

Université de Montréal

Étude de la fonction du récepteur aux acides gras GPR120/FFAR4 dans la régulation de  
l'homéostasie du glucose

*Par*

Arthur Guillaume

Faculté de médecine

Mémoire présenté en vue de l'obtention du grade de Maîtrise  
en Sciences biomédicales, option Médecine expérimentale

Mai 2020

© Arthur Guillaume, 2020

Université de Montréal

## Résumé

**Mots-clés :** Diabète sucré, GPR120, GPR40, îlots de Langerhans, cellules delta, cellules bêta, cellules alpha, FFAR4, FFAR1

Le diabète de type 2 (DT2) résulte de l'incapacité des cellules  $\beta$  sécrétrices d'insuline à compenser la résistance à l'insuline qui s'installe chez les patients obèses. Un traitement potentiel viserait donc à augmenter la sécrétion d'insuline. Dans ce sens, les récepteurs aux acides gras GPR120 et GPR40 potentialisent la sécrétion d'insuline. Cependant, la signalisation GPR120 dans les îlots est méconnue. L'activation de GPR120 diminue la sécrétion de somatostatine (SST), un inhibiteur de la sécrétion d'insuline, par les cellules  $\delta$ . Ces deux récepteurs régulent l'homéostasie du glucose et sont donc possiblement complémentaires. Nos objectifs étaient d'étudier la signalisation GPR120 dans les îlots pancréatiques, ainsi que la complémentarité des récepteurs GPR120 et GPR40 dans le contrôle de l'homéostasie glucidique. À l'aide d'îlots isolés de souris n'exprimant pas GPR120, constitutivement ou uniquement dans les cellules  $\delta$ , nous avons étudié le rôle de GPR120 dans les sécrétions d'insuline, glucagon et de SST. Nous avons ensuite étudié des souris n'exprimant pas GPR40, GPR120 ou les deux, sous une diète riche en gras pendant 12 semaines pour étudier la complémentarité des deux récepteurs. L'activation de GPR120 diminue la sécrétion de SST et stimule les sécrétions d'insuline et de glucagon dans les îlots isolés. Cet effet est aboli par la délétion de GPR120 dans les cellules  $\delta$  *in vitro*, et la double délétion de GPR120 et GPR40 ne révèle pas d'action complémentaire dans l'homéostasie glucidique. Ces résultats suggèrent que la signalisation GPR120 dans les cellules  $\delta$  est responsable de l'amélioration de la fonction des îlots. Une meilleure compréhension du rôle joué par GPR120 dans la fonction des îlots et l'homéostasie du glucose est cruciale et pourrait permettre le développement de nouvelles options thérapeutiques dans le traitement du diabète.

## Abstract

In obese patients, type 2 diabetes stems from the failure of the insulin-secreting beta cells to compensate for insulin resistance. Increasing insulin secretion is therefore a viable treatment strategy. In this regard, G protein-coupled receptors (GPCR) are proven therapeutic targets. Activation of the GPCR for long-chain saturated and unsaturated fatty acid GPR40 and GPR120 increase insulin secretion in response to glucose. However, exactly how GPR120 potentiates insulin secretion is unknown. GPR120 and GPR40 both regulate glucose homeostasis and therefore could act in a complementary manner. We aimed to decipher GPR120 signalling in the pancreatic islets and study the complementary roles of GPR120 and GPR40 in maintaining glucose homeostasis. To this aim, we first measured insulin, glucagon and somatostatin secretion following GPR120 activation in isolated islets from mice with a global or somatostatin-cell-specific knock-out of GPR120. Then we studied glucose metabolism in mice with global deletion of GPR120, GPR40 or both, under a high fat diet for 12 weeks. We observed increased insulin and glucagon secretions mirrored by a decreased in somatostatin release following GPR120 activation in isolated islets, an effect abolished by a global or  $\delta$ -specific deletion of GPR120. A double deletion of GPR120 and GPR40 did not have more impact on glucose metabolism or beta-cell function compared to a simple deletion of either receptor. A better understanding of the GPR120 role in islet function is crucial and could lead to the discovery of new therapeutic options.

**Keywords:** GPR120, GPR40, Pancreatic islet, Type 2 diabetes, somatostatin-secreting cells, Beta cells, alpha cells, FFAR4, FFAR1

# Table des matières

Résumé.....	3
Abstract.....	4
Table des matières.....	5
Liste des tableaux.....	9
Liste des Figures.....	11
Liste des sigles et abréviations.....	13
Remerciements.....	17
Chapitre 1 – État des connaissances.....	19
1.1 Le pancréas endocrine, régulateur de la glycémie.....	19
1.1.1 Les îlots de Langerhans.....	19
1.1.2 Les cellules endocrines de l'îlot de Langerhans.....	21
1.1.2.1 La cellule $\beta$ sécrétrice d'insuline.....	21
1.1.2.1.1 L'insuline et son récepteur.....	21
1.1.2.1.2 Le peptide C.....	23
1.1.2.1.3 L'urocortine-3.....	23
1.1.2.2 La cellule $\alpha$ sécrétrice de glucagon.....	23
1.1.2.3 La cellule $\delta$ sécrétrice de SST.....	25
1.1.2.4 Les cellules productrices du polypeptide pancréatique (PP).....	27
1.1.2.5 Les cellules $\epsilon$ sécrétrices de ghréline.....	27
1.2 Les nutriments régulent la fonction des îlots.....	29
1.2.1 Le glucose, principal modulateur de la fonction des îlots.....	29
1.2.2 Les incrétines.....	30

1.2.3 Les acides gras comme sécrétagogues .....	30
1.2.3.1 GPR40/FFAR1 .....	31
1.2.3.2 GPR120/FFAR4 .....	32
1.3 Le diabète sucré, une pathologie des îlots pancréatiques.....	37
1.3.1 Le diabète de type I.....	37
1.3.2 Le diabète gestationnel.....	38
1.3.3 Le diabète non insulino-dépendant chez les jeunes (MODY) .....	39
1.3.4 Le diabète de type 2.....	39
1.3.4.1 La résistance à l'insuline.....	40
1.3.4.2 La glucolipotoxicité.....	40
1.3.4.3 L'altération des cellules $\beta$ .....	41
1.3.4.4 Perturbations des interactions paracrines dans l'îlot .....	42
Chapitre 2 — Étude de la fonction du récepteur aux acides gras GPR120/FFAR4 dans la régulation de l'homéostasie du glucose .....	43
2.1 Mise en contexte de la thèse .....	43
2.1.1 Problématique.....	43
2.1.2 Hypothèse et objectif du mémoire .....	44
2.1.2.1 Hypothèse .....	44
2.1.2.2 Objectifs .....	44
2.1.3 Matériel et méthodes .....	44
2.1.3.1 Génération des différentes colonies et devis expérimental.....	44
2.1.3.2 Évaluation de l'homéostasie du glucose.....	46
2.1.3.3 Évaluation de la composition corporelle .....	48
2.1.3.4 Isolement des îlots de Langerhans.....	48

2.1.3.4.1	Mesure de la sécrétion d'îlots isolés de souris .....	48
2.1.3.4.2	Mesure de la prolifération des cellules des îlots par marquage immunologique .....	49
2.1.3.4.3	Extraction d'ARN et réaction RT-PCR quantitative .....	49
2.1.3.5	Analyses statistiques .....	49
2.1.4	Résultats .....	51
2.1.4.1	La signalisation GPR120 (FFAR4) dans les cellules $\delta$ des îlots de Langerhans potentialise la sécrétion d'insuline et de glucagon.....	51
2.1.4.1.1	Contribution aux résultats .....	51
2.1.4.1.2	Résumé du projet qui sera présenté dans un article écrit par Marine Croze et Julien Ghislain.....	51
2.1.4.2	Le rôle des récepteurs aux acides gras GPR120 et GPR40 dans l'homéostasie du glucose, étude <i>in vivo</i> chez la souris .....	59
2.1.4.2.1	Contribution aux résultats .....	59
2.1.4.2.2	Les souris mâles sous une diète normale (CHOW) .....	59
2.1.4.2.3	Les souris mâles sous une diète riche en gras (HFD) .....	65
2.1.4.2.4	Les souris femelles sous diète régulière (CHOW) .....	69
2.1.4.2.5	Les souris femelles sous une diète riche en gras (HFD) .....	75
2.1.5	Discussion et conclusions .....	78
2.1.5.1	L'activation de GPR120 dans les îlots de Langerhans <i>ex vivo</i> potentialise la sécrétion d'insuline .....	78
2.1.5.2	L'activation <i>in vivo</i> de GPR120 améliore la tolérance et la sécrétion d'insuline, en plus de potentialiser la sécrétion de glucagon .....	78
2.1.5.3	L'activation de GPR120 <i>ex vivo</i> stimule la prolifération des $\beta$ .....	79

2.1.5.4 GPR120 est impliqué dans le contrôle de la glycémie à jeun et la réponse compensatoire des cellules $\beta$ à la résistance à l'insuline.....	80
2.1.5.5 L'activation de GPR120 dans les cellules $\delta$ des îlots pancréatiques est responsable de l'action insulinothrompique et glucagonotopique de l'activation de GPR120 dans les îlots <i>ex vivo</i> .....	82
2.1.5.6 GPR120 et GPR40 n'ont pas de rôle complémentaire dans les l'homéostasie du glucose sous diète HFD. ....	83
2.1.5.7 Limites de l'étude .....	85
2.1.5.8 Perspectives et conclusions .....	85
Références bibliographiques.....	87

## Liste des tableaux

Tableau 1. – Étude du rôle des récepteurs aux acides gras GPR120 et GPR40 dans le métabolisme énergétique des souris mâles .....	64
Tableau 2. – Étude du rôle des récepteurs aux acides gras GPR120 et GPR40 dans le métabolisme énergétique des souris mâles sous HFD .....	68
Tableau 3. – Étude du rôle des récepteurs aux acides gras GPR120 et GPR40 dans le métabolisme énergétique des souris femelles .....	74
Tableau 4. – Étude du rôle des récepteurs aux acides gras GPR120 et GPR40 dans le métabolisme énergétique des souris mâles sous diète HFD .....	77



## Liste des Figures

<b>Figure 1.</b> – Comparaison de l’architecture des îlots de Langerhans de souris et d’humains..	20
<b>Figure 2.</b> – Les voies de signalisation de l’insuline. ....	22
<b>Figure 3.</b> – Les voies de signalisation du glucagon dans les hépatocytes.....	24
<b>Figure 4.</b> – La signalisation de la SST dans les îlots de Langerhans.....	26
<b>Figure 5.</b> – Les échanges entre les différents organes régulent le contrôle des îlots pancréatiques sur le métabolisme.....	28
<b>Figure 6.</b> – La voie de signalisation de GPR40 dans la cellule $\beta$ . ....	32
<b>Figure 7.</b> – Les mécanismes moléculaires associés à GPR120 et les fonctions physiologiques qui y sont reliées.....	34
<b>Figure 8.</b> – Étude du rôle de GPR120 et GPR40 dans l’homéostasie du glucose.....	46
<b>Figure 9.</b> – La signalisation GPR120 dans les cellules $\delta$ potentialise la sécrétion d’insuline en réponse au glucose.....	54
<b>Figure 10.</b> – La signalisation GPR120 dans les cellules $\delta$ potentialise la sécrétion de glucagon en réponse à l’arginine.....	55
<b>Figure 11.</b> – La délétion de GPR120 dans les cellules $\delta$ pancréatiques ne bloque pas l’action du CompoundA (CpdA) sur la prolifération des cellules $\beta$ . ....	58
<b>Figure 12.</b> – La double délétion de GPR120 ou GPR40 n’a pas d’effet majeur sur l’homéostasie énergétique chez la souris mâle.....	59
<b>Figure 13.</b> – Le récepteur aux acides gras GPR120 est impliquée dans le contrôle de la glycémie en état de jeûne chez la souris mâle.....	60
<b>Figure 14.</b> – Le récepteur aux acides gras GPR120 agit dans le contrôle la glycémie en condition d’hyperglycémie.....	62
<b>Figure 15.</b> – La double délétion de GPR120 ou GPR40 n’a pas sur la réponse à la diète HFD chez la souris mâle.	65
<b>Figure 16.</b> – Le récepteur à acides gras GPR120 participe à la régulation du poids chez la souris femelle	69

**Figure 17.** – Les récepteurs à acides gras GPR120 et GPR40 participent au contrôle de la glycémie chez la souris femelle.....70

**Figure 18.** – Caractérisation de l’homéostasie du glucose lors d’un clamp hyperglycémique.  
72

**Figure 19.** – La double délétion de GPR120 et GPR40 n’a pas d’effet majeur sur l’homéostasie du glucose chez la souris femelle sous HFD.....75

## Liste des sigles et abréviations

AKT : protéine kinase B

ALA : acide alpha linoléique

AMPc : adénosine monophosphate cyclique

ARNm : acide ribonucléique messenger

ASC : air sous la courbe

ATP : adénoside tri phosphate

Ca<sup>2+</sup> : ion calcium

CCDV : canaux calciques dépendant du voltage

CHG : clamp hyperglycémique

CpdA : compound A

CREB : protéine de liaison d'éléments-AMP cyclique répondant

DAG : diacylglycérol

DbleKO : double délétion constitutive de GPR120 et GPR40

DHA : acide docosahexaénoïque

DT1 : diabète de type 1

DT2 : diabète de type 2

EPA : acide eicosapentaénoïque

FLOX : souris dont l'exon 1 du gène codant pour GPR120 et entouré de région cible LoxP pour la Cre-recombinante

GAP : jonctions communicantes

GHS-R : récepteurs à Ghréline

GIRK : canaux  $K^+$  rectificateurs de courant entrant activés par les protéines G

GIP : polypeptide insulinothrompique dépendant du glucose

GLP-1 : peptide-1 de type glucagon

GLP-1R : récepteur à GLP-1

GLUT1-3 : transporteurs de glucose

GPR120KO : délétion complète constitutive de GPR120

GPR120-L : isoforme long de GPR120

GPR120-S : isoforme court de GPR120

GPR40KO : délétion complète constitutive de GPR40

IGF-1/2 : facteur de croissance analogue à l'insuline 1 ou 2

IL-6 : l'interleukin-6

IP<sub>3</sub> : inositol triphosphate

ipITT : test de tolérance à l'insuline par injection intra-péritoneal

IRM : imagerie par résonance magnétique

$K_{itt}$  : Taux de retrait du glucose dans le plasma durant l'ipITT. Est le produit du  $T_{1/2}$  calculé à partir de la partie de pente décroissance linéaire du glucose plasmatique par la constante 0,963.

