of old, glucose-intolerant rats. *Endocrinology* **141**: 4600-4605

Petersen KF, Oral EA, Dufour S, Befroy D, Ariyan C, Yu C, Cline GW, DePaoli AM, Taylor SI, Gorden P, Shulman GI (2002) Leptin reverses insulin resistance and hepatic steatosis in patients with severe lipodystrophy. *J Clin Invest* **109**: 1345-1350

Peterson LW, Artis D (2014) Intestinal epithelial cells: regulators of barrier function and immune homeostasis. *Nat Rev Immunol* **14**: 141-153

Petty E, Pillus L (2013) Balancing chromatin remodeling and histone modifications in transcription. *Trends Genet* **29**: 621-629

Piper K, Brickwood S, Turnpenny LW, Cameron IT, Ball SG, Wilson DI, Hanley NA (2004) Beta cell differentiation during early human pancreas development. *J Endocrinol* **181**: 11-23

Plengvidhya N, Kooptiwut S, Songtawee N, Doi A, Furuta H, Nishi M, Nanjo K, Tantibhedhyangkul W, Boonyasrisawat W, Yenchitsomanus PT, Doria A, Banchuin N (2007) PAX4 mutations in Thais with maturity onset diabetes of the young. *J Clin Endocrinol Metab* **92**: 2821-2826

Poitout V (2013) Lipotoxicity impairs incretin signalling. *Diabetologia* **56**: 231-233

Poitout V, Hagman D, Stein R, Artner I, Robertson RP, Harmon JS (2006) Regulation of the insulin gene by glucose and fatty acids. *J Nutr* **136**: 873-876

Poitout V, Robertson RP (2002) Minireview: Secondary beta-cell failure in type 2 diabetes--a convergence of glucotoxicity and lipotoxicity. *Endocrinology* **143**: 339-342

Poitout V, Rouault C, Guerre-Millo M, Briaud I, Reach G (1998) Inhibition of insulin secretion by leptin in normal rodent islets of Langerhans. *Endocrinology* **139**: 822-826

Pontoglio M, Barra J, Hadchouel M, Doyen A, Kress C, Bach JP, Babinet C, Yaniv M (1996) Hepatocyte nuclear factor 1 inactivation results in hepatic dysfunction, phenylketonuria, and renal Fanconi syndrome. *Cell* **84**: 575-585

Pontoglio M, Faust DM, Doyen A, Yaniv M, Weiss MC (1997) Hepatocyte nuclear factor 1alpha gene inactivation impairs chromatin remodeling and demethylation of the phenylalanine hydroxylase gene. *Mol Cell Biol* **17**: 4948-4956

Pontoglio M, Prie D, Cheret C, Doyen A, Leroy C, Froguel P, Velho G, Yaniv M, Friedlander G (2000) HNF1alpha controls renal glucose reabsorption in mouse and man. *EMBO Rep* **1**: 359-365

Pontoglio M, Sreenan S, Roe M, Pugh W, Ostrega D, Doyen A, Pick AJ, Baldwin A, Velho G, Froguel P, Levisetti M, Bonner-Weir S, Bell GI, Yaniv M, Polonsky KS (1998) Defective insulin secretion in hepatocyte nuclear factor 1alpha-deficient mice. *J Clin Invest* **101**: 2215-2222

Potten CS (1977) Extreme sensitivity of some intestinal crypt cells to X and gamma irradiation. *Nature* **269**: 518-521

Pradhan G, Samson SL, Sun Y (2013) Ghrelin: much more than a hunger hormone. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* **16**: 619-624

Preitner F, Ibberson M, Franklin I, Binnert C, Pende M, Gjinovci A, Hansotia T, Drucker DJ, Wollheim C, Burcelin R, Thorens B (2004) Gluco-incretins control insulin secretion at multiple levels as revealed in mice lacking GLP-1 and GIP receptors. *J Clin Invest* **113**: 635-645

Puri P, Baillie RA, Wiest MM, Mirshahi F, Choudhury J, Cheung O, Sargeant C, Contos MJ, Sanyal AJ (2007) A lipidomic analysis of nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* **46**: 1081-1090

Puri S, Hebrok M (2010) Cellular plasticity within the pancreas--lessons learned from development. *Dev Cell* **18**: 342-356

Pyke C, Heller RS, Kirk RK, Orskov C, Reedtz-Runge S, Kaastrup P, Hvelplund A, Bardram L, Calatayud D, Knudsen LB (2014) GLP-1 receptor localization in monkey and human tissue: novel distribution revealed with extensively validated monoclonal antibody. *Endocrinology* **155**: 1280-1290

Pyke C, Knudsen LB (2013) The glucagon-like peptide-1 receptor--or not? *Endocrinology* **154**: 4-8

Quesada I, Tuduri E, Ripoll C, Nadal A (2008) Physiology of the pancreatic alpha-cell and glucagon secretion: role in glucose homeostasis and diabetes. *J Endocrinol* **199**: 5-19

Raeder H, Johansson S, Holm PI, Haldorsen IS, Mas E, Sbarra V, Neramoen I, Eide SA, Grevle L, Bjorkhaug L, Sagen JV, Aksnes L, Sovik O, Lombardo D, Molven A, Njolstad PR (2006) Mutations in the CEL VNTR cause a syndrome of diabetes and pancreatic exocrine dysfunction. *Nat Genet* **38**: 54-62

Raghu K, Gallego R, Scoazec JY, Garcia-Caballero T, Morel G (2013) Different ghrelin localisation in adult human and rat endocrine pancreas. *Cell Tissue Res* **352**: 487-494

Rauci R, Rusolo F, Sharma A, Colonna G, Castello G, Costantini S (2013) Functional and structural features of adipokine family. *Cytokine* **61**: 1-14

Ray LB, Sturgill TW (1987) Rapid stimulation by insulin of a serine/threonine kinase in 3T3-L1 adipocytes that phosphorylates microtubule-associated protein 2 in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**: 1502-1506

Reimer MK, Pacini G, Ahren B (2003) Dose-dependent inhibition by ghrelin of insulin secretion in the mouse. *Endocrinology* **144**: 916-921

Rey-Campos J, Chouard T, Yaniv M, Cereghini S (1991) vHNF1 is a homeoprotein that activates transcription and forms heterodimers with HNF1. *Embo J* **10**: 1445-1457

Rho H, Jones CN, Rose RB (2010) Kinetic stability may determine the interaction dynamics of the bifunctional protein DCoH1, the dimerization cofactor of the transcription factor HNF-1alpha. *Biochemistry* **49**: 10187-10197

Rigato M, Fadini GP (2014) Comparative effectiveness of liraglutide in the treatment of type 2 diabetes. *Diabetes Metab Syndr Obes* **7**: 107-120

Rivera C, Gurard-Levin ZA, Almouzni G, Loyola A (2014) Histone lysine methylation and chromatin replication. *Biochim Biophys Acta*

Roglic G, Unwin N, Bennett PH, Mathers C, Tuomilehto J, Nag S, Connolly V, King H (2005) The burden of mortality attributable to diabetes: realistic estimates for the year 2000. *Diabetes Care* **28**: 2130-2135