MAPK : la protéine kinase activée par mitogène

MODY : diabète non insulinothrompique chez les jeunes

oGTT : test d'hyperinsulinémie provoqué par voie orale

PC : pro-hormones convertases

PI<sub>3</sub>K : kinase phosphoinositide 3

PIP<sub>3</sub> : Phosphatidylinositol (3, 4, 5) -triphosphate

PKA : protéine kinase A

PLC : phospholipase C

PP : polypeptide pancréatique

RCPG : récepteur couplé aux protéine G

RI : récepteur à l'insuline

RT-PCR : reverse- transcriptase polymerase chain reaction

SISG : sécrétion d'insuline en réponse au glucose

SSSG : sécrétion de somatostatine en réponse au glucose

SST : somatostatine

SST-Cre : souris exprimant l'enzyme cre-recombinante dans les cellules productrices de somatostatine

SSTR1-5 : récepteurs à somatostatine 1 à 5

TLR-4 : récepteurs de type Toll4

TNF- $\alpha$  : facteur- $\alpha$  nécrotique de tumeur

Ucn3 : urocortine-3 (Ucn3)

$\delta$ KO : souris n'exprimant pas GPR120 dans les cellules productrices de SST

## Remerciements

Je tiens à remercier toutes les personnes sans qui ce projet n'aurait pas été possible.

Tout d'abord, **Vincent Poitout**, pour l'opportunité qu'il m'a donnée de travailler sur ce projet, la confiance et le soutien qu'il m'a accordés.

**Julien Ghislain** pour tout le travail fait sur la conception du projet et l'analyse des résultats, pour m'avoir aidé lors des expériences de cytométrie en flux et à chaque fois que j'en avais besoin.

**Marine Croze** pour m'avoir intégré dans ce projet qu'elle a géré de main de maître, pour m'avoir guidé, supporté et appris tout ce que je sais, et plus généralement pour le travail considérable qu'elle a accompli.

J'aimerais remercier tout le personnel de l'animalerie et la plateforme de phénotypage métabolique du CHUM. **Mélanie Éthier** et **Grace Fergusson** ont été indispensables à la réussite de ce projet en apportant leur expérience technique pour l'étude *in vivo* et l'isolation des îlots.

**Caroline Tremblay** pour son apport et mentorat technique, pour les nombreux génotypages de souris et ELISA réalisés. Mes collègues étudiants, **Hasna Maachi** et **Alexis Vivoli**, pour les longues heures passées conjointement à nos bureaux et les nombreux échanges qui en ont découlé. Plus particulièrement Alexis pour m'avoir guidé lors de mes premières PCR et pour avoir répondu à mes nombreuses questions notamment pour le FACS, et Hasna pour son savoir et sa conduite. J'aimerai aussi remercier les différents post-doctorants, notamment **Anne-Laure Castell** et **Scott Campbell**, pour avoir été disponibles lorsque j'avais besoin de conseils. Un grand merci au CHUM et à l'Université de Montréal de m'avoir fourni un cadre de travail et d'apprentissage idéal, ainsi que l'opportunité de pouvoir faire de la recherche dans un milieu stimulant.

Je tiens aussi à remercier la plateforme d'imagerie du CR-CHUM, nominalement **Dominique Gauchat** et **Philippe St-Onge**, pour leur assistance et leurs conseils.

Un merci tout particulier à **Bianca** pour son soutien moral continu, pour m'avoir écouté dans les bons moments mais aussi les périodes plus difficiles, avoir été une spectatrice toujours

enthousiaste de mes présentations et avoir tenté de corriger mes nombreuses fautes d'orthographe.

Et c'est remerciement ne serait pas complet sans mentionner ma mère, **Carole**, qui m'a soutenu moralement et financièrement, et a fait de nombreux sacrifices pour m'offrir la meilleure éducation possible. Pour finir, je veux remercier ma grand-mère, **Francine**, qui m'a donné le goût de la lecture et de l'apprentissage, et qui a toujours été pour moi un modèle de résilience et de gentillesse.

# Chapitre 1 – État des connaissances

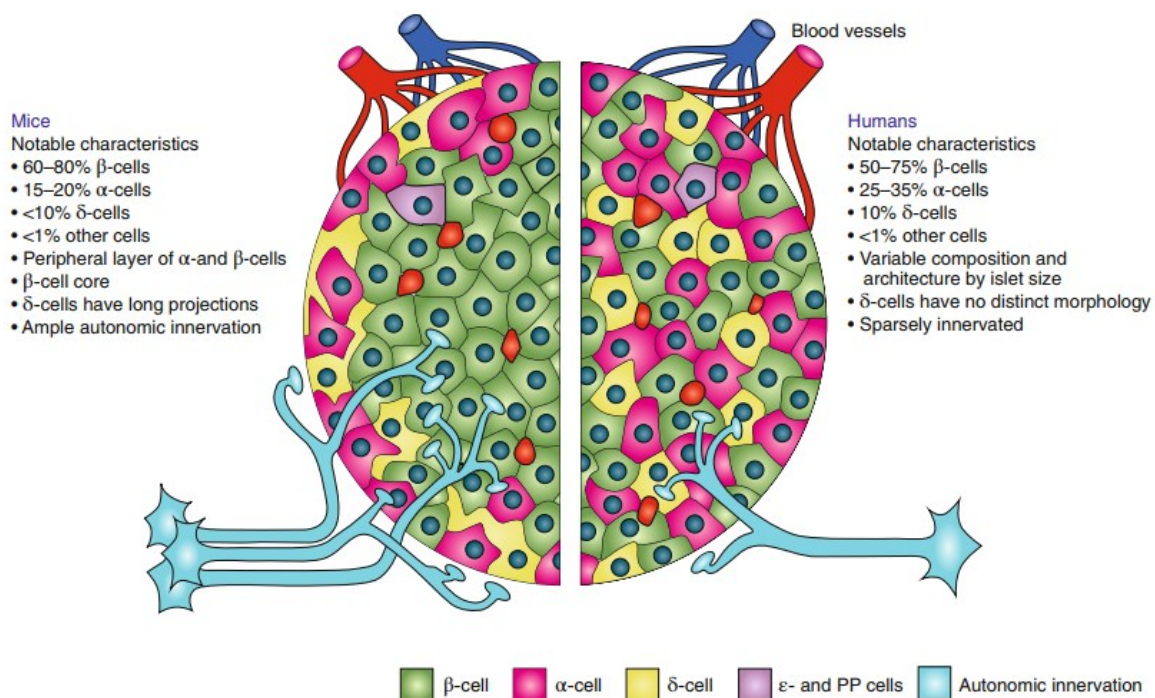
## 1.1 Le pancréas endocrine, régulateur de la glycémie

### 1.1.1 Les îlots de Langerhans

Le glucose est la source principale d'énergie des cellules. Il est donc essentiel qu'une quantité suffisante de glucose soit disponible dans le sang pour permettre le bon fonctionnement des différents organes. Le cerveau, composé de milliards de neurones, est dépendant du glucose en circulation (la glycémie), utilisant environ 20 % de l'énergie totale dérivée du glucose par l'organisme (1). Sans glucose, les neurotransmetteurs, messagers entre les cellules neurales, ne sont plus produits et la communication ne s'effectue plus. Ainsi, différents mécanismes redondants permettent d'augmenter la quantité de glucose dans le sang : le glucagon (2), l'hormone de croissance (3), le cortisol (4) ainsi que l'adrénaline (5). À l'opposé, une trop grande quantité de glucose est aussi dommageable. Lorsqu'elles sont exposées à des concentrations élevées de glucose, les cellules peuvent réduire le transport de glucose vers le cytoplasme. Néanmoins, certaines cellules, comme les cellules endothéliales de la rétine (6), les cellules mésangiales des glomérules rénaux (7) et les neurones des nerfs périphériques (8), ne peuvent pas diminuer l'influx de glucose assez rapidement. Ceci va causer un état d'hyperglycémie dans les cellules, et entraîner des complications visuelles, rénales ainsi que neuronales. La glycémie est donc finement contrôlée et maintenue dans un intervalle de 72 et 180 mg/dL, soit 4,0 et 10,0 mM chez l'humain (9). L'euglycémie est l'état dans lequel les concentrations de glucose dans le sang sont normales. Une seule hormone diminue le glucose en circulation : l'insuline. L'insuline augmente la capture et l'utilisation du glucose par les organes, ainsi que son stockage sous forme de lipides par les adipocytes, en plus d'inhiber la glycolyse et la gluconéogenèse (10). Elle est sécrétée par les îlots de Langerhans, des micro-organes endocrines situés dans le pancréas, plus précisément par les cellules  $\beta$ . Les différentes cellules endocrines des îlots forment un réseau régulant leur fonction : les cellules  $\alpha$  productrices de glucagon, les cellules  $\delta$  productrices de la SST, les cellules productrices du peptide pancréatique (PP) et les cellules  $\epsilon$  produisant la ghréline. Chez la souris, les cellules  $\alpha$  et  $\delta$  forment un manteau autour d'un noyau de cellules  $\beta$ . Dans cette



conformation, les contacts homologues entre les cellules  $\alpha$  du manteau et  $\beta$  du cœur sont favorisés (11). Cette organisation permet le couplage électrique des cellules  $\beta$  et une réponse synchronisée à une élévation du glucose sanguin (12). Chez cette espèce, le pancréas endocrine est irrigué par des capillaires qui forment une structure autour de l'îlot, le courant sanguin passant des cellules non  $\beta$  vers le noyau des cellules  $\beta$  (13). Chez l'humain, on observe une distribution a priori aléatoire des cellules endocrines, et une réponse synchronisée de groupements de cellules  $\beta$  (14, 15). D'autres modèles d'organisations ont été proposés : les cellules endocrines pourraient former une structure tri-lamellaire, composée de 2 étages de cellules  $\alpha$  entourant une couche de cellules  $\beta$ , le tout formant un îlot en forme de U ou de O. Dans ce modèle, les cellules  $\alpha$  sont concentrées le long de la vasculature qui irrigue l'îlot. Cette organisation permettrait un contact entre les différents types cellulaires avec un continuum entre les cellules  $\beta$  (16).



**Figure 1. – Comparaison de l'architecture des îlots de Langerhans de souris et d'humains.** Extrait de Noguchi et al. (17)

## 1.1.2 Les cellules endocrines de l'îlot de Langerhans

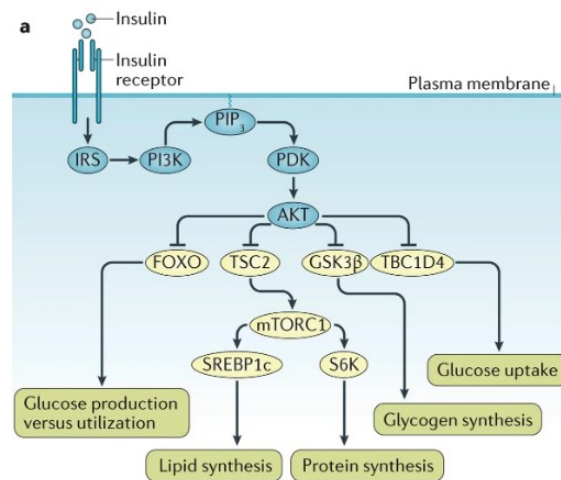
### 1.1.2.1 La cellule $\beta$ sécrétrice d'insuline

Les cellules  $\beta$ , chez l'humain, représentent 50 % des cellules des îlots (18), comparativement à 60-80 % chez la souris (19). Le rôle des cellules  $\beta$  est de produire l'insuline pour maintenir l'euglycémie.

#### 1.1.2.1.1 L'insuline et son récepteur

L'insuline est formée à partir de son précurseur, la pro-insuline. La molécule de pro-insuline commence à son extrémité N-terminale par la chaîne B, se termine par la chaîne A, et les deux segments sont reliés par une chaîne de 23 acides aminés. Dans les granules de sécrétion, la proinsuline est convertie en insuline et peptide-C par l'action de deux pro-hormones convertases (PC), PC1/3 (20) et PC2 (21). En réponse au glucose, la sécrétion d'insuline est biphasique. Rapidement, les vésicules présentes proches de la membrane vont être recrutées, fusionner avec la membrane et sécréter leur contenu. Dans un second temps, des vésicules vont devoir être recrutées et être acheminées à la membrane (22). Le récepteur à insuline (RI) est un tétramère composé de 2 sous-unités  $\alpha$  extramembranaires et de 2 sous-unités  $\beta$  transmembranaires. Il est présent sous deux isoformes différenciées par la présence (RI-A) et l'absence (RI-B) de 12 acides aminés à la partie C-terminale de la sous-unité  $\alpha$  du récepteur, résultat de l'épissage alternatif de la séquence codée par l'exon 11. L'isoforme A est exprimé de façon prédominante dans le cerveau et a une plus grande affinité que le B pour le facteur de croissance similaire à l'insuline (IGF)-1 et 2 ainsi que l'insuline (23, 24). RI-B est l'isoforme la plus abondante dans les muscles, le foie et le tissu adipeux. Suite à la liaison de son ligand, les tyrosines kinases du RI vont s'activer, entraînant l'autophosphorylation du RI et de ces protéines substrats (IRS). Ceci va permettre la liaison de la protéine kinase  $PI_3K$  qui synthétise le phosphatidylinositol (3, 4, 5) - triphosphate ( $PIP_3$ ) à la membrane plasmique. Celui-ci mobilise la kinase dépendante du phosphoinositide (PDK) qui va directement phosphoryler le résidu thréonine 308 de la protéine kinase B (AKT). AKT, une fois activée, va phosphoryler de nombreux substrats, notamment le facteur de transcription Foxo1, la protéine TSC2 activatrice de mTORC1 et la glycogène synthase kinase  $3\beta$  (25). Ces effecteurs sont responsables de l'action de l'insuline sur l'entrée et l'utilisation du glucose par les cellules

ainsi que la synthèse des lipides, des protéines et du glycogène. Le RI est exprimé par la quasi-totalité des cellules de mammifères, mais l'effet sur le métabolisme passe principalement par les muscles, où l'insuline stimule la capture de glucose et la synthèse de protéines (26) tout en inhibant le catabolisme des protéines (27). Dans les tissus adipeux, l'insuline stimule la capture d'acides gras par les adipocytes et le stockage sous forme de triglycérides, tout en inhibant la lipolyse (28) ; dans le foie, l'insuline stimule le stockage de glucose sous forme de glycogène, tout en inhibant la production de glucose par glycogénolyse, que ce soit chez l'humain ou le chien (29-31).