Rolin B, Larsen MO, Gotfredsen CF, Deacon CF, Carr RD, Wilken M, Knudsen LB (2002) The long-acting GLP-1 derivative NN2211 ameliorates glycemia and increases beta-cell mass in diabetic mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **283**: E745-752

Rollier A, DiPersio CM, Cereghini S, Stevens K, Tronche F, Zaret K, Weiss MC (1993) Regulation of albumin gene expression in hepatoma cells of fetal phenotype: dominant inhibition of HNF1 function and role of ubiquitous transcription factors. *Mol Biol Cell* **4**: 59-69

Romero A, Kirchner H, Heppner K, Pfluger PT, Tschop MH, Nogueiras R (2010) GOAT: the master switch for the ghrelin system? *Eur J Endocrinol* **163**: 1-8

Roy SA, Langlois MJ, Carrier JC, Boudreau F, Rivard N, Perreault N (2012) Dual regulatory role for phosphatase and tensin homolog in specification of intestinal endocrine cell subtypes. *World J Gastroenterol* **18**: 1579-1589

Rudolph T, Beuch S, Reuter G (2013) Lysine-specific histone demethylase LSD1 and the dynamic control of chromatin. *Biol Chem* **394**: 1019-1028

Russell CD, Petersen RN, Rao SP, Ricci MR, Prasad A, Zhang Y, Brodin RE, Fried SK (1998) Leptin expression in adipose tissue from obese humans: depot-specific regulation by insulin and dexamethasone. *Am J Physiol* **275**: E507-515

Ryffel GU (2001) Mutations in the human genes encoding the transcription factors of the hepatocyte nuclear factor (HNF)1 and HNF4 families: functional and pathological consequences. *J Mol Endocrinol* **27**: 11-29

Saji T, Kikuchi R, Kusuhara H, Kim I, Gonzalez FJ, Sugiyama Y (2008) Transcriptional regulation of human and mouse organic anion transporter 1 by hepatocyte nuclear factor 1 alpha/beta. *J Pharmacol Exp Ther* **324**: 784-790

Saltiel AR, Pessin JE (2002) Insulin signaling pathways in time and space. *Trends Cell Biol* **12**: 65-71

Sangiao-Alvarellos S, Helmling S, Vazquez MJ, Klussmann S, Cordido F (2011) Ghrelin neutralization during fasting-refeeding cycle impairs the recuperation of body weight and alters hepatic energy metabolism. *Mol Cell Endocrinol* **335**: 177-188

Sato T, Nakamura Y, Shiimura Y, Ohgusu H, Kangawa K, Kojima M (2012) Structure, regulation and function of ghrelin. *J Biochem* **151**: 119-128

Sawicka K, Bushell M, Spriggs KA, Willis AE (2008) Polypyrimidine-tract-binding protein: a multifunctional RNA-binding protein. *Biochem Soc Trans* **36**: 641-647

Schirra J, Katschinski M, Weidmann C, Schafer T, Wank U, Arnold R, Goke B (1996) Gastric emptying and release of incretin hormones after glucose ingestion in humans. *J Clin Invest* **97**: 92-103

Schirra J, Nicolaus M, Roggel R, Katschinski M, Storr M, Woerle HJ, Goke B (2006) Endogenous glucagon-like peptide 1 controls endocrine pancreatic secretion and antropyloro-duodenal motility in humans. *Gut* **55**: 243-251

Schonhoff SE, Giel-Moloney M, Leiter AB (2004) Minireview: Development and differentiation of gut endocrine cells. *Endocrinology* **145**: 2639-2644

Schwanhausser B, Busse D, Li N, Dittmar G, Schuchhardt J, Wolf J, Chen W, Selbach M (2011) Global quantification of mammalian gene expression control. *Nature* **473**: 337-342

Scrocchi LA, Brown TJ, MaClusky N, Brubaker PL, Auerbach AB, Joyner AL, Drucker DJ (1996) Glucose intolerance but normal satiety in mice with a null mutation in the glucagon-like peptide 1 receptor gene. *Nat Med* **2**: 1254-1258

Scrocchi LA, Marshall BA, Cook SM, Brubaker PL, Drucker DJ (1998) Identification of glucagon-like peptide 1 (GLP-1) actions essential for glucose homeostasis in mice with disruption of GLP-1 receptor signaling. *Diabetes* **47**: 632-639

Segal KR, Landt M, Klein S (1996) Relationship between insulin sensitivity and plasma leptin concentration in lean and obese men. *Diabetes* **45**: 988-991

Seino Y, Yabe D (2013) Glucose-dependent insulinotropic polypeptide and glucagon-like peptide-1: Incretin actions beyond the pancreas. *J Diabetes Investig* **4**: 108-130

Sekar R, Chow BK (2013) Metabolic effects of secretin. *Gen Comp Endocrinol* **181**: 18-24

Sengoku T, Yokoyama S (2011) Structural basis for histone H3 Lys 27 demethylation by UTX/KDM6A. *Genes Dev* **25**: 2266-2277

Senkel S, Lucas B, Klein-Hitpass L, Ryffel GU (2005) Identification of target genes of the transcription factor HNF1beta and HNF1alpha in a human embryonic kidney cell line. *Biochim Biophys Acta* **1731**: 179-190

Seufert J (2004) Leptin effects on pancreatic beta-cell gene expression and function. *Diabetes* **53 Suppl 1**: S152-158

Seufert J, Kieffer TJ, Habener JF (1999a) Leptin inhibits insulin gene transcription and reverses hyperinsulinemia in leptin-deficient ob/ob mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 674-679

Seufert J, Kieffer TJ, Leech CA, Holz GG, Moritz W, Ricordi C, Habener JF (1999b) Leptin suppression of insulin secretion and gene expression in human pancreatic islets: implications for the development of adipogenic diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* **84**: 670-676

Shah M, Vella A (2014) Effects of GLP-1 on appetite and weight. *Rev Endocr Metab Disord*

Shammas C, Neocleous V, Phelan MM, Lian LY, Skordis N, Phylactou LA (2013) A report of 2 new cases of MODY2 and review of the literature: implications in the search for type 2 diabetes drugs. *Metabolism* **62**: 1535-1542

Shi YG, Tsukada Y (2013) The discovery of histone demethylases. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **5**

Shih DQ, Screenan S, Munoz KN, Philipson L, Pontoglio M, Yaniv M, Polonsky KS, Stoffel M (2001) Loss of HNF-1alpha function in mice leads to abnormal expression of genes involved in pancreatic islet development and metabolism. *Diabetes* **50**: 2472-2480

Shih HP, Wang A, Sander M (2013) Pancreas organogenesis: from lineage determination to morphogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol* **29**: 81-105

Simon JA, Kingston RE (2009) Mechanisms of polycomb gene silencing: knowns and unknowns. *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**: 697-708

Simpson K, Parker J, Plumer J, Bloom S (2012) CCK, PYY and PP: the control of energy balance. *Handb Exp Pharmacol*: 209-230