**Figure 2. – Les voies de signalisation de l'insuline.** À la suite de la liaison de l'insuline sur son récepteur (RI), la tyrosine kinase de ce dernier cause son autophosphorylation, ainsi que la phosphorylation de la protéine substrat de l'IR (IRS). Les sites phosphotyrosines sur l'IRS vont permettre la liaison avec la protéine kinase PI<sub>3</sub>K, qui synthétise le PIP<sub>3</sub> à la membrane. Ceci recrute la kinase dépendante du phosphoinositide (PDK), qui phosphoryle l'AKT. Ce dernier va, par la suite, phosphoryler plusieurs substrats : le facteur de transcription Foxo1, la protéine de la sclérose tubéreuse (TSC2), qui permet l'activation de mTORC1 et sa cible, la protéine ribosomale kinase S6 (S6K) et l'élément régulateur de stérol se liant à la protéine 1c (SREBP1c), la kinase de la glycogène synthase 3β (GSK3β). Ces protéines effectrices régulent l'effet de l'insuline sur la production de glucose, son utilisation ainsi que la synthèse de glycogène, protéines et lipides. Extrait de Haeusler et al. (25)

#### *1.1.2.1.2 Le peptide C*

Le peptide C est un des produits du clivage de la pro-insuline composé de 31 acides aminés, sécrété en quantité équimolaire à l'insuline (32). Contrairement à l'insuline, il est sans effets physiologique. Le peptide C, avec une demi-vie de 20 à 30 minutes, est dégradé plus lentement que l'insuline et permet une mesure plus précise de la réponse des cellules  $\beta$ . Sa mesure dans le sang est donc utilisée pour évaluer la fonction des cellules  $\beta$ . En effet le peptide C est métabolisé à un taux constant par les reins, tandis que la clairance de l'insuline par le foie varie (33).

#### *1.1.2.1.3 L'urocortine-3*

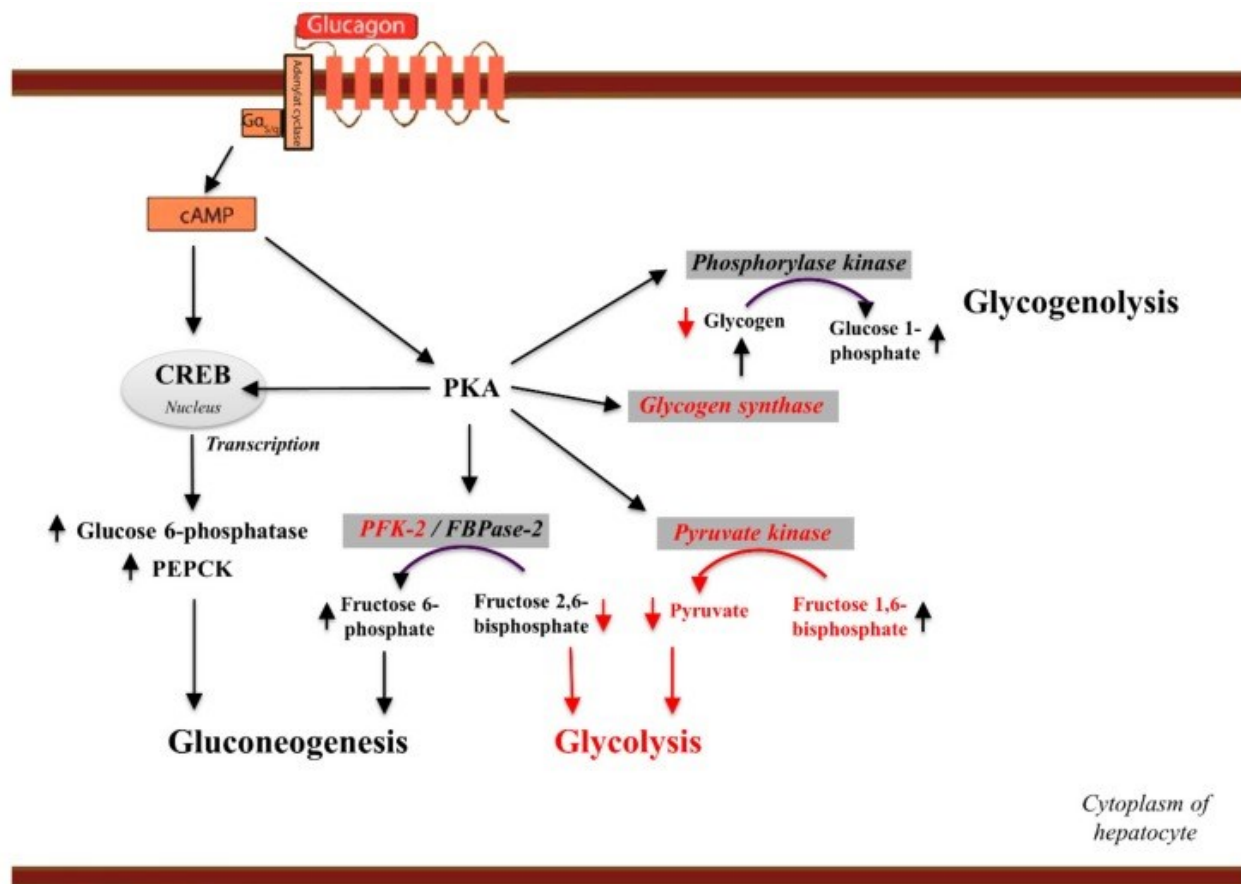
L'urocortine-3 (Ucn3) est un peptide exprimé exclusivement par les cellules  $\beta$  du pancréas chez la souris, et par les cellules  $\alpha$  et  $\delta$  chez l'humain (34). L'Ucn3 est co-sécrétée avec l'insuline et est un ligand pour le récepteur à hormones libérant la corticotropine, le Crhr2. La liaison au récepteur va entraîner une augmentation de la sécrétion de somatostatine (SST) par les  $\delta$ , contrebalançant ainsi la sécrétion d'insuline et de glucagon (35).

#### *1.1.2.2 La cellule $\alpha$ sécrétrice de glucagon*

Les cellules  $\alpha$  sécrètent le glucagon, hormone hyperglycémiant qui contrebalance et s'oppose à l'action hypoglycémiant de l'insuline. Elles comptent pour 15-20 % des cellules des îlots chez l'humain, comparativement à 25-35 % chez la souris (12, 36).

Le gène GCG encode le précurseur du glucagon, le proglucagon. Cette protéine est exprimée principalement dans les cellules  $\alpha$  du pancréas et les cellules entéroendocrines L de l'intestin. Dans le pancréas, la maturation du proglucagon va se faire suite au clivage par PC2 pour former le glucagon (37). Dans les intestins et le cerveau, le proglucagon est clivé en GLP-1 et GLP-2 par PC1 (38). Le récepteur du glucagon est un récepteur à 7 domaines transmembranaires couplé à une protéine G (RCPG); il est abondamment exprimé dans le foie, mais aussi dans les reins, les glandes surrénales, le tractus intestinal et les îlots pancréatiques (39). Le récepteur est principalement couplé aux protéines  $G_{\alpha s}$ . L'activation de  $G_{\alpha s}$  va stimuler l'adénylate cyclase et augmenter les niveaux d'AMPc dans le cytoplasme, activant ainsi une protéine kinase A (PKA). PKA migre par la suite vers le noyau et phosphoryle des facteurs de transcription comme la protéine de liaison d'éléments-AMP cyclique répondant (CREB). Cette dernière promeut la

transcription de gènes ciblés. Le glucagon stimule principalement la glycogénolyse et la gluconéogenèse dans le foie (40), en plus d'augmenter l'oxydation des acides gras (41). Dans les îlots, les cellules  $\beta$  expriment le récepteur à glucagon et son activation stimule la sécrétion d'insuline (42). Cette communication entre cellules  $\alpha$  et  $\beta$  est importante : sa disparition diminue la sécrétion d'insuline stimulé par le glucose (SISG) *in vivo* (43).



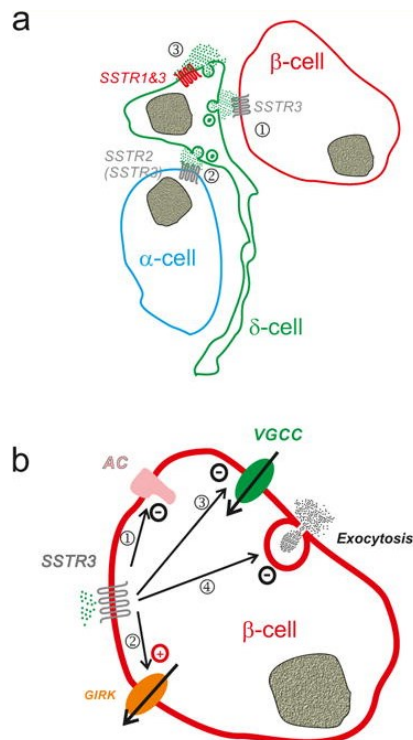
**Figure 3. – Les voies de signalisation du glucagon dans les hépatocytes.** L'activation du récepteur va activer une sous-unité  $G_{\alpha s}$ , augmentant ainsi la quantité d'AMPc et activant une protéine kinase A (PKA). Cette dernière peut alors désactiver la glycogène synthase, inhibant la synthèse de glycogène, et stimuler la glycogénolyse en activant la phosphorylase kinase. L'inhibition de la pyruvate kinase et l'activation parallèle de la fructose biphosphatase inhibe la glycolyse, et stimule la gluconéogenèse. Les flèches rouges indiquent une inhibition par le récepteur du glucagon tandis que les flèches noires indiquent une stimulation. Extrait de Janah et al. (44)

### 1.1.2.3 La cellule $\delta$ sécrétrice de SST

Les cellules  $\delta$  comptent pour 5 à 10 % des cellules des îlots de Langerhans (12). Dans les îlots, les cellules  $\delta$  inhibent simultanément la sécrétion d'insuline par les cellules  $\beta$  et de glucagon par les cellules  $\alpha$ , synchronisant ainsi les sécrétions d'hormones par les îlots. Bien que peu nombreuses, ces cellules régulent efficacement la fonction des cellules  $\alpha$  et  $\beta$ , possiblement par un couplage électrique par des jonctions serrées (45) et des filipodes partant des cellules  $\delta$ , et contactant directement les cellules  $\beta$  et  $\alpha$  (46).

La SST est présente sous deux formes : la SST 14 et la SST 28. Les deux sont dérivées de la prépro-SST. Cette dernière est clivée en pro-SST puis finalement en SST 28, isoforme dominant dans le tube digestif, ou en SST 14 dans les cellules  $\delta$  des îlots ainsi que l'hypothalamus. Les deux isoformes ont une demi-vie courte dans la circulation, inférieure à 2 min, ce qui suggère fortement une action paracrine (47). Il existe 5 sous-classes de récepteurs pour la SST. Tous sont des RCPG. La SST-14 se lie avec une plus grande affinité aux récepteurs 1 à 4, tandis que SST-28 est plus sélectif pour le récepteur 5 chez l'humain (48). Dans les îlots pancréatiques, les cellules  $\alpha$  expriment principalement SSTR2 et SSTR3 chez l'humain et la souris. Chez ces dernières, une délétion de SSTR2 supprime l'effet inhibiteur de la SST sur la sécrétion de glucagon, tandis qu'une délétion de SSTR5 est sans impact, suggérant que l'activation de SSTR2 est responsable de l'inhibition de la sécrétion glucagon (49-51). Les cellules  $\beta$  expriment principalement SSTR5 et SSTR3 chez les rongeurs et SSTR2, SSTR3, SSTR5 chez l'humain (52-54). Toutefois, le rôle joué par ces différents récepteurs est méconnu : l'absence chez la souris de SSTR2 n'a pas d'impact sur la SISG et l'utilisation d'un agoniste spécifique à ce récepteur est sans effet sur des îlots isolés. La délétion de SSTR5 abolit l'effet de la SST-28 mais pas celui de la SST-14 sur la sécrétion d'insuline (49-51). Dans les cellules  $\beta$  de souris, le récepteur SSTR3 semble être exprimé presque exclusivement dans le cil primaire (55), une structure ubiquitaire des cellules de mammifères. Cette structure joue un rôle important dans la SISG et semble particulièrement nécessaire à l'action inhibitrice de la SST sur la sécrétion d'insuline (56). Dans des îlots isolés d'humain, des agonistes spécifiques de SSTR2 et SSTR3 sont plus efficaces pour inhiber la SISG que ceux pour SSTR1, SSTR4 ou SSTR5 (54, 57). Ces résultats suggèrent que SSTR3 jouent un rôle important dans

le contrôle de la sécrétion d'insuline par les cellules  $\delta$  chez la souris, comparativement à SSTR2 et 3 chez l'humain. Pour tous les sous-types de récepteurs, la liaison de la SST va inhiber l'activité de l'adénylate cyclase, diminuant ainsi l'AMPc cytoplasmique. Cela va entraîner la fermeture des canaux calciques dépendant du voltage (CCDV) et activer les canaux  $K^+$  rectificateurs de courant entrant activés par les protéines G (GIRK), résultant en une repolarisation de la membrane et l'inhibition des potentiels d'action et de l'exocytose dépendante du  $Ca^{2+}$  (58, 59).



**Figure 4. – La signalisation de la SST dans les îlots de Langerhans.** (a) La SST libérée par les cellules  $\delta$  active SSTR2 et SSTR3 dans les cellules  $\beta$  (1) et  $\alpha$  (2) adjacentes. De plus, une boucle de rétroaction négative fait que la cellule  $\delta$  inhibe sa propre activité par les récepteurs SSTR1 et SSTR3 (3). (b) Dans les cellules  $\alpha$  et  $\beta$ , l'activation des SSTR va 1) inhiber l'activité de l'adénylate cyclase et diminuer l'AMPc cytoplasmique et l'exocytose des vésicules; 2) inhiber l'ouverture des canaux  $Ca^{2+}$  voltages dépendants; 3) inhiber les canaux GIRK, repolarisant ainsi la membrane; et 4) inhiber directement l'exocytose, possiblement en activant la calcineurine. Extrait de Rorsman et al. (60)

#### *1.1.2.4 Les cellules productrices du polypeptide pancréatique (PP)*

Représentant une petite proportion des cellules du pancréas endocrine, elles sont principalement concentrées dans une petite région à la tête du pancréas (61).

Petite protéine de 36 acides aminés, le PP est libéré à la suite d'un repas riche en protéines et en gras (62). Le glucose stimule la libération de PP, qui est un inhibiteur de la sécrétion de glucagon, en liant le récepteur PPYR1 exprimé par les cellules  $\alpha$  des îlots de souris et d'humains (63). Dans des îlots isolés humains, le PP augmente la sécrétion d'insuline en réponse au glucose et inhibe la relâche de SST en liant le récepteur PPYR1 des cellules  $\delta$  (64). Les connaissances sur le sujet sont limitées, mais la libération de PP à la suite d'un repas, semble jouer un rôle dans la régulation de la sécrétion d'hormones dans les îlots.