Sims RJ, 3rd, Reinberg D (2009) Processing the H3K36me3 signature. *Nat Genet* **41**: 270-271

Sivertsen B, Holliday N, Madsen AN, Holst B (2013) Functionally biased signalling properties of 7TM receptors - opportunities for drug development for the ghrelin receptor. *Br J Pharmacol* **170**: 1349-1362

Slack JM (1995) Developmental biology of the pancreas. *Development* **121**: 1569-1580

Smith SB, Gasa R, Watada H, Wang J, Griffen SC, German MS (2003) Neurogenin3 and hepatic nuclear factor 1 cooperate in activating pancreatic expression of Pax4. *J Biol Chem* **278**: 38254-38259

Smith SB, Watada H, Scheel DW, Mrejen C, German MS (2000) Autoregulation and maturity onset diabetes of the young transcription factors control the human PAX4 promoter. *J Biol Chem* **275**: 36910-36919

Smolle M, Venkatesh S, Gogol MM, Li H, Zhang Y, Florens L, Washburn MP, Workman JL (2012) Chromatin remodelers Isw1 and Chd1 maintain chromatin structure during transcription by preventing histone exchange. *Nat Struct Mol Biol* **19**: 884-892

Sobhani I, Bado A, Vissuzaine C, Buyse M, Kermorgant S, Laigneau JP, Attoub S, Lehy T, Henin D, Mignon M, Lewin MJ (2000) Leptin secretion and leptin receptor in the human stomach. *Gut* **47**: 178-183

Sobrino Crespo C, Perianes Cachero A, Puebla Jimenez L, Barrios V, Arilla Ferreiro E (2014) Peptides and food intake. *Front Endocrinol (Lausanne)* **5**: 58

Sosa-Pineda B, Chowdhury K, Torres M, Oliver G, Gruss P (1997) The Pax4 gene is essential for differentiation of insulin-producing beta cells in the mammalian pancreas. *Nature* **386**: 399-402

Staloch LJ, Divine JK, Witten JT, Simon TC (2005) C/EBP and Cdx family factors regulate liver fatty acid binding protein transgene expression in the small intestinal epithelium. *Biochim Biophys Acta* **1731**: 168-178

Stange EF, Schneider A, Schusdziarra V, Ditschuneit H (1984) Inhibitory effects of somatostatin on growth and differentiation in cultured intestinal mucosa. *Horm Metab Res* **16**: 74-78

Stanley FK, Moore S, Goodarzi AA (2013) CHD chromatin remodelling enzymes and the DNA damage response. *Mutat Res* **750**: 31-44

Stark R, Ashley SE, Andrews ZB (2013) AMPK and the neuroendocrine regulation of appetite and energy expenditure. *Mol Cell Endocrinol* **366**: 215-223

Steppan CM, Bailey ST, Bhat S, Brown EJ, Banerjee RR, Wright CM, Patel HR, Ahima RS, Lazar MA (2001) The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature* **409**: 307-312

Stoffel M, Patel P, Lo YM, Hattersley AT, Lucassen AM, Page R, Bell JI, Bell GI, Turner RC, Wainscoat JS (1992) Missense glucokinase mutation in maturity-onset diabetes of the young and mutation screening in late-onset diabetes. *Nat Genet* **2**: 153-156

Stoffers DA, Ferrer J, Clarke WL, Habener JF (1997) Early-onset type-II diabetes mellitus (MODY4) linked to IPF1. *Nat Genet* **17**: 138-139

Stoffers DA, Kieffer TJ, Hussain MA, Drucker DJ, Bonner-Weir S, Habener JF, Egan JM (2000) Insulinotropic glucagon-like peptide 1 agonists stimulate expression of homeodomain protein IDX-1 and increase islet size in mouse pancreas. *Diabetes* **49**: 741-748

Sun Y, Ahmed S, Smith RG (2003) Deletion of ghrelin impairs neither growth nor appetite. *Mol Cell Biol* **23**: 7973-7981

Sun Y, Asnicar M, Saha PK, Chan L, Smith RG (2006) Ablation of ghrelin improves the diabetic but not obese phenotype of ob/ob mice. *Cell Metab* **3**: 379-386

Sun Y, Butte NF, Garcia JM, Smith RG (2008) Characterization of adult ghrelin and ghrelin receptor knockout mice under positive and negative energy balance. *Endocrinology* **149**: 843-850

Sun Y, Wang P, Zheng H, Smith RG (2004) Ghrelin stimulation of growth hormone release and appetite is mediated through the growth hormone secretagogue receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 4679-4684

Swygert SG, Peterson CL (2014a) Chromatin dynamics: interplay between remodeling enzymes and histone modifications. *Biochim Biophys Acta* **1839**: 728-736

Swygert SG, Peterson CL (2014b) Chromatin dynamics: Interplay between remodeling enzymes and histone modifications. *Biochim Biophys Acta*

Szendroedi J, Roden M (2009) Ectopic lipids and organ function. *Curr Opin Lipidol* **20**: 50-56

Tack J, Depoortere I, Bisschops R, Delpoort C, Coulie B, Meulemans A, Janssens J, Peeters T (2006) Influence of ghrelin on interdigestive gastrointestinal motility in humans. *Gut* **55**: 327-333

Taghavi P, van Lohuizen M (2006) Developmental biology: two paths to silence merge. *Nature* **439**: 794-795

Taing MW, Rose FJ, Whitehead JP (2014) GLP-1(28-36)amide, the Glucagon-like peptide-1 metabolite: friend, foe, or pharmacological folly? *Drug Des Devel Ther* **8**: 677-688

Tam PP, Loebel DA (2007) Gene function in mouse embryogenesis: get set for gastrulation. *Nat Rev Genet* **8**: 368-381

Tan T, Bloom S (2013) Gut hormones as therapeutic agents in treatment of diabetes and obesity. *Curr Opin Pharmacol* **13**: 996-1001

Tanaka K, Terryn S, Geffers L, Garbay S, Pontoglio M, Devuyst O (2010) The transcription factor HNF1alpha regulates expression of chloride-proton exchanger CIC-5 in the renal proximal tubule. *Am J Physiol Renal Physiol* **299**: F1339-1347

Tanaka S, Kobayashi T, Tomura H, Okubo M, Nakanishi K, Takeda J, Murase T (2000) A novel dominant-negative mutation of the hepatocyte nuclear factor-1alpha gene in Japanese early-onset type 2 diabetes. *Horm Metab Res* **32**: 373-377

Tartaglia LA, Dembski M, Weng X, Deng N, Culpepper J, Devos R, Richards GJ, Campfield LA, Clark FT, Deeds J, Muir C, Sanker S, Moriarty A, Moore KJ, Smutko JS, Mays GG, Wool EA, Monroe CA, Tepper RI (1995) Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. *Cell* **83**: 1263-1271

Taylor MS, Hwang Y, Hsiao PY, Boeke JD, Cole PA (2012) Ghrelin O-acyltransferase assays and inhibition. *Methods Enzymol* **514**: 205-228

Thanabalasingham G, Owen KR (2011) Diagnosis and management of maturity onset diabetes of the young (MODY). *Bmj* **343**: d6044

Theodorakis MJ, Carlson O, Muller DC, Egan JM (2004) Elevated plasma glucose-dependent insulinotropic polypeptide associates with hyperinsulinemia in impaired glucose tolerance. *Diabetes Care* **27**: 1692-1698

Thomas EL, Fitzpatrick JA, Malik SJ, Taylor-Robinson SD, Bell JD (2013) Whole body fat: content and distribution. *Prog Nucl Magn Reson Spectrosc* **73**: 56-80

Thorens B, Gerard N, Deriaz N (1993) GLUT2 surface expression and intracellular transport via the constitutive pathway in pancreatic beta cells and insulinoma: evidence for a block in trans-Golgi network exit by brefeldin A. *J Cell Biol* **123**: 1687-1694

Tornehave D, Kristensen P, Romer J, Knudsen LB, Heller RS (2008) Expression of the GLP-1 receptor in mouse, rat, and human pancreas. *J Histochem Cytochem* **56**: 841-851

Torsvik J, Johansson BB, Dalva M, Marie M, Fjeld K, Johansson S, Bjorkoy G, Saraste J, Njolstad PR, Molven A (2014) Endocytosis of Secreted Carboxyl-ester Lipase in a Syndrome of Diabetes and Pancreatic Exocrine Dysfunction. *J Biol Chem*

Trauner M, Arrese M, Wagner M (2010) Fatty liver and lipotoxicity. *Biochim Biophys Acta* **1801**: 299-310

Tronche F, Yaniv M (1992) HNF1, a homeoprotein member of the hepatic transcription regulatory network. *Bioessays* **14**: 579-587

Trumper A, Trumper K, Horsch D (2002) Mechanisms of mitogenic and anti-apoptotic signaling by glucose-dependent insulinotropic polypeptide in beta(INS-1)-cells. *J Endocrinol* **174**: 233-246

Trumper A, Trumper K, Trusheim H, Arnold R, Goke B, Horsch D (2001) Glucose-dependent insulinotropic polypeptide is a growth factor for beta (INS-1) cells by pleiotropic signaling. *Mol Endocrinol* **15**: 1559-1570

Tsai M, Asakawa A, Amitani H, Inui A (2012) Stimulation of leptin secretion by insulin. *Indian J Endocrinol Metab* **16**: S543-548

Tseng CC, Boylan MO, Jarboe LA, Usdin TB, Wolfe MM (1996) Chronic desensitization of the glucose-dependent insulinotropic polypeptide receptor in diabetic rats. *Am J Physiol* **270**: E661-666

Tucholski K, Otto-Buczowska E (2011) The role of leptin in the regulation of carbohydrate metabolism. *Endokrynol Pol* **62**: 258-262

Tuduri E, Bruin JE, Denroche HC, Fox JK, Johnson JD, Kieffer TJ (2013) Impaired Ca²⁺ signaling in beta-cells lacking leptin receptors by Cre-loxP recombination. *PLoS One* **8**: e71075

Utriainen T, Malmstrom R, Makimattila S, Yki-Jarvinen H (1996) Supraphysiological hyperinsulinemia increases plasma leptin concentrations after 4 h in normal subjects. *Diabetes* **45**: 1364-1366

van Bloemendaal L, Ten Kulve JS, la Fleur SE, Ijzerman RG, Diamant M (2014) Effects of glucagon-like peptide 1 on appetite and body weight: focus on the CNS. *J Endocrinol* **221**: T1-16

van der Flier LG, Clevers H (2009) Stem cells, self-renewal, and differentiation in the intestinal epithelium. *Annu Rev Physiol* **71**: 241-260

van Ooij C, Snyder RC, Paeper BW, Duyster G (1992) Temporal expression of the human alcohol dehydrogenase gene family during liver development correlates with differential promoter activation by hepatocyte nuclear factor 1, CCAAT/enhancer-binding protein alpha, liver activator protein, and D-element-binding protein. *Mol Cell Biol* **12**: 3023-3031

van Wering HM, Huibregtse IL, van der Zwan SM, de Bie MS, Dowling LN, Boudreau F, Rings EH, Grand RJ, Krasinski SD (2002) Physical interaction between GATA-5 and hepatocyte nuclear factor-1alpha results in synergistic activation of the human lactase-phlorizin hydrolase promoter. *J Biol Chem* **277**: 27659-27667

Vayro S, Wood IS, Dyer J, Shirazi-Beechey SP (2001) Transcriptional regulation of the ovine intestinal Na⁺/glucose cotransporter SGLT1 gene. Role of HNF-1 in glucose activation of promoter function. *Eur J Biochem* **268**: 5460-5470

Vella A, Rizza RA (2004) Extrapancreatic effects of GIP and GLP-1. *Horm Metab Res* **36**: 830-836

Venkova K, Fraser G, Hoveyda HR, Greenwood-Van Meerveld B (2007) Prokinetic effects of a new ghrelin receptor agonist TZP-101 in a rat model of postoperative ileus. *Dig Dis Sci* **52**: 2241-2248

Verdich C, Flint A, Gutzwiller JP, Naslund E, Beglinger C, Hellstrom PM, Long SJ, Morgan LM, Holst JJ, Astrup A (2001) A meta-analysis of the effect of glucagon-like peptide-1 (7-36) amide on ad libitum energy intake in humans. *J Clin Endocrinol Metab* **86**: 4382-4389

Verspohl EJ (2012) Novel pharmacological approaches to the treatment of type 2 diabetes. *Pharmacol Rev* **64**: 188-237

Villhauer EB, Brinkman JA, Naderi GB, Burkey BF, Dunning BE, Prasad K, Mangold BL, Russell ME, Hughes TE (2003) 1-[[[3-hydroxy-1-adamantyl]amino]acetyl]-2-cyano-(S)-pyrrolidine: a potent, selective, and orally bioavailable dipeptidyl peptidase IV inhibitor with antihyperglycemic properties. *J Med Chem* **46**: 2774-2789

Vilsboll T, Krarup T, Deacon CF, Madsbad S, Holst JJ (2001) Reduced postprandial concentrations of intact biologically active glucagon-like peptide 1 in type 2 diabetic patients. *Diabetes* **50**: 609-613

Vire E, Brenner C, Deplus R, Blanchon L, Fraga M, Didelot C, Morey L, Van Eynde A, Bernard D, Vanderwinden JM, Bollen M, Esteller M, Di Croce L, de Launoit Y, Fuks F (2006) The Polycomb group protein EZH2 directly controls DNA methylation. *Nature* **439**: 871-874

Vogel C, Marcotte EM (2012) Insights into the regulation of protein abundance from proteomic and transcriptomic analyses. *Nat Rev Genet* **13**: 227-232

Vojtek AB, Hollenberg SM, Cooper JA (1993) Mammalian Ras interacts directly with the serine/threonine kinase Raf. *Cell* **74**: 205-214