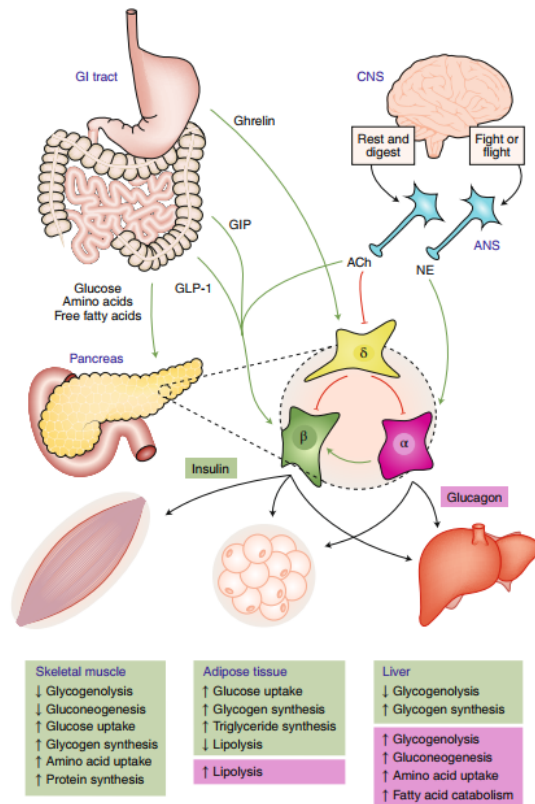
#### *1.1.2.5 Les cellules $\epsilon$ sécrétrices de ghréline*

Les cellules  $\epsilon$  sont les dernières cellules endocrines des îlots à avoir été découvertes. La ghréline est plus couramment reconnue pour être l'hormone de la faim, produite par l'estomac et qui stimule l'appétit (65). Cette population de cellules est petite, comptant pour 1 % des cellules des îlots chez l'adulte (66).

La ghréline se retrouve sous forme acylée ou non-acylée. L'acylation est nécessaire pour lier le récepteur GHS-R1a. Ce dernier est exprimé dans la plupart des cellules  $\alpha$  et certaines cellules  $\beta$  de rats. Le rôle de la ghréline dans la régulation de la fonction des îlots est complexe. L'administration de ghréline diminue la quantité d'insuline dans le sang et augmente la glycémie (67), possiblement en activant le récepteur à ghréline sur les cellules  $\delta$  (68). L'activation de GHS-R, un RCPG, diminue la concentration d'AMPc dans la cellule  $\beta$ , supprimant ainsi l'influx de  $\text{Ca}^{2+}$  et la sécrétion d'insuline (69). Mais l'effet principal de la ghréline passe par l'activation de GHS-R sur les cellules  $\delta$ , entraînant une augmentation du calcium intracellulaire et causant la relâche de SST qui va inhiber la sécrétion d'insuline (52, 68). De plus, la ghréline semble aussi stimuler la prolifération et diminuer l'apoptose des cellules  $\beta$ , et jouerait éventuellement un rôle important dans la fonction des îlots (70).



Les îlots sont des organes à l'architecture complexe, où au moins 5 types différents de cellules endocrines interagissent pour maintenir l'homéostasie du glucose. La composition de l'îlot, la répartition des cellules au sein de l'îlot et même la localisation de l'îlot dans le pancréas sont autant de facteurs qui influencent leur fonction. Étant donné sa vascularisation, le pancréas endocrine est un senseur de l'état nutritionnel du corps et de nombreux facteurs modulent sa fonction.



**Figure 5. – Les échanges entre les différents organes régulent le contrôle des îlots pancréatiques sur le métabolisme.** Le tractus intestinal envoie des signaux qui se combinent avec ceux envoyés par le système nerveux autonome pour moduler la sécrétion d'insuline et de glucagon par les îlots. Les variations de glycémie sont perçues par les cellules  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\delta$  qui, en réponse, vont restaurer l'homéostasie du glucose sanguin. Extrait de Noguchi et al. (17)

## 1.2 Les nutriments régulent la fonction des îlots

### 1.2.1 Le glucose, principal modulateur de la fonction des îlots

Le glucose est le principal déclencheur de la sécrétion d'hormones par les îlots. Les cellules  $\beta$  perçoivent les variations de glucose dans leur environnement via des transporteurs du glucose (GLUT1 chez l'humain et GLUT2 chez la souris) et sécrètent l'insuline lorsque la glycémie dépasse 5 mM chez l'homme et 7 mM chez la souris (71). Dans la cellule  $\beta$ , le glucose est phosphorylé par la glucokinase, puis métabolisé, augmentant ainsi la quantité d'ATP dans la cellule et entraînant la fermeture de canaux  $K^+_{ATP}$  dépendant. S'en suivent une dépolarisation de la cellule et l'ouverture des CCDV. L'influx de  $Ca^{2+}$  dans la cellule entraîne la fusion des vésicules contenant l'insuline avec la membrane et mène à la sécrétion d'insuline (72). Cette chaîne d'événements est cyclique et résulte en une oscillation du potentiel de membrane, du  $Ca^{2+}$  cytosolique et de la sécrétion d'insuline en réponse au glucose. La présence de jonctions serrées GAP formées de connexin36 entre les cellules  $\beta$  assure une réponse concertée (73). Le glucagon sécrété par les cellules  $\alpha$  est la principale hormone corrigeant une hypoglycémie. Les différentes cellules endocrines du pancréas proviennent des mêmes progéniteurs, il est donc attendu que la machinerie interne des cellules  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\delta$  soient similaires (74). De fait, les cellules  $\alpha$  expriment les mêmes canaux  $K^+_{ATP}$  dépendants que les cellules  $\beta$  ou  $\delta$ , et la sécrétion de glucagon dépend aussi de l'ouverture des canaux CCDV similairement à celle d'insuline. Cependant, contrairement aux cellules  $\beta$ , les cellules  $\alpha$  sécrètent dans des conditions de bas glucose. En l'absence de glucose, les niveaux d'ATP intracellulaires sont faibles, les canaux  $K^+_{ATP}$  sont fermés, ce qui entraîne l'ouverture des canaux CCDV de type L et P/Q, permet l'influx de  $Ca^{2+}$  et cause la dépolarisation des cellules permettant l'exocytose des vésicules contenant le glucagon. La cellule  $\alpha$  est alors électriquement active. Le glucose, une fois dans la cellule, est métabolisé, ce qui augmente les niveaux d'ATP dans la cellule, entraînant l'ouverture des canaux  $K^+_{ATP}$ . Le potentiel membranaire ne permettra plus l'ouverture des canaux CCDV de type P/Q et la sécrétion de glucagon cessera (75). Il est suggéré que, dans des conditions de bas glucose, l'inhibition de la sécrétion de glucagon

nécessite la SST, tandis que ce n'est plus le cas en haut glucose (76). Chez l'humain, la sécrétion de SST partage des caractéristiques de la sécrétion d'insuline. Les cellules  $\delta$  expriment les transporteurs à haute affinité GLUT1 et GLUT3. La glycolyse, par la glucokinase, augmente le ratio ATP/ADP intracellulaire et entraîne la fermeture des canaux  $K^+_{ATP}$  dépendant, similairement aux cellules  $\beta$ . La dépolarisation de la cellule est toujours requise, cependant, la relâche de calcium stimulé par le calcium joue un plus grand rôle dans la sécrétion de SST stimulé par le glucose (SSSG) que dans la SISG. La sécrétion de SST par la cellule  $\delta$  commence à 3mM de glucose et augmente en parallèle de la sécrétion d'insuline. Il a aussi été suggéré que les cellules  $\beta$  et  $\delta$  seraient couplées électriquement (77).

### **1.2.2 Les incrétines**

Le terme incrétine illustre l'effet des hormones gastro-intestinales responsables d'une sécrétion d'insuline supérieure lorsque le glucose est administré par voie orale par rapport à la voie parentérale (78). Les deux incrétines principales sont le GLP-1 et le polypeptide insulino-tropique dépendant du glucose (GIP), qui potentialisent l'effet du glucose sur la sécrétion d'hormones pancréatiques. Le GIP est un peptide sécrété par les cellules K de la partie supérieure de l'intestin (79) suite à un repas. Son administration stimule directement la sécrétion d'insuline par les cellules  $\beta$  en réponse au glucose, en liant son récepteur spécifique, un RCPG, et stimulant la synthèse d'AMPc dans la cellule (80). GLP-1 est produit par les cellules L dans l'intestin inférieur et le colon. Dans des îlots isolés, il agit directement sur la sécrétion d'insuline par les cellules  $\beta$  en se liant à son récepteur, le GLP-1R (81), un RCPG qui stimule aussi la synthèse d'AMPc.

### **1.2.3 Les acides gras comme sécrétagogues**

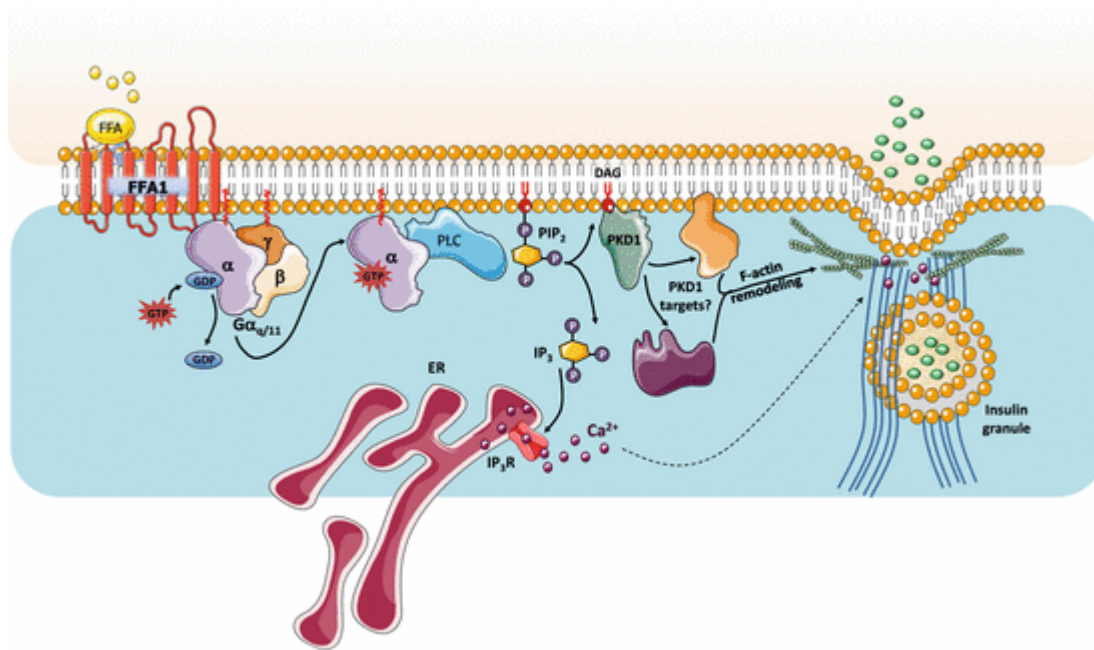
L'insuline joue un rôle central dans le métabolisme des lipides en inhibant la lipolyse, ainsi qu'en stimulant l'entrée du glucose dans les adipocytes et son stockage sous forme d'acides gras puis de triglycérides (82). Il est donc attendu que les cellules  $\beta$  soient sensibles aux acides gras en circulation. Dans ce sens, il a été montré que certains acides gras ont un rôle direct sur la fonction du pancréas endocrine en se liant à des récepteurs membranaires. Les RCPG ont été impliqués dans différentes pathologies et représentent des cibles thérapeutiques intéressantes. De ces RCPG, 4 sont activés par les acides gras et sont classés selon la longueur de la chaîne de leurs

ligands. Les acides gras à courtes chaînes (moins de 6 carbones) activent GPR41 et GPR43, tandis que GPR40 et GPR120 sont des récepteurs à acides gras à chaîne longue (12 et plus carbones) et moyenne (6-12 carbones). Les acides gras à courtes chaînes sont le produit de la fermentation des fibres alimentaires dans les intestins (83), contrairement aux acides gras à chaînes moyennes et longues qui proviennent des triglycérides dérivés des graisses animales ou végétales (84). Ces récepteurs sont impliqués dans l'homéostasie du glucose, en facilitant la sécrétion d'insuline et d'incrétine ainsi qu'en ayant une action anti-inflammatoire (85).

#### 1.2.3.1 GPR40/FFAR1

GPR40 est probablement le récepteur à acides gras le mieux caractérisé. Membre de la famille des RCPG il lie les acides gras saturés et insaturés (86). Exprimé fortement dans les cellules  $\beta$  des îlots humains et murins, son rôle dans la régulation de la sécrétion d'insuline a été bien caractérisée depuis sa découverte. Le récepteur GPR40 est couplé à une protéine  $G_q$ , et à la suite de la liaison avec son ligand, l'activation successive de  $G_q$  et de la PLC mène à l'hydrolyse du phosphatidylinositol 4,5 — biphosphate ( $PIP_2$ ) en diacylglycérol (DAG) et inositol triphosphate ( $IP_3$ ). Par la suite, une protéine kinase C dépendante du DAG, PKD1, est responsable du remodelage du cytosquelette et de la potentialisation de la seconde phase de sécrétion de l'insuline (87). L' $IP_3$  déclenche une augmentation du  $Ca^{2+}$  intracellulaire. Cette augmentation est importante pour la potentialisation de la sécrétion d'insuline (88, 89). En plus d'être couplé à une protéine G, GPR40 signale via les protéines adaptatrices  $\beta$ -arrestine 1 et 2. En utilisant une protéine GPR40 émettant de la bioluminescence à la suite de la fixation d'un ligand, et l'agoniste biaisé en faveur de la signalisation  $\beta$ -arrestine TAK-875 (90), il a été démontré que la signalisation GPR40 via la  $\beta$ -arrestine joue un rôle important dans la potentialisation de la sécrétion d'insuline en réponse au glucose par les acides gras. L'activation aiguë de GPR40 dans les cellules  $\beta$  stimule la sécrétion d'insuline en réponse au glucose. Dans les cellules insulino-sécrétrices MIN6, l'activation de GPR40 stimule la SISG (86) et l'augmentation de  $Ca^{2+}$  en réponse à l'oléate (un agoniste de GPR40) des cellules  $\beta$  isolées de rats est fortement altérée si l'expression de GPR40 est diminuée (91). Ailleurs, GPR40 est exprimé par les cellules entéroendocrines L, K et I, où son activation stimule la sécrétion d'incrétines. Les cellules L et K sécrètent respectivement le GLP-1

et le GIP (92). GPR40 est aussi exprimé dans plusieurs régions du système nerveux, chez l'humain et la souris, où il a été impliqué dans l'appréciation du goût des acides gras (93).