Vollmer K, Holst JJ, Baller B, Ellrichmann M, Nauck MA, Schmidt WE, Meier JJ (2008) Predictors of incretin concentrations in subjects with normal, impaired, and diabetic glucose tolerance. *Diabetes* **57**: 678-687

Waldron-Lynch F, Herold KC (2011) Immunomodulatory therapy to preserve pancreatic beta-cell function in type 1 diabetes. *Nat Rev Drug Discov* **10**: 439-452

Wang H, Maechler P, Hagenfeldt KA, Wollheim CB (1998) Dominant-negative suppression of HNF-1alpha function results in defective insulin gene transcription and impaired metabolism-secretion coupling in a pancreatic beta-cell line. *Embo J* **17**: 6701-6713

Wang Y, Dong L, Cheng Y, Zhao P (2007) Effects of ghrelin on feeding regulation and interdigestive migrating complex in rats. *Scand J Gastroenterol* **42**: 447-453

Wang Y, Kole HK, Montrose-Rafizadeh C, Perfetti R, Bernier M, Egan JM (1997) Regulation of glucose transporters and hexose uptake in 3T3-L1 adipocytes: glucagon-like peptide-1 and insulin interactions. *J Mol Endocrinol* **19**: 241-248

Ward CW, Lawrence MC (2009) Ligand-induced activation of the insulin receptor: a multi-step process involving structural changes in both the ligand and the receptor. *Bioessays* **31**: 422-434

Warne PH, Viciano PR, Downward J (1993) Direct interaction of Ras and the amino-terminal region of Raf-1 in vitro. *Nature* **364**: 352-355

Wasan HS, Park HS, Liu KC, Mandir NK, Winnett A, Sasieni P, Bodmer WF, Goodlad RA, Wright NA (1998) APC in the regulation of intestinal crypt fission. *J Pathol* **185**: 246-255

Watson RT, Pessin JE (2001) Intracellular organization of insulin signaling and GLUT4 translocation. *Recent Prog Horm Res* **56**: 175-193

Wauman J, Tavernier J (2011) Leptin receptor signaling: pathways to leptin resistance. *Front Biosci (Landmark Ed)* **16**: 2771-2793

Wells JM, Melton DA (1999) Vertebrate endoderm development. *Annu Rev Cell Dev Biol* **15**: 393-410

Wheeler MB, Gelling RW, Hinke SA, Tu B, Pederson RA, Lynn F, Ehses J, McIntosh CH (1999) Characterization of the carboxyl-terminal domain of the rat glucose-dependent insulinotropic polypeptide (GIP) receptor. A role for serines 426 and 427 in regulating the rate of internalization. *J Biol Chem* **274**: 24593-24601

Wheeler MB, Gelling RW, McIntosh CH, Georgiou J, Brown JC, Pederson RA (1995) Functional expression of the rat pancreatic islet glucose-dependent insulinotropic polypeptide receptor: ligand binding and intracellular signaling properties. *Endocrinology* **136**: 4629-4639

Whetstine JR, Nottke A, Lan F, Huarte M, Smolikov S, Chen Z, Spooner E, Li E, Zhang G, Colaiacovo M, Shi Y (2006) Reversal of histone lysine trimethylation by the JMJD2 family of histone demethylases. *Cell* **125**: 467-481

Wierup N, Sundler F, Heller RS (2014) The islet ghrelin cell. *J Mol Endocrinol* **52**: R35-49

Wierup N, Svensson H, Mulder H, Sundler F (2002) The ghrelin cell: a novel developmentally regulated islet cell in the human pancreas. *Regul Pept* **107**: 63-69

Wierup N, Yang S, McEvelly RJ, Mulder H, Sundler F (2004) Ghrelin is expressed in a novel endocrine cell type in developing rat islets and inhibits insulin secretion from INS-1 (832/13) cells. *J Histochem Cytochem* **52**: 301-310

Williams DL, Cummings DE, Grill HJ, Kaplan JM (2003) Meal-related ghrelin suppression requires postgastric feedback. *Endocrinology* **144**: 2765-2767

Woodward HN, Anderson SL (2014) Once-weekly albiglutide in the management of type 2 diabetes: patient considerations. *Patient Prefer Adherence* **8**: 789-803

Wortley KE, Anderson KD, Garcia K, Murray JD, Malinova L, Liu R, Moncrieffe M, Thabet K, Cox HJ, Yancopoulos GD, Wiegand SJ, Sleeman MW (2004) Genetic deletion of ghrelin does not decrease food intake but influences metabolic fuel preference. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 8227-8232

Wren AM, Seal LJ, Cohen MA, Brynes AE, Frost GS, Murphy KG, Dhillo WS, Ghatei MA, Bloom SR (2001) Ghrelin enhances appetite and increases food intake in humans. *J Clin Endocrinol Metab* **86**: 5992

Wren AM, Small CJ, Ward HL, Murphy KG, Dakin CL, Taheri S, Kennedy AR, Roberts GH, Morgan DG, Ghatei MA, Bloom SR (2000) The novel hypothalamic peptide ghrelin stimulates food intake and growth hormone secretion. *Endocrinology* **141**: 4325-4328

Wu GD, Chen L, Forslund K, Traber PG (1994) Hepatocyte nuclear factor-1 alpha (HNF-1 alpha) and HNF-1 beta regulate transcription via two elements in an intestine-specific promoter. *J Biol Chem* **269**: 17080-17085

Xiao Y (2011) Enhancer of zeste homolog 2: A potential target for tumor therapy. *Int J Biochem Cell Biol* **43**: 474-477

Yabe D, Seino Y (2011) Two incretin hormones GLP-1 and GIP: comparison of their actions in insulin secretion and beta cell preservation. *Prog Biophys Mol Biol* **107**: 248-256

Yabe D, Seino Y (2013) Incretin actions beyond the pancreas: lessons from knockout mice. *Curr Opin Pharmacol* **13**: 946-953

Yadav A, Kataria MA, Saini V (2013) Role of leptin and adiponectin in insulin resistance. *Clin Chim Acta* **417**: 80-84

Yamada Y, Hayami T, Nakamura K, Kaisaki PJ, Someya Y, Wang CZ, Seino S, Seino Y (1995) Human gastric inhibitory polypeptide receptor: cloning of the gene (GIPR) and cDNA. *Genomics* **29**: 773-776

Yamagata K (2003) Regulation of pancreatic beta-cell function by the HNF transcription network: lessons from maturity-onset diabetes of the young (MODY). *Endocr J* **50**: 491-499

Yamagata K, Nammo T, Moriwaki M, Ihara A, Iizuka K, Yang Q, Satoh T, Li M, Uenaka R, Okita K, Iwahashi H, Zhu Q, Cao Y, Imagawa A, Tochino Y, Hanafusa T, Miyagawa J, Matsuzawa Y (2002) Overexpression of dominant-negative mutant hepatocyte nuclear factor-1 alpha in pancreatic beta-cells causes abnormal islet architecture with decreased expression of E-cadherin, reduced beta-cell proliferation, and diabetes. *Diabetes* **51**: 114-123

Yamagata K, Oda N, Kaisaki PJ, Menzel S, Furuta H, Vaxillaire M, Southam L, Cox RD, Lathrop GM, Boriraj VV, Chen X, Cox NJ, Oda Y, Yano H, Le Beau MM, Yamada S, Nishigori H, Takeda J, Fajans SS, Hattersley AT, Iwasaki N, Hansen T, Pedersen O, Polonsky KS, Bell GI, et al. (1996) Mutations in the hepatocyte nuclear factor-1alpha gene in maturity-onset diabetes of the young (MODY3). *Nature* **384**: 455-458

Yamazaki S, Satoh H, Watanabe T (2014) Liraglutide Enhances Insulin Sensitivity by Activating AMP-Activated Protein Kinase in Male Wistar Rats. *Endocrinology*: en20132157

Yang J, Brown MS, Liang G, Grishin NV, Goldstein JL (2008) Identification of the acyltransferase that octanoylates ghrelin, an appetite-stimulating peptide hormone. *Cell* **132**: 387-396

Yang Q, Yamagata K, Fukui K, Cao Y, Nammo T, Iwahashi H, Wang H, Matsumura I, Hanafusa T, Bucala R, Wollheim CB, Miyagawa J, Matsuzawa Y (2002) Hepatocyte nuclear factor-1alpha modulates pancreatic beta-cell growth by regulating the expression of insulin-like growth factor-1 in INS-1 cells. *Diabetes* **51**: 1785-1792

Yang SJ, Min KW, Gupta SK, Park JY, Shivane VK, Pitale SU, Agarwal PK, Sosale A, Gandhi P, Dharmalingam M, Mohan V, Mahesh U, Kim DM, Kim YS, Kim JA, Kim PK, Baik SH (2013) A multicentre, multinational, randomized, placebo-controlled, double-blind, phase 3 trial to evaluate the efficacy and safety of gemigliptin (LC15-0444) in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Obes Metab* **15**: 410-416

Yarandi SS, Hebbar G, Sauer CG, Cole CR, Ziegler TR (2011) Diverse roles of leptin in the gastrointestinal tract: modulation of motility, absorption, growth, and inflammation. *Nutrition* **27**: 269-275

Yen HC, Xu Q, Chou DM, Zhao Z, Elledge SJ (2008) Global protein stability profiling in mammalian cells. *Science* **322**: 918-923

Yip RG, Boylan MO, Kieffer TJ, Wolfe MM (1998) Functional GIP receptors are present on adipocytes. *Endocrinology* **139**: 4004-4007

Yoon JH, Abdelmohsen K, Srikantan S, Yang X, Martindale JL, De S, Huarte M, Zhan M, Becker KG, Gorospe M (2012) LincRNA-p21 suppresses target mRNA translation. *Mol Cell* **47**: 648-655

Yoshiuchi I, Yamagata K, Yang Q, Iwahashi H, Okita K, Yamamoto K, Oue T, Imagawa A, Hamaguchi T, Yamasaki T, Horikawa Y, Satoh T, Nakajima H, Miyazaki J, Higashiyama S, Miyagawa J, Namba M, Hanafusa T, Matsuzawa Y (1999) Three new mutations in the hepatocyte nuclear factor-1alpha gene in Japanese subjects with diabetes mellitus: clinical features and functional characterization. *Diabetologia* **42**: 621-626

Zhang CY, Baffy G, Perret P, Krauss S, Peroni O, Grujic D, Hagen T, Vidal-Puig AJ, Boss O, Kim YB, Zheng XX, Wheeler MB, Shulman GI, Chan CB, Lowell BB (2001) Uncoupling protein-2 negatively regulates insulin secretion and is a major link between obesity, beta cell dysfunction, and type 2 diabetes. *Cell* **105**: 745-755

Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM (1994) Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* **372**: 425-432

Zhang Y, Reinberg D (2001) Transcription regulation by histone methylation: interplay between different covalent modifications of the core histone tails. *Genes Dev* **15**: 2343-2360

Zhao TY, Li F, Xiong ZY (2010) Frequent reoccurrence of hypoglycemia in a type 2 diabetic patient with insulin antibodies. *Mol Diagn Ther* **14**: 237-241

Zhou J, Livak MF, Bernier M, Muller DC, Carlson OD, Elahi D, Maudsley S, Egan JM (2007) Ubiquitination is involved in glucose-mediated downregulation of GIP receptors in islets. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **293**: E538-547

Zhu R, Wong KF, Lee NP, Lee KF, Luk JM (2010) HNF1alpha and CDX2 transcriptional factors bind to cadherin-17 (CDH17) gene promoter and modulate its expression in hepatocellular carcinoma. *J Cell Biochem* **111**: 618-626

Zhu X, Zhou A, Dey A, Norrbom C, Carroll R, Zhang C, Laurent V, Lindberg I, Ugleholdt R, Holst JJ, Steiner DF (2002) Disruption of PC1/3 expression in mice causes dwarfism and multiple neuroendocrine peptide processing defects. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 10293-10298

Annexe

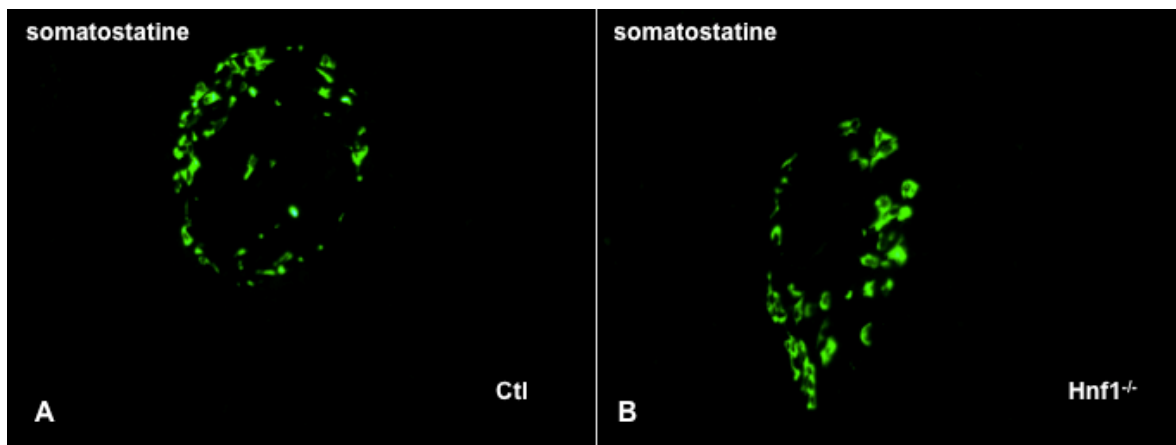


Figure supplémentaire 1 : Mise en évidence des cellules δ pancréatiques produisant la somatostatine chez les souris $Hnf1\alpha^{-/-}$ et contrôles.