**Figure 6. – La voie de signalisation de GPR40 dans la cellule  $\beta$ . Les acides gras libres potentialisent la sécrétion d'insuline via GPR40.** L'activation de la protéine  $G_q$  mène à la dissociation de la sous-unité  $\beta/\gamma$ . La sous-unité  $\alpha$ , en activant PLC, clive le phosphatidylinositol-4, 5-bisphosphate ( $PIP_2$ ) en inositol-1, 4, 5 — triphosphate ( $IP_3$ ) et diacylglycerol (DAG). DAG active la protéine kinase C PKD1 qui va phosphoryler et activer des effecteurs impliqués dans le remodelage des filaments d'actine. L'augmentation de  $Ca^{2+}$  causée par l' $IP_3$  est importante pour la potentialisation de la sécrétion d'insuline. Extrait de Mancini et al. (94)

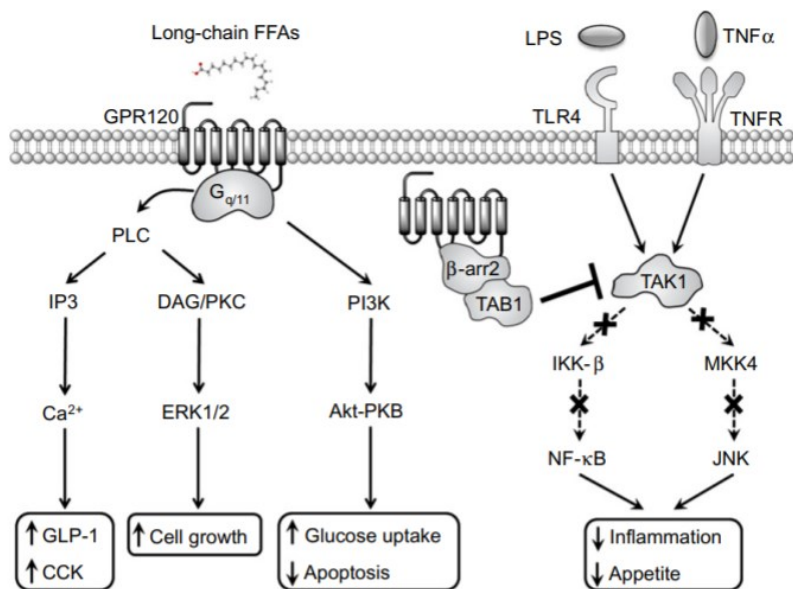
#### 1.2.3.2 GPR120/FFAR4

Le récepteur GPR120 est un membre de la famille A des RCPG. C'est un récepteur aux acides gras saturés (avec des chaînes de 14 à 18 carbones) et non-saturés (chaînes de 16 à 22 carbones), plus particulièrement les  $\omega$ -3 comme l'acide  $\alpha$ -linoléique (ALA) (95). Chez l'humain et la souris, en étudiant l'expression par ARNm du gène, il a été montré que le récepteur est principalement exprimé dans le tube digestif et les poumons (95). Dans le tube digestif, on le retrouve dans les cellules entéroendocrines et la présence du récepteur a été confirmée dans les tissus adipeux, par RT-PCR dans le gras sous-cutané, périrénal, mésentérique et épидidymal (96). De plus, les

macrophages des tissus adipeux au profil pro-inflammatoire expriment aussi abondamment GPR120 (97). Il est intéressant de noter que contrairement à GPR40, GPR120 est exprimé dans les récepteurs gustatifs, et joue un rôle dans le goût envers certains acides gras comme l'ALA et l'acide oléique (93). GPR120 est exprimé dans les îlots de Langerhans, mais dans quelles cellules ? Ce n'est pas clair. La protéine semble principalement être exprimée par les cellules  $\delta$  avec une plus faible expression dans les cellules  $\alpha$  (50 % des niveaux d'expression de la cellule  $\delta$ ) et  $\beta$  (13 %). En revanche, le marquage immunohistochimique réalisé par Stone, Dhayal et al. en utilisant des souris sans GPR120, localise GPR120 uniquement dans les cellules  $\delta$  (68, 98). Le gène de GPR120 code pour une protéine de 1134 acides nucléiques qui produira 2 isoformes de la protéine par épissage alternatif de l'exon 3. Une isoforme longue (GPR120-L) constituée de 377 acides aminés, et la courte de 361 acides aminés (GPR120-S) (99). Bien que les séquences du gène soient semblables à 85 % entre la souris et l'humain, seul ces derniers produisent l'isoforme longue.

La signalisation GPR120 passe principalement par le couplage avec une protéine  $G_{q/11}$  et l'augmentation du calcium cytoplasmique. Il a d'abord été montré que l'activation de GPR120 dans des cellules HEK293 causait une augmentation dose-dépendante du calcium cytoplasmique (95). L'étude de lignées cellulaires de cellules entéroendocrines, d'adipocytes et de macrophages stimulées par des ligands naturels ou synthétiques de GPR120 a donné les mêmes résultats (95, 97). D'autres mécanismes sont présents dans d'autres lignées cellulaires : GPR120 a été associé à une protéine  $G_s$  dans la sécrétion de GLP-2 par les cellules L entéroendocrines ainsi que dans les cils primaires de préadipocytes, et à  $G_{i/o}$  dans les cellules delta du pancréas de souris ainsi que les cellules entéroendocrines productrices de ghréline (98, 100-102). Dans des adipocytes, l'activation du récepteur, signalant par la voie  $G_{q/11}$ ,  $PI_3K$  et AKT mènent à la translocation de GLUT4 à la membrane plasmique, augmentant l'influx de glucose dans la cellule. En parallèle de l'augmentation du  $Ca^{2+}$  cytoplasmique, GPR120 active aussi la voie de signalisation de la protéine kinase activée par mitogène (MAPK). L'augmentation de la phosphorylation des kinases régulées par les signaux extracellulaires (ERK), suite à l'activation de GPR120 par son ligand, est observée dans de nombreuses lignées cellulaires (97, 103). La phosphorylation des deux isoformes du récepteur permet le recrutement de protéines adaptatrices, notamment la  $\beta$ -arrestine 2. Classiquement, ce processus a pour conséquence l'internalisation et donc la désensibilisation du

récepteur (104). Oh et al. ont cependant montré un rôle anti-inflammatoire de GPR120 dans les macrophages, par l'interaction avec la  $\beta$ -arrestine 2. Les facteurs pro-inflammatoires, entre autres les lipopolysaccharides (LPS) et TNF- $\alpha$  lient à la membrane de la cellule les récepteurs de type Toll-4 (TLR-4) et le récepteur de TNF- $\alpha$ . Ces liaisons vont mener à des interactions avec la kinase activée par le facteur de croissance transformant  $\beta$  (TAK1) et la protéine liant la kinase activée par le facteur de croissance transformant  $\beta$  1 (TAB1) pour activer les facteurs nucléaires NF-KB et JNK, ce qui va démarrer la cascade pro-inflammatoire. GPR120 activé et lié à la  $\beta$ -arrestine 2 est internalisé et lie TAB1, bloquant sa liaison avec TAK1 et l'inflammation (97).



**Figure 7. – Les mécanismes moléculaires associés à GPR120 et les fonctions physiologiques qui y sont reliées.** Activé par des acides gras à longues chaînes (FFA), GPR120 est impliqué dans la régulation de la sécrétion de peptides par les intestins, a un rôle anti-inflammatoire, anti-apoptotique, en plus d'être impliqué dans l'homéostasie énergétique. Extrait de Mo et al. (105)

La localisation cellulaire au sein des îlots de GPR120 est méconnue. D'abord, le GLP-1 produit par les cellules entéroendocrines à la suite de l'activation du GPR120, stimule la sécrétion d'insuline et la prolifération des cellules  $\beta$  (106, 107). Chez des souris n'exprimant pas GPR120, il y a une altération de la sécrétion de glucagon par les cellules  $\alpha$  en réponse aux acides gras (108). De

concert avec GPR40, l'activation de GPR120 par des acides gras à longue chaîne améliore la SISG (109, 110). En utilisant un bi-agoniste pour GPR40 et GPR120, Metabolex-36, sur une lignée de souris KO pour GPR40 et GPR120, il a été montré que l'activation de ce dernier dans les îlots inhibait la sécrétion de SST en réponse au glucose. Pourtant, l'utilisation d'un agoniste endogène, le DHA, n'a pas eu d'effets sur la sécrétion de SST, bien que le DHA ait potentialisé la sécrétion d'insuline en activant GPR120 (98). Ces études montrent un rôle important de GPR120 dans la régulation et la sécrétion d'hormones glucorégulatrices en réponse au glucose et aux acides gras. Il reste toutefois à déterminer dans quelle mesure cette action est directe sur les cellules  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\delta$ , ou secondaire à une diminution de la sécrétion de SST par la cellule  $\delta$ .



### **1.3 Le diabète sucré, une pathologie des îlots pancréatiques**

Le diabète est caractérisé par une hyperglycémie chronique due à une altération de la fonction des îlots et une résistance des tissus périphériques à l'action de l'insuline. Les conséquences pour les individus atteints sont lourdes, avec une augmentation de la mortalité et de la morbidité. Cette pathologie connaît une progression fulgurante partout sur la planète : plus de 400 millions de personnes vivent avec la maladie aujourd'hui comparativement à 180 millions en 1980. La prévalence de la maladie a doublé chez les hommes pendant cette période et augmenté de 60 % pour les femmes, atteignant respectivement 10 % et 8.8 % de la population (111). Au Canada, un diagnostic de diabète peut être posé sous plusieurs conditions : lorsqu'une glycémie à jeun de plus de 7.0 mM est observée ; un pourcentage d'hémoglobine glyquée (A1C) supérieur à 6.5 % chez l'adulte, une glycémie à 2h lors d'un test de tolérance à 75 g de glucose supérieur à 11.1 mM ou une glycémie prise aléatoirement dépassant 11.1 mM (112).

La majorité des cas de diabètes peuvent être classifiés en 2 catégories : le diabète de type 1 (DT1) et le diabète de type 2 (DT2). On reconnaît aussi le diabète gestationnel lorsqu'une intolérance au glucose est observée durant la grossesse, et les formes monogéniques du diabète autrefois désignées diabète non insulino-dépendant chez les jeunes (MODY). Le DT1 regroupe les cas de diabètes caractérisés par la destruction des cellules  $\beta$ , laquelle va entraîner un manque d'insuline. L'atteinte peut être auto-immune ou d'origine inconnue. Les DT2 englobent 90 % des cas de diabètes, ils sont caractérisés par une combinaison de résistance à l'insuline (Rés.I) et une altération de la fonction sécrétoire des îlots.

#### **1.3.1 Le diabète de type I**

De tous les individus atteints de diabètes, 10 à 15 % ont le DT1. C'est le diabète le plus couramment diagnostiqué chez les enfants. On y fait même référence sous le nom de diabète juvénile. C'est une maladie auto-immune chronique, durant laquelle on observe chez la majorité des patients une diminution du nombre de cellules  $\beta$ . Nonobstant, un faible pourcentage des cas, moins de 10 %, ne présentent pas de signes d'auto-immunité (113). La détection d'anticorps contre l'insuline et les îlots sont des indicateurs précoces du développement de la maladie (114). Les facteurs génétiques sont importants. Le risque de développer la maladie est plus élevé chez

des personnes avec un proche atteint de la maladie : 6 % chez les enfants, 5 % chez les frères et sœurs et 50 % chez les jumeaux monozygotes, comparativement à une prévalence de 0,4 % dans la population (115). L'environnement joue une part importante dans le développement de la maladie : une étude longitudinale sur des jumeaux monozygotes discordant pour le DT1 montre qu'à 60 ans, 65 % des jumeaux originellement discordants ont reçu un diagnostic de DT1, mais ce chiffre n'atteint jamais 100 % (116). Ces facteurs environnementaux comprennent les infections virales, les toxines, et de façon plus controversée certains nutriments. Le système immunitaire peut déclencher une réponse auto-immune par mimétisme moléculaire, en dirigeant la réponse contre des antigènes du soi ressemblant aux antigènes viraux, ce qui va entraîner la destruction des cellules (117). L'interaction de cellules T et B peut mener à la formation d'antigènes ciblant les îlots. Cependant, l'élément déclencheur de cette interaction est méconnu. L'exposition à une infection virale, comme la rubéole, durant le développement foetal augmente la probabilité de développer plusieurs maladies auto-immunes, dont le DT1 (118). Les symptômes classiques de l'hyperglycémie apparaîtront rapidement après le déclenchement de la maladie : polyurie, polydipsie, perte de poids et acido-cétose. La présence d'une forte hyperglycémie ou un test d'hyperglycémie provoqué permet de confirmer le diagnostic (112). Ce diagnostic est important, car les conséquences à long terme sont graves. On distingue, d'un côté, les complications microvasculaires incluant les néphropathies, neuropathies et rétinopathies, et de l'autre, les complications macro-vasculaires avec une plus haute incidence de maladies cardiovasculaires (119). Jusqu'en 1922, et le début de la thérapie par l'insuline, le DT1 était une maladie mortelle. Ce n'est plus le cas, de nos jours, les patients décèdent plutôt de maladies chroniques et particulièrement de maladies cardiovasculaires (120).

### **1.3.2 Le diabète gestationnel**

Au début de la grossesse, la sensibilité à l'insuline augmente pour préparer le corps à la demande énergétique accrue. Durant la grossesse, une augmentation des concentrations d'œstrogène, de progestérone, de leptine, de cortisol et d'hormones de croissance, produites localement et par le placenta, favorise la Rés.I (121). Pour compenser, des modèles animaux suggèrent qu'une hypertrophie des cellules  $\beta$  a lieu, ainsi qu'une plus forte sécrétion d'insuline en réponse au glucose (122). Dans ce cadre, le diabète gestationnel se définit par une hyperglycémie qui se

développe chez la femme enceinte et se normalise après l'accouchement. Cette définition large englobe les hyperglycémies allant d'une légère intolérance au glucose à une perturbation de la glycémie à jeun (123). Bien que transitoire, cette pathologie augmente le risque de complication pour la mère et le nouveau-né, et représente un facteur de risque de développer ultérieurement un diabète, de l'obésité et des maladies cardiovasculaires (124-126). Selon les critères diagnostiques utilisés, au Canada, en 2016, 4 à 7 % des femmes enceintes recevaient un diagnostic de diabète gestationnel (127).

### **1.3.3 Le diabète non insulindépendant chez les jeunes (MODY)**

Ces formes autosomales dominantes du diabète, qui se manifestent avant 25 ans sans auto-immunité, résultent de mutations hétérozygotes dans des facteurs de transcriptions impliqués dans le développement et la maturation des cellules  $\beta$ , ainsi que dans des enzymes responsables de la détection du glucose (128, 129). Les MODY sont des causes rares de diabète, responsables d'1 % des cas, dont l'étiologie est particulière car on n'y associe pas de Rés.I (130). Les MODY sont souvent confondues avec d'autres formes de diabètes, 80 % des patients atteints ayant reçu un diagnostic de DT1 ou DT2 au préalable (131)

### **1.3.4 Le diabète de type 2**

Le diabète de type 2 est la forme la plus courante de diabète, regroupant 90 % des cas de la maladie. Il se caractérise par une diminution progressive de la fonction des cellules  $\beta$ , le plus souvent en réponse à une insulino-résistance dans les tissus adipeux, les muscles squelettiques et le foie (132-134). L'obésité et la Rés.I sont deux facteurs de risque importants pour le DT2. En situation normale, les cellules  $\beta$  peuvent adapter leur production d'insuline pour maintenir un contrôle de la glycémie chez les personnes obèses (135). Chez ces personnes, les cellules  $\beta$  vont augmenter leur nombre et la quantité d'insuline sécrétée individuellement par chaque cellule, ce qui permet de contrer la Rés.I. Si cette adaptation échoue, l'hyperglycémie apparaît (136, 137). Dans cette situation, on observe une diminution du nombre de cellules  $\beta$  de l'ordre de 24 % à 65 %, probablement dû à de l'apoptose (138) En parallèle, la fonction des cellules  $\beta$  est aussi affectée, avec une diminution de la sécrétion d'insuline (138).

#### 1.3.4.1 La résistance à l'insuline

La Rés.I est un état dans lequel l'insuline normalement produite en réponse à un stimulus ne suffit pas à diminuer l'hyperglycémie et à augmenter l'absorption du glucose par les tissus. S'en suit une hyperinsulinémie pour contrer l'hyperglycémie. La Rés.I découle d'une perturbation de la signalisation du récepteur de l'insuline. Dans les muscles, elle se manifeste par la diminution de l'entrée de glucose et de la synthèse de glycogène (133). Dans le foie, la Rés.I cause une perte de l'effet de l'insuline sur la gluconéogenèse (139). Finalement, dans les tissus adipeux, elle se manifeste par une diminution de la captation de glucose par les adipocytes et une altération de l'inhibition de la lipolyse. Les causes de la résistance sont multiples : un excès de tissu adipeux affecte la sensibilité à l'insuline via la sécrétion de cytokines comme le TNF- $\alpha$  et l'interleukin-6 (IL-6); l'augmentation de ces facteurs dans le sang peut causer une résistance hépatique et périphérique (140). L'inflammation, l'hyperglycémie et la lipotoxicité agissent alors sur la signalisation par le récepteur de l'insuline en activant des Ser/Thr kinases et inhibant l'autophosphorylation secondaire à la liaison de son ligand (141).

#### 1.3.4.2 La glucolipotoxicité

Quand la Rés.I s'installe, une augmentation aiguë de la concentration d'acides gras augmente la masse des cellules  $\beta$  et la sécrétion d'insuline pour compenser la perte de sensibilité (142). Une trop grande concentration d'acides gras, le plus souvent palmitate, dans des îlots isolés de souris augmente l'apoptose des cellules. Il est toutefois plus difficile d'évaluer *in vivo* quelle concentration d'acides gras est perçue par les îlots, ceux-ci pouvant se lier à l'albumine. La fraction libre d'acides gras dans l'espace entourant les îlots est inconnue (143). Une infusion de triglycéride et acides gras à des concentrations normales de glucose n'affecte que peu la fonction des cellules  $\beta$  et ne se révèle pas toxique (144, 145). Les acides gras seuls ne semblent donc pas avoir d'effet toxique sur les cellules  $\beta$  lorsqu'il n'y a pas d'hyperglycémie. En revanche, lorsque l'on additionne l'effet combiné de l'hyperglycémie et de la dyslipidémie, un effet toxique synergique est mis à jour. Le glucose inhibe l'oxydation des graisses et promeut la lipogenèse ; lorsque les niveaux intracellulaires d'acides gras et de glucose sont élevés en même temps, différentes voies de signalisations, par exemple le métabolisme des mitochondries, sont affectées dans la cellule  $\beta$  (146). *In vivo* chez le rat, une infusion de glucose et de lipide pendant 72h

provoque une Rés.I et une altération de la fonction des cellules  $\beta$ , un effet cependant dépendant de l'âge (147). Chez l'humain, une augmentation des acides gras en circulation abolit l'effet d'une hyperglycémie sur la sécrétion d'insuline et la fonction des îlots chez des patients obèses (148, 149). Ces études indiquent un rôle synergique délétère des concentrations d'acides gras et de glucose élevées dans la fonction des cellules  $\beta$ .

#### 1.3.4.3 L'altération des cellules $\beta$

L'altération du contrôle de la glycémie dans le DT2 est causée, en partie par une altération de la masse fonctionnelle des cellules  $\beta$ . En effet, une perte du nombre de cellules  $\beta$  de l'ordre de 24 % à 65 % est observée chez les patients atteints de DT2 (138), vraisemblablement causée par une augmentation de l'apoptose (150). Cette apoptose peut être causée par un stress oxydatif secondaire à la glucotoxicité et la création de réactifs oxygénés (151). L'observation d'un plus grand nombre de dépôts amyloïdes dans les îlots est aussi reliée à un plus faible nombre de cellules  $\beta$  chez des patients atteints de DT2 (152). Le nombre de cellules  $\beta$  est diminué et la capacité à sécréter de l'insuline de celles restantes est altérée. Plus précisément, la première phase de sécrétion de l'insuline est perdue et la synchronisation de l'activité électrique des cellules  $\beta$  est perturbée (153, 154). Le changement d'identité des cellules  $\beta$  peut, en partie, expliquer ces phénomènes par un mécanisme de dédifférenciation (155). Dans des cellules  $\beta$  exposées à une forte concentration de glucose, une diminution de l'expression de gènes impliqués dans la fonction des cellules  $\beta$  comme *Ins* et *Foxo1* est observée (156). Cette dédifférenciation est aussi visible par une diminution de l'expression de facteurs de transcription clefs à l'identité de la cellule  $\beta$  comme *Nkx 6.1* et *MafA*, et la réexpression de facteurs de transcription caractéristiques des cellules progénitrices, soient *Oct4* et *Ngn3* (157). Ces cellules dédifférenciées ne participent plus au contrôle métabolique, et un marquage immunologique par l'insuline ne permet plus de les détecter, ce qui peut expliquer l'apparente diminution de la masse de cellules  $\beta$ . La réduction de la quantité de cellules  $\beta$ , ainsi que la diminution de la capacité sécrétoire des îlots sont donc des facteurs importants dans l'apparition du DT2.

#### 1.3.4.4 Perturbations des interactions paracrines dans l'îlot

Un équilibre entre les quantités d'insuline et de glucagon sécrétées est primordial pour maintenir l'euglycémie. Chez les patients atteints de DT2, les différents stimuli qui régulent la production finale de l'îlot sont perturbés. À la défaillance des cellules  $\beta$  s'ajoute une altération de la fonction des cellules  $\alpha$ . En effet, des concentrations plus élevées de glucagon sont retrouvées dans le sang comparativement à des sujets sains, associées à une perte de la sécrétion des cellules  $\alpha$  en réponse au glucose ainsi qu'une hyperglucagonémie anormale à la suite d'un repas (158). Comme le glucagon est responsable de 40-50 % de la libération de glucose par le foie, un défaut de ce mécanisme régulateur amplifie l'hyperglycémie (159). L'effet du DT2 sur la fonction des cellules  $\delta$  est encore méconnu. La masse de cellules  $\delta$  ne semble pas être diminuée chez les personnes atteintes de DT2, mais est diminuée chez des babouins avec une hyperglycémie (160-162). Dans cette dernière étude, la perte de masse des cellules  $\delta$  est attribuée à une augmentation de l'apoptose. Cependant, la sécrétion de SST par les îlots est difficile à mesurer *in vivo*, la veine pancréatique étant le seul endroit où une augmentation de la SST-14 peut être détectée en réponse au glucose (163)

# Chapitre 2 — Étude de la fonction du récepteur aux acides gras GPR120/FFAR4 dans la régulation de l'homéostasie du glucose

## 2.1 Mise en contexte de la thèse

### 2.1.1 Problématique

Environ un tiers des médicaments approuvés par l'agence de régulation américaine FDA cible des RCPG (164). GPR40 est impliqué positivement dans l'homéostasie du glucose. Un agoniste spécifique de ce récepteur, TAK-875, a déjà fait l'objet d'études cliniques de phase III chez des patients atteints de DT2 (165) mais l'essai a dû être interrompu à cause d'une toxicité hépatique. GPR120 est un autre récepteur aux acides gras à longues et moyennes chaînes, moins bien caractérisé que GPR40, qui est considéré comme une cible thérapeutique potentielle pour le DT2. GPR120 partage plusieurs ligands avec GPR40 et de nombreuses études dans des modèles animaux ont montré une augmentation de la sécrétion d'insuline ainsi que de la sensibilité à l'insuline à la suite de l'activation de GPR120. Cependant, le rôle de GPR120 dans la sécrétion d'hormones glucorégulatrices par les îlots est controversé, et son étude est complexifiée par l'existence de réseaux d'interactions paracrines et endocrines. L'activation de GPR120 dans les îlots potentialise les sécrétions d'insuline et de glucagon. GPR120 est présent dans les cellules principales des îlots ( $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\delta$ ), mais est exprimé de manière prédominante dans les cellules  $\delta$ . L'activation de GPR120 potentialisant la sécrétion d'insuline et de glucagon, et inhibant la relâche de SST, la question est de savoir si l'activation de GPR120 dans les îlots de Langerhans stimule la sécrétion de glucagon et d'insuline en inhibant la sécrétion de SST par les cellules  $\delta$ . GPR120 et GPR40 ont tous deux une action positive sur l'homéostasie du glucose, partagent plusieurs ligands et ont un profil d'expression différent, il se pourrait donc que ces deux récepteurs aient une action complémentaire. Décrypter le rôle spécifique de GPR120 et son interaction avec GPR40 dans le contrôle de l'homéostasie du glucose et la fonction des cellules  $\beta$  permettra d'améliorer significativement notre compréhension des mécanismes contrôlant la sécrétion d'hormones glucorégulatrices et potentiellement de découvrir de nouvelles cibles thérapeutiques pour le DT2.

## **2.1.2 Hypothèse et objectif du mémoire**

### 2.1.2.1 Hypothèse

Nous avons émis l'hypothèse que la signalisation GPR120 dans les cellules  $\delta$  des îlots pancréatiques de souris inhibe la sécrétion de SST, levant ainsi le frein sur la sécrétion d'insuline et de glucagon respectivement par les cellules  $\beta$  et  $\alpha$ , et favorisant ainsi la prolifération des cellules  $\beta$ . *In vivo*, GPR120 aurait une action complémentaire synergique à GPR40 dans le contrôle de l'homéostasie du glucose.

### 2.1.2.2 Objectifs

L'objectif de ce projet de recherche était de définir la fonction de GPR120 dans l'homéostasie du glucose. Pour cela nous avons étudié 1) le rôle précis de GPR120 dans la prolifération des cellules  $\beta$  et la sécrétion d'hormones glucorégulatrices par les îlots *ex vivo* et 2) les rôles complémentaires de GPR120 et GPR40 dans la régulation de l'homéostasie du glucose *in vivo* chez la souris.

Les travaux de recherche de ce mémoire seront présentés dans deux articles de recherche originaux.

## **2.1.3 Matériel et méthodes**

### 2.1.3.1 Génération des différentes colonies et devis expérimental

Toutes les interventions impliquant des animaux ont été approuvées par le comité institutionnel pour la protection des animaux du Centre de recherche du Centre hospitalier de l'Université de Montréal. Les animaux étaient hébergés individuellement, suivaient un cycle jour/nuit de 12h avec un accès libre à de l'eau et à la nourriture de laboratoire standard CHOW (23 % des calories provenant du gras, 17 % des protéines et 60 % des carbohydrates ; #2018 ; Harlan Teklad, Madison, WI) ou riche en gras (60 % des calories provenant du gras, 16 % des protéines et 24 % de carbohydrates ; #F3282 ; Bioserv Diets, Frenchtown, NJ) (HFD), selon le devis expérimental. À l'âge de 6 semaines, les souris mâles et femelles étaient réparties en cohortes, et la glycémie, le poids et la nourriture consommée relevés de façon hebdomadaire.



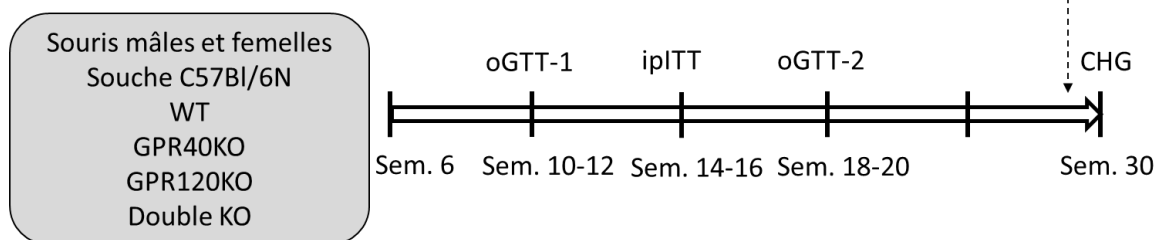
Les souris GPR40<sup>-/-</sup> (GPR40KO) sont sur un fond génétique pur C57BL/6N et ont été générées par recombinaison homologue dans les cellules souches embryonnaires par Lexicon Genetic (The Woodlands, TX). L'exon 2 du gène codant pour GPR40 a été remplacé par le gène codant pour LacZ.