Des immunofluorescences sont menées dans le pancréas des animaux contrôles (A) et mutants en B en utilisant un anticorps dirigé contre l'hormone somatostatine. Grossissement x20.

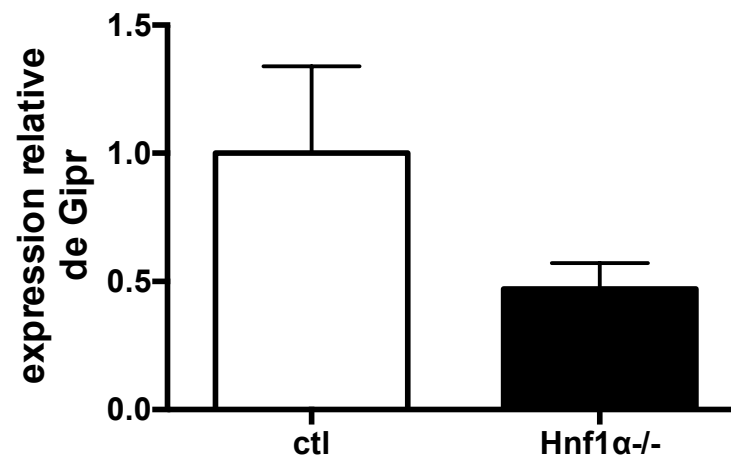


Figure supplémentaire 2 : Expression du transcrit GIPR dans le pancréas de souris Hnf1α^{-/-} et Hnf1α^{+/+}.

L'expression du gène Hnf1β a été mesurée par qPCR dans le pancréas de souris âgées de 4 à 6 mois. L'expression du gène est relativisée par rapport à celle du gène PBGD dans le pancréas. n=6.

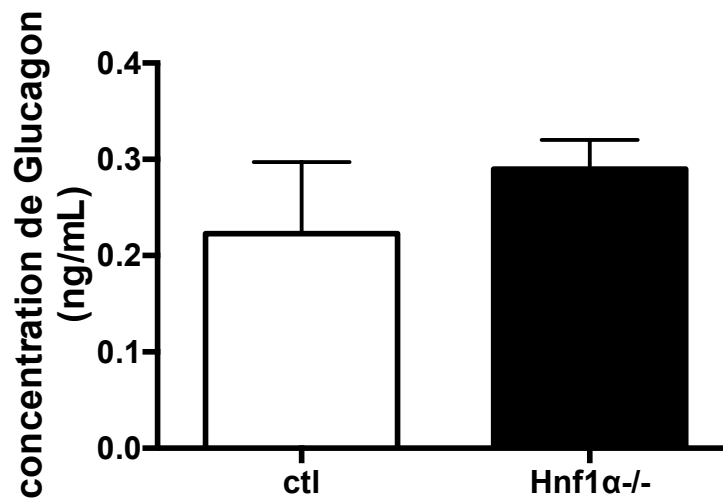


Figure supplémentaire 3 : Détermination de la quantité de glucagon circulant.

Mesure par ELISA effectuée chez des animaux âgés de 4 à 6 mois et mis à jeun durant xx heures (n=9). B : L'expression du gène glucagon a été mesurée par qPCR dans le pancréas de souris âgées de 4 à 6 mois mises à jeun pendant 16 heures.

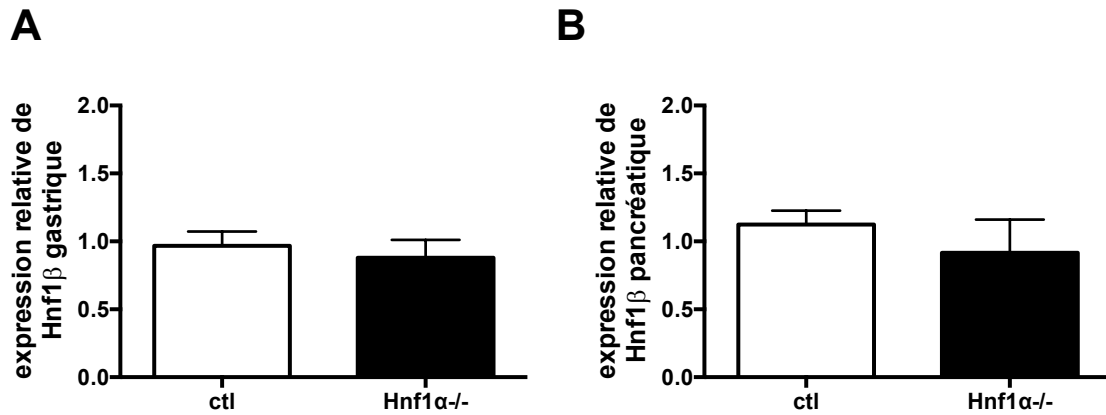


Figure supplémentaire 4: Expression du gène Hnf1β dans l'estomac et le pancréas des souris Hnf1α^{-/-} et Hnf1α^{+/+}.

A : L'expression du gène Hnf1β a été mesurée par qPCR dans l'estomac et B : le pancréas de souris âgées de 4 à 6 mois. L'expression du gène est relativisée par rapport à celle du gène TBP dans l'estomac et PBGD dans le pancréas. (n=5).

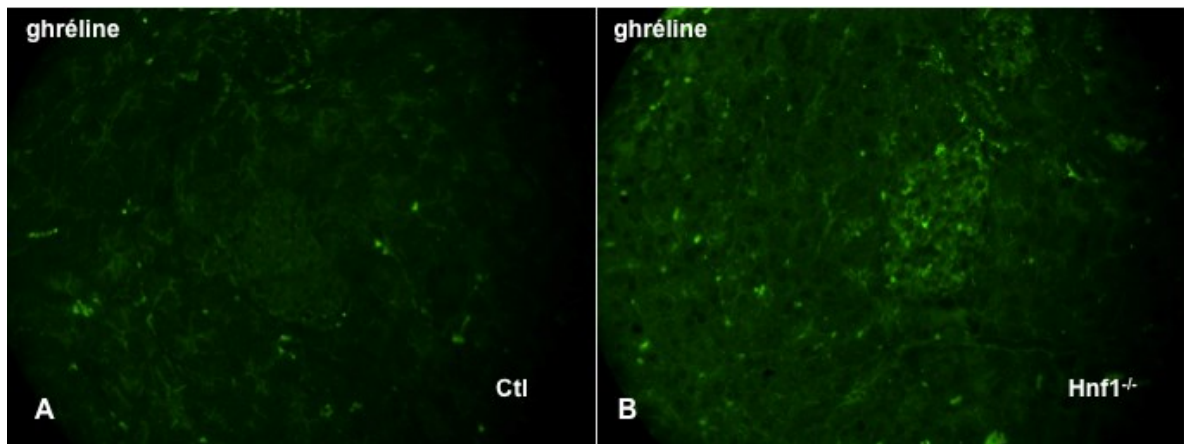


Figure supplémentaire 5: Mise en évidence des cellules productrices de ghréline au niveau du pancréas.