Pour la lignée GPR120<sup>-/-</sup>, des souris porteuses de sites LoxP entourant l'exon 1 de GPR120 (GPR120<sup>floxNeofrt</sup>) ont été générées par Ingenious Targeting Laboratory (Ronkonkoma, NY, U.S.A) et croisées sur un fond C57Bl/6N pendant plus de 9 générations. Cependant, les souris homozygotes GPR120<sup>floxNeofrt</sup> montraient une importante diminution de l'expression du gène GPR120 dans les îlots et d'autres organes. Ne pouvant servir pour l'étude de l'effet d'une délétion de GPR120 dans les cellules  $\delta$ , ces souris furent croisées avec des souris transgéniques de lignée E2A-Cre (B6.FVB-Tg [EIIa-cre] C5379Lmgd/J, Jackson Labs) pour générer une lignée de souris avec une délétion complète de GPR120 (GPR120KO). Seules les souris GPR120<sup>delta</sup> n'exprimant ni la mutation du gène NNT (NNT<sup>C57BL/6N</sup>) ni E2a-Cre furent gardées pour la série de croisements suivants. Les souris expérimentales furent obtenues en croisant des souris GPR120<sup>delta</sup> hétérozygotes. La délétion complète de GPR120 a été ensuite vérifiée par des mesures de l'expression de l'ARN.

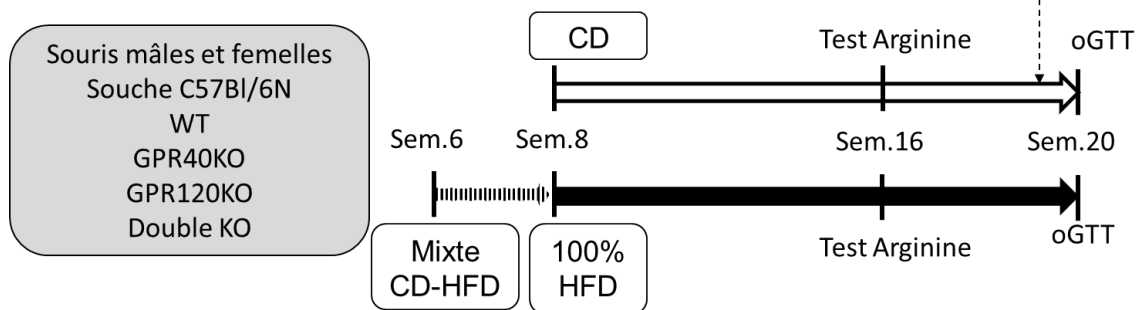
Pour la lignée  $\delta$ KO, des souris de lignées C57BL/6 — Ffar4<sup>tm1.1Mr1</sup> avec des sites LoxP bordant une séquence promotrice de 1,5 Kb, en amont de l'exon 1 de GPR120 ont été acquises de Taconic Biosciences. Des souris hétérozygotes ou homozygotes pour les régions loxP (GPR120<sup>+fl</sup> ou GPR120<sup>fl/fl</sup>) furent croisées avec des souris hétérozygotes pour la recombinaise Cre sous le contrôle du promoteur de la SST (SST-Cre) de lignée C57Bl/6N (B6N.Cg-Sst<sup>tm2.1(cre)Zjh</sup>/J, Jackson Laboratory). Le croisement des souris GPR120<sup>+fl</sup> et SST-Cre;GPR120<sup>+fl</sup> généra les souris expérimentales. Les données comparant la SISG d'îlots isolés de souris de sexes différents sont peu nombreuses, cependant des études réalisées chez le rat suggèrent une SISG plus élevé par des îlots isolés de femelles à 3 et 12 semaines comparativement aux mâles (166, 167). Ce dimorphisme sexuel nous a poussé à étudier séparément les îlots de souris mâles et femelles. Le coup de génération des souris étant important, les mâles sauvages (WT), GPR120<sup>fl/fl</sup> (flox), SST-Cre (Cre) et SST-Cre ; GPR120<sup>fl/fl</sup> ( $\delta$ KO) furent utilisés pour les expériences de sécrétion et de prolifération. Les femelles de ces génotypes furent utilisées pour les RT-PCR quantitatives.

### 2.1.3.2 Évaluation de l'homéostasie du glucose

Cohorte 1: Diète régulière CHOW



Cohorte 2: Diète régulière CHOW vs HFD



**Figure 8.** – Étude du rôle de GPR120 et GPR40 dans l'homéostasie du glucose. Des souris avec une délétion constitutive du gène codant pour GPR120 (GPR120KO), GPR40 (GPR40KO) ou les deux (DbleKO) ont été observées avec une diète régulière CHOW (CD) (cohorte 1) ou avec une diète obésogène riche en gras (HFD) (cohorte 2). Des souris appariées pour le sexe et le génotype sous une diète CD servaient de contrôle. Le poids, glycémie et quantité de nourriture consommée étaient relevés chaque semaine. La tolérance au glucose (oGTT), sensibilité à l'insuline (ipITT), la réponse des cellules  $\alpha$  à une injection d'arginine (Test Arginine) et la sécrétion d'insuline en réponse au glucose (clamp hyperglycémique, CHG) ont été mesurées. La composition corporelle fut évaluée par résonance magnétique (IRM). Sem : semaine.

La glycémie à jeun a été mesurée après la période de 4 heures sans nourriture qui précède chaque test métabolique. Le sang pour chaque mesure de glycémie et pour le plasma fût prélevé par ponction à l'extrémité de la queue dans la veine caudale. Lors des tests d'hyperglycémie provoqués par voie orale (oGTT), une dose de 1 g de glucose par kg de poids corporel a été administrée par gavage. Par la suite, la glycémie et l'insulinémie ont été mesurées juste avant le gavage (t=0 min) et aux temps t=15, 30, 45, 60, 90 et 120 min. La glycémie fut mesurée avec un glucomètre Accu-Check (Roche, Indianapolis, IN) et l'insulinémie par test enzymatique d'immunoabsorbance (ELISA) d'Alpco Diagnostics (#80-INSRT-E01, E10, Rat Insulin ELISA, Salem, NH, USA) aux temps rapportés. Les tests de stimulation à l'arginine ont été réalisés par l'injection intrapéritonéale (i.p.) d'une dose de 1,25 g de L-arginine par kg de poids corporel. La glycémie et la glucagonémie furent mesurées juste avant l'injection (t=0), 10 et 30 minutes après. De l'aprotinine (0,5KIU/ $\mu$ L de sang) a été ajoutée au plasma avant congélation et la glucagonémie fut mesurée par test enzymatique ELISA d'Alpco Diagnostics (#48-GLUHU-E01, Glucagon ELISA, Salem, NH, USA). La sensibilité à l'insuline a été mesurée lors d'un test de tolérance à l'insuline, à la suite d'une injection i.p. de 0,75 unité par Kg de poids corporel d'insuline (humulin-R ; Lily, Toronto, ONT, CAN). La glycémie fut mesurée juste avant l'injection (t=0 min), 15, 30, 45, 60, 90 et 120 minutes après. Le taux de clairance du glucose du plasma en réponse à l'insuline, le  $K_{itt} = 0,693/t(1/2)$ , où t(1/2) est calculé à partir de la pente de la glycémie durant les 30 premières minutes du test. Pour les clamps hyperglycémiques, du dextrose 10 % fut infusé par un cathéter dans la veine jugulaire de souris conscientes, dans le but d'atteindre et maintenir une hyperglycémie comprise entre 15,7 et 19,7 mmol/l pour les mâles et 14,5 et 17,7 mmol/l pour les femelles pendant 30 minutes. Une injection i.p. d'arginine (174mg/kg) a été faite à la fin de cette période pour évaluer la fonction sécrétoire totale des cellules  $\beta$ . Les souris furent sacrifiées à la fin du CHG, et le pancréas, foie, tissus adipeux sous-cutané, péritonéal et gonadique, ainsi que le muscle gastrocnémien furent collectés et pesés. L'insulinémie et les niveaux de C-peptide correspondant furent mesurés par kit ELISA d'Alpco Diagnostics (#80-CPTHU-E01.1, C-Peptide Elisa, Salem, NH, USA). Le taux d'infusion de glucose pendant la période d'hyperglycémie fut calculé (GIR). La clairance de l'insuline est le ratio de l'insulinémie moyenne pendant les 30

minutes de clamps par la C-peptidémie moyenne pendant cette même durée. La sensibilité à l'insuline est le ratio du GIR et de l'insulinémie moyenne. L'indice de disposition est le rapport de la sensibilité à l'insuline et de la C-peptidémie moyenne.

#### 2.1.3.3 Évaluation de la composition corporelle

La masse grasse des souris a été mesurée à l'état nourri par IRM avec une EchoMRI-700 (Houston, TX). À l'aide d'imagerie par résonance magnétique, cette méthode non invasive permet d'évaluer précisément, sans anesthésie ou sédation, la masse de gras ainsi que la masse maigre des souris.

#### 2.1.3.4 Isolement des îlots de Langerhans

Les îlots ont été isolés de souris mâles âgées de 10 à 14 semaines par digestion à la collagénase et piquage manuel, selon une méthode précédemment décrite (168). Les îlots ont ensuite été mis en culture durant la nuit dans du milieu RPMI-1640 contenant 10 % de sérum foetal bovin, 100 unités/ml de pénicilline, 100 µg/ml de streptomycine et 11,1 mmol/l de glucose.

##### 2.1.3.4.1 Mesure de la sécrétion d'îlots isolés de souris

Les sécrétions d'insuline et de SST ont été mesurées simultanément en réponse au glucose (2,8 et 16,7 mM) et des agonistes synthétiques spécifiques à GPR120, le Compound A (#21438, CpdA, Cayman Chemical, Michigan, USA) à des concentrations de 10 ou 50 µmol/L, ou l'AZ-13581837 (AZ, fourni par Astra-Zeneca), lors d'incubations statiques de 1h d'îlots isolés. Les sécrétions de glucagon et de SST ont été simultanément mesurées en condition de faible glucose (1 mM), et réponse à l'arginine (10 mM) avec ou sans CpdA. Les îlots étaient regroupés par 10, et chaque condition était faite en triplicata. Les îlots ont ensuite été récoltés dans de l'éthanol acide et le contenu des puits centrifugé et entreposé à -80°C. Avant les expériences de sécrétion, les îlots étaient lavés 2 fois pendant 20 min à 37°C dans un milieu tampon Krebs-Ringer contenant 0,1 % de BSA, ainsi que 2,8 mM de glucose pour les sécrétions d'insuline ou 5,5 mM pour les sécrétions de glucagon. Le contenu intracellulaire d'insuline et de glucagon a été mesuré à la suite de l'extraction dans l'éthanol acide. L'insuline, le glucagon et la SST ont été mesurés par dosage radioimmunologique (RIA) (RI-13K, GL-32K ; Sigma-Aldrich).

#### *2.1.3.4.2 Mesure de la prolifération des cellules des îlots par marquage immunologique*

Par groupe de 150 à 200, les îlots ont été incubés pendant 48 h dans du milieu RPMI 1640 avec 10 % de FBS, 100 U/ml de pénicilline/streptomycine, 5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU, 10 $\mu$ M), 2,8 ou 16,7 mmol/l de glucose et avec ou sans le CpdA 50 $\mu$ M. Le milieu était changé après 24h. À la fin du traitement, les îlots furent dispersés à l'acutase (1  $\mu$ L/îlot) (ThermoFisher Scientific, St-Laurent, QC, Canada). Le ratio de cellules mortes/vivantes fut obtenu par marquage avec le colorant Aqua Vivid (Invitrogen by ThermoFisher Scientific, St-Laurent, QC, Canada). Les cellules furent par la suite fixées, perméabilisées et marquées pour l'EdU avec le kit Click-iT™ EdU AlexaFluor 488™ pour cytométrie en flux (Invitrogen by ThermoFisher Scientific, St-Laurent, QC, Canada). Les cellules  $\beta$  et  $\alpha$  furent marquées en utilisant des anticorps anti-insuline AlexaFluor® 647 et anti-glucagon PE respectivement (BD Biosciences). Les analyses furent effectuées sur un cytomètre BD™ LSR II (BD Biosciences) sur > 30 000 cellules et le logiciel d'analyse FACSDiva Software (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA).

#### *2.1.3.4.3 Extraction d'ARN et réaction RT-PCR quantitative*

La totalité de l'ARN de groupes de 120-200 îlots a été extrait en utilisant le RNeasy micro kit (Qiagen, Valencia, CA). La quantité d'ARN a été déterminée par spectrophotométrie via un NanoDrop 2 (Life Technologies Inc.) et de 0,250 à 1,0  $\mu$ g d'ARN fut transcrit en ADN.

#### *2.1.3.5 Analyses statistiques*

Les analyses statistiques ont été faites sur le logiciel GraphPad Prism (La Jolla Californie, USA, [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com)) version 8.1 pour Windows. Avant chaque analyse, la normalité des données a été vérifiée par un test de Shapiro-Wilk. Nous avons effectué des analyses de variance (ANOVA) lorsque les données étaient distribuées normalement. Dans le cas contraire, les données ont été transformées de façon logarithmique, ou nous avons choisi un test non-paramétrique. Pour comparer les groupes selon le génotype, des ANOVA unidirectionnelles ou un test non-paramétrique de Kruskal Wallis ont été appliqués. Lors des suivis ou des tests ou plusieurs mesures étaient prises sur les mêmes sujets, des ANOVA sur mesures répétées ont été utilisées lorsqu'il ne manquait pas de mesures (chaque individu avait des données pour chaque point). Dans le cas contraire, nous avons utilisé une ANOVA mixte, qui supporte mieux les valeurs

manquantes. En cas de non-normalité des données, un test non-paramétrique de Friedman était effectué. Nous avons utilisé des comparaisons appariées avec une correction de Tukey pour comparer les groupes deux à deux. Dans le cas où les comparaisons étaient faites uniquement avec un contrôle, une correction de Dunnett a été appliquée. Les données étaient séparées selon le sexe (M/F), Les aires sous la courbe (ASC) ont été calculées selon la méthode des triangles, à partir des données normalisées en pourcentage de la valeur à  $t=0$ , en soustrayant la valeur à  $t=0$ .

## 2.1.4 Résultats

2.1.4.1 La signalisation GPR120 (FFAR4) dans les cellules  $\delta$  des îlots de Langerhans potentialise la sécrétion d'insuline et de glucagon.

### 2.1.4.1.1 Contribution aux résultats

Dans cette étude, j'ai participé et produit des données pour les expériences de sécrétion statique d'insuline, glucagon et SST chez les souris GPR120KO et  $\delta$ 120. J'ai, avec Marine Croze, isolé des îlots, réalisé les expériences de sécrétions statiques, et quantifié les concentrations d'hormones par RIA. Pour la partie prolifération, j'ai participé et produit des données pour les expériences de cytométrie en flux. J'ai entièrement récolté les données et réalisé la figure de prolifération dans les îlots isolés des souris  $\delta$ 120 ainsi que les mesures de l'expression de GPR120 par RT-PCR quantitative dans les lignées GPR120 et  $\delta$ KO.