Des immunofluorescences sont menées dans le pancréas d'animaux à jeun durant 16 heures, animaux contrôles en A et mutants en B en utilisant un anticorps dirigé contre l'hormone ghréline. Grossissement x20.

Remerciements

Je tiens à remercier le Canada et sa province, le Québec, de m'avoir accueilli chaleureusement et permis de vivre une aventure humaine, culturelle et professionnelle formidable.

Je souhaite remercier, tout d'abord, mon superviseur le Professeur François Boudreau de m'avoir accepté dans son laboratoire et permis de mener mon projet en me conseillant, et en me permettant de présenter mes travaux dans de prestigieux congrès.

Je tiens également à remercier l'ensemble du corps professoral du Département d'Anatomie et de Biologie Cellulaire de l'Université de Sherbrooke pour sa disponibilité et son expertise. Je voudrais adresser des remerciements aux Professeurs Nathalie Rivard pour ses remarques constructives et une discussion de Mars 2011 sans laquelle j'aurais baissé les bras et également au Professeur Fernand-Pierre Gendron pour sa bonne humeur et son accessibilité auprès des étudiants ainsi qu'au Professeur Brendan Bell pour son soutien.

Je tiens à remercier les membres de mon laboratoire : Carine Lussier pour m'avoir fait confiance, légué les souris mutantes, et démontré que de l'entropie pouvait naître des choses formidables, Mathieu Darsigny tout d'abord pour ta générosité, ta dévotion, ta gentillesse, puis pour ta rigueur et tout ce que tu as apporté au laboratoire, David Lepage qui a été le meilleur des remèdes quand ça n'allait pas, quand ma famille me manquait. Aller au laboratoire et nous retrouver tous les deux de notre côté de la paillasse où en plus de travailler au laboratoire nous nous évadions dans des délires que mêmes les murs du laboratoire avec nos amis Franky Vincent et Bob au bord du Grand Canyon. Merci également à Jean-Philippe Babeu qui m'a supporté pendant ces 4 ans. Je t'ai connu avant le laboratoire et je te dois un peu de ce doctorat, tes conseils, ta gentillesse et ta patience m'ont apporté une quiétude sans pareil. Je dois remercier également Isabelle Fréchette pour nos longues discussions en salle de culture et souvent autour d'un verre. Je remercie aussi Christine Jones, Stéphanie St-Jean et Roxanne Latreille.

Je remercie l'ensemble du département tant au niveau des assistants de recherche que des étudiants comme Étienne Lemieux. Un merci tout particulier à « Gégé » Bertnachez qui a un sens de l'humour aussi particulier que le mien et qui m'a donné de précieuses indications sur l'extraction des ARNs pancréatiques et partagé sa viande d'orignal de nombreuses fois.

Je souhaite remercier Sébastien « Babao » Cagnol pour son amitié, ses conseils et sa disponibilité. Tu m'as encouragé tout au long de mon doctorat tant au niveau scientifique qu'humain, tu m'as accueilli chez toi, amené à la pêche, mais pour ça nous n'étions pas bien doués.

Après avoir remercié les personnes du département, je ne peux maintenant que remercier mes amis et ma famille qui ont été « mon carburant » au cours de cette aventure. Tout d'abord mes parents qui ont fait de nombreux sacrifices tout au long de leur vie pour me permettre de vivre sans regret mes passions et mon instruction et qui, plus que tout, m'ont inculqué bon nombre de concepts tels que la franchise, l'honneur et la combativité. J'ai toujours senti de votre part une entière confiance à mon égard que ce soit au meilleur de ma forme dans mes défis barrés et mes ascensions folles au milieu de mes Pyrénées magnifiques ou alors lorsque le ciel devenait menaçant. Je souhaite bien entendu remercier mon frère Jean-Philippe qui, par une phrase prononcée en Décembre 2012, et que je ne peux malheureusement pas écrire ici, m'a fait avancer aussi vite que la plus puissante des motos. Grâce à toi, Émilie et les deux nouveaux membres de la famille, Tessa la grenouille et Max le têtard, je vois que tout n'est qu'une affaire de priorités et je pense que, désormais, toi et moi on est quitte. Je souhaite remercier mon grand-père Marcelino Moreno, personnage marquant malgré le peu de temps passé avec lui et qui ma donné le goût de me battre et cela quelque soit l'adversité et d'être reconnaissant envers la vie quoiqu'il arrive. Peut être un jour Papy pourrais-je dire à mon tour « No pasarán ». Je remercie ma famille adoptive Franco-Québécoise : Yves et Jocelyne Camus et leur tribu : Annie, Aymeric « Swag » et Didier « speedo » et bien entendu François « le mauvais ». Vous voir était pour moi une bouffée d'oxygène, je vous en serai reconnaissant pour toujours.

Je voudrais également remercier mes amis restés en France et qui ont toujours cru en moi : mon « petit frère » Totote et mon Pierrote aussi fidèles que des amis puissent être, Jean-Nic et Béné. Bien sûr je remercie Caro, Anne-So, Elo et les mioumioums².

Cette expérience m'a également permis de faire des connaissances extraordinaires et des amitiés, je l'espère durables. Merci à Philippe Dussault et Isabelle Matte vous êtes des gens géniaux, toujours disponibles. Si l'on devait relater tous nos délires je pense qu'on pourrait parler pendant cinq ans sans jamais s'arrêter...Si l'on devait reverser l'équivalent en eau de la bière que l'on a bu, l'Afrique serait sous un mètre d'eau. Je ne peux oublier mes amis Benoît Marchand et Véronique Giroux. Bien qu'initialement ils étaient des collègues de travail ce couple a, plusieurs fois, réussi à me sortir de biens des situations délicates et ce toujours dans la bonne humeur, Elmo m'en parle encore. Ils m'ont nourri de leur gentillesse et m'ont relevé à chaque fois que j'étais pris dans cinq pieds de vase. Vous m'avez ouverts vos bras, votre logis sans rien attendre en retour. Ben, on boira encore notre truc « étrange » qui a goût de pomme et de betterave et Véro tu es définitivement la reine des profiteroles.

Enfin je souhaite remercier toutes les autres personnes rencontrées au cours de mon périple. Tout d'abord mon équipe d'airsoft où j'ai pu voir ce qu'était l'entraide, la ténacité, l'esprit de corps, la loyauté et le dépassement de soi. Merci Big, Striker, Warrior, Chonchito. Un merci particulier au meilleur groupe constitué d'amis : Dany, Tattoo, TV, Bulldog, Tiger et Spater, qui m'ont accueillis au sein de leur famille « Bravo Squad » nom faisant fuir les ennemis au seul son retentissant du « d'ACCCCAAORD » aujourd'hui assimilé dans mon langage au même titre que «chaudron».

Merci également à tous les habitués de la Mare au Diable : Christophe et Angélique et leurs enfants, les propriétaires qui m'ont accueillis. Ils m'ont permis de me loger puis m'ont assimilé à la tribu Pernin; Denis mon grand Belge préféré, Laurent le Tarbais, Amélie, Daniel et Véro (la 2^e) qui ne remettra certainement plus les pieds là bas.