### 2.1.4.1.2 Résumé du projet qui sera présenté dans un article écrit par Marine Croze et Julien Ghislain

GPR120 est un récepteur couplé aux protéines G qui suscite de l'intérêt car il a des effets bénéfiques sur l'homéostasie du glucose. C'est un récepteur pour acides gras à longue chaîne, qu'ils soient polyinsaturés comme les  $\omega$ -3, ou saturés comme le palmitate. Il a été montré que l'activation de GPR120 diminue l'inflammation associée à l'obésité et promeut l'adipogénèse. GPR120 est exprimé dans les principales cellules des îlots : les cellules  $\beta$  productrices d'insuline, les cellules  $\alpha$  produisant le glucagon et les  $\delta$  sécrétant la SST. Au sein des îlots, l'activation des récepteurs GPR120 et GPR40 par des acides gras à longue chaîne potentialise la sécrétion d'insuline en réponse au glucose et la relâche de glucagon. D'un autre côté, GPR120 inhibe la sécrétion de SST, un inhibiteur connu de la sécrétion d'insuline et de glucagon. Toutefois, le rôle précis de GPR120 dans la régulation de la sécrétion d'hormones par les îlots est méconnu. Ces études nous ont amenés à former l'hypothèse selon laquelle l'effet positif de l'activation de GPR120 dans les îlots sur la sécrétion d'insuline et de glucagon est en partie le résultat d'une diminution de la sécrétion de SST par les cellules  $\delta$ . Pour différencier cet effet d'une activation de GPR120 dans les cellules  $\alpha$  et  $\beta$ , il a fallu générer des lignées de souris n'exprimant pas le récepteur, dans tout l'organisme (GPR120KO) ou spécifiquement dans les cellules  $\delta$  ( $\delta$ KO). Pour

cela, des souris exprimant une enzyme Cre recombinante (SST-Cre) sous le contrôle du promoteur de la SST ont été croisées avec des souris dont l'exon 1 du gène codant pour GPR120 était flanqué de sites LoxP (FLOX) cibles de l'enzyme Cre. Ainsi, dans les cellules exprimant la SST, GPR120 n'était pas exprimé. Pour étudier le rôle de GPR120, nous avons mesuré la sécrétion d'hormones glucorégulatrices lors d'incubations statiques d'1h.

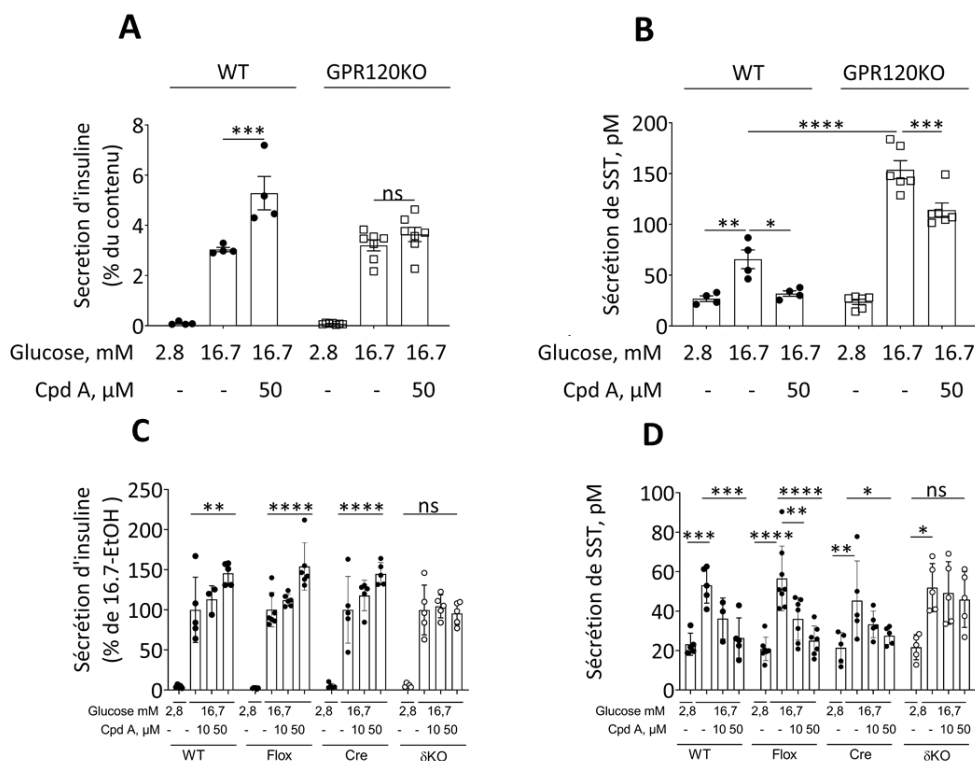
1) Nous avons mesuré simultanément la sécrétion d'insuline et de SST par des îlots isolés de souris  $\delta$ KO ou GPR120KO en réponse au glucose (2,8 et 16,7 mM) et des agonistes spécifiques de GPR120 (le CpdA ou l'AZ) ou des acides gras  $\omega$ -3 à longue chaîne comme l'acide  $\alpha$ -linoléique (ALA), l'acide eicosapentaénoïque (EPA) ou l'acide docosahexaénoïque (DHA)

2) Nous avons mesuré simultanément la sécrétion de glucagon et de SST par des îlots isolés de souris  $\delta$ KO ou GPR120KO en condition de bas glucose (1 mM/L) et en réponse à l'arginine et des agonistes spécifiques de GPR120 (le CpdA ou l'AZ).

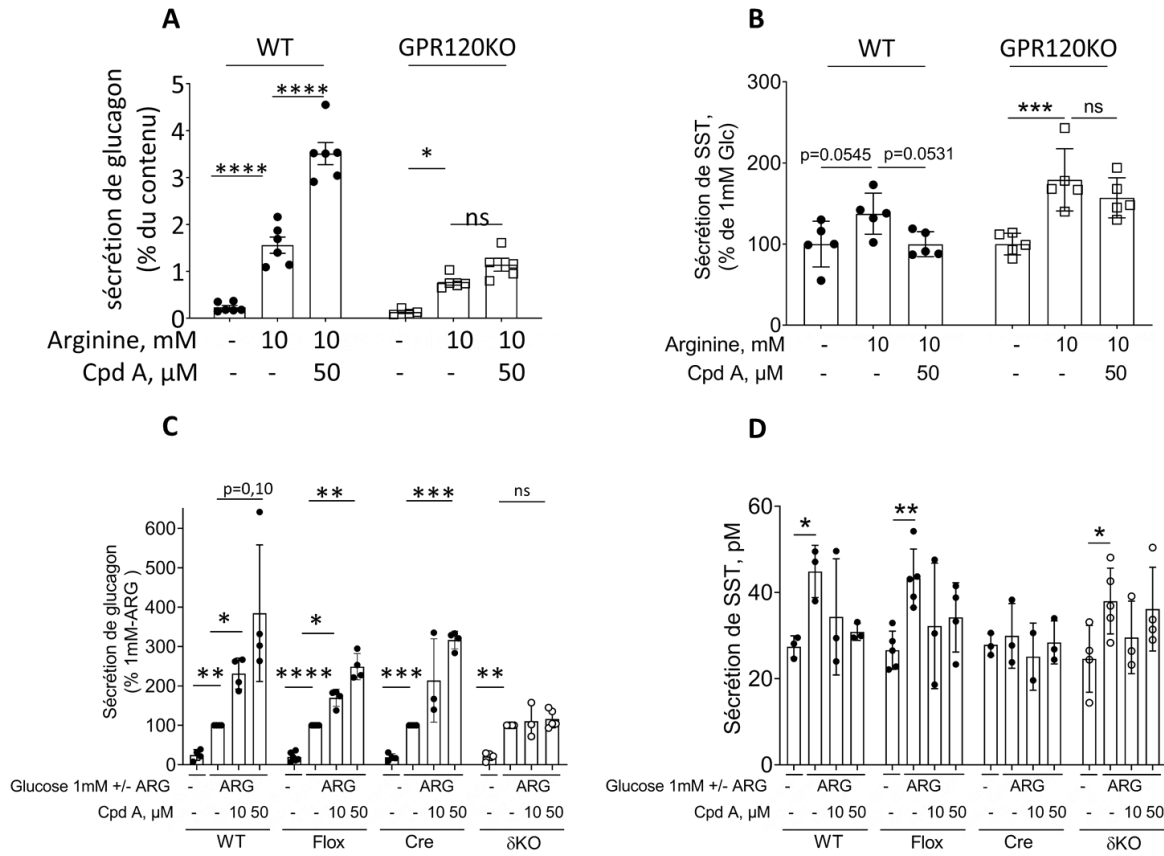
Les sécrétions d'insuline ( $5808 \pm 4673$  %,  $p < 0,0005$ ) et de SST ( $364 \pm 112$  %,  $p < 0,0001$ ) étaient augmentées en réponse au glucose 16,7 mM comparativement au glucose 2,8 mM. L'ajout des acides gras endogènes (ALA, EPA, DHA) a parallèlement potentialisé la sécrétion d'insuline en réponse au glucose et inhibé la sécrétion de SST. Ces acides gras n'activent pas exclusivement GPR120, ce sont aussi des agonistes de GPR40, un récepteur reconnu pour potentialiser la sécrétion d'insuline. C'est pour cela que par la suite, nous avons utilisé des agonistes synthétiques spécifiques de GPR120, le CpdA et l'AZ. Afin de valider la sélectivité de ces molécules envers GPR120, nous avons mesuré les sécrétions d'insuline et de SST par des îlots isolés de souris GPR40KO, et n'avons pas observé d'effet du CpdA. Nous montrons que ces agonistes potentialisent de façon dose dépendante la sécrétion d'insuline et diminuent la sécrétion de SST. Nous avons traité des îlots GPR120KO avec le CpdA pour confirmer sa sélectivité envers GPR120, nous observons une perte de l'effet du CpdA sur la sécrétion d'insuline et une diminution de son effet sur la sécrétion de SST en réponse au glucose (Figure 9, A et B). Pour stimuler la sécrétion de glucagon, les îlots furent traités avec une faible concentration de glucose (1 mM) et 10 mM d'arginine. Dans ces conditions, l'arginine stimule la sécrétion de glucagon et de SST (Figure 10, A et B). Le CpdA potentialise de façon dose dépendante la sécrétion de glucagon et inhibe celle de



SST, cet effet est largement diminué chez les souris GPR120KO. Ces résultats confirment que le CpdA est un agoniste spécifique de Gpr120, et que l'activation de GPR120 dans les îlots potentialise la sécrétion d'insuline et de glucagon, tout en diminuant la sécrétion de SST.



**Figure 9.** – La signalisation GPR120 dans les cellules  $\delta$  potentialise la sécrétion d’insuline en réponse au glucose. Des îlots isolés de souris mâles de 10-14 semaines sauvages (WT), avec une délétion complète de GPR120 (GPR120KO), avec l’exon 1 du gène codant pour GPR120 entouré de site LoxP (FLOX), exprimant l’enzyme Cre-recombinante sous le contrôle du promoteur de la somatostatine (SST-Cre) ou avec une délétion de GPR120 dans les cellules produisant la somatostatine ( $\delta$ KO) ont été utilisés. Les sécrétions simultanées d’insuline (A) et de SST (B) en réponse au glucose (2,8 et 16,7 mM) et au Compound A (50  $\mu$ M) par des îlots isolés de souris WT et GPR120KO ont été mesurées lors d’incubation statique d’1h. Pareillement, les sécrétions de d’insuline (C) et de SST (D) d’îlots isolés de souris  $\delta$ KO ont été mesurées et comparées aux différents contrôles. Les quantités d’insuline ont été normalisées par le contenu total des îlots utilisés en insuline. 100-150 îlots ont été utilisés par conditions. Valeurs comparées par ANOVA à 2 voies, suivis de comparaisons appariées avec une correction de Dunnett comparant les différentes conditions à la condition 16,7 mM +ETOH. \* :  $p < 0,05$ ; \*\* :  $p < 0,005$ ; \*\*\* :  $p < 0,0005$ ; \*\*\*\* :  $p < 0,0001$ ; ns: non-significative. Moyenne  $\pm$  écart-type. Données récoltées avec Marine Croze.



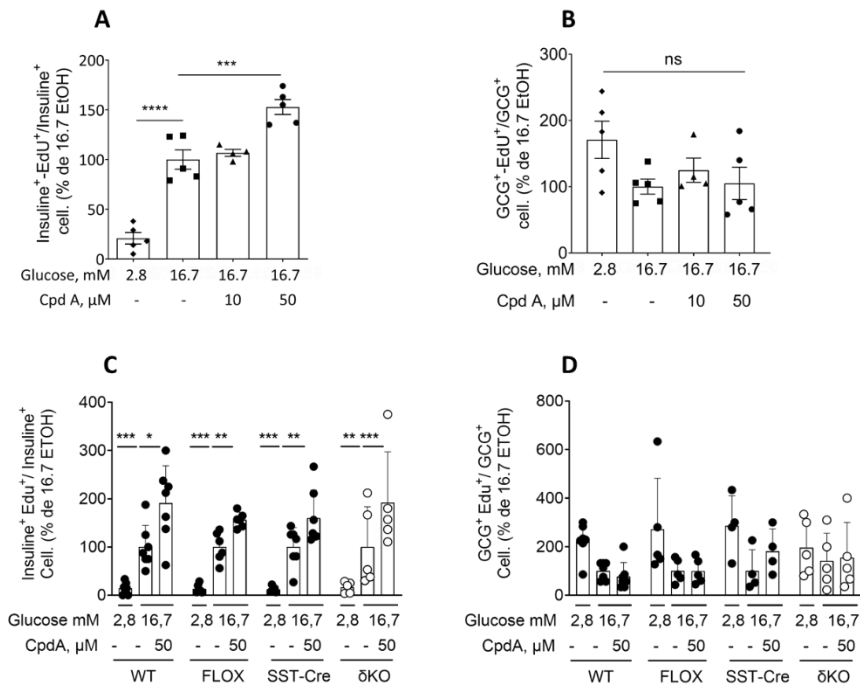
**Figure 10.** – La signalisation GPR120 dans les cellules  $\delta$  potentialise la sécrétion de glucagon en réponse à l’arginine. Des îlots isolés de souris mâles de 10-14 semaines sauvages (WT), avec une délétion complète de GPR120 (GPR120KO), avec l’exon 1 du gène codant pour GPR120 entouré de site LoxP (FLOX), exprimant l’enzyme Cre recombinante sous le contrôle du promoteur de la somatostatine (SST-Cre) ou avec une délétion de GPR120 dans les cellules produisant la somatostatine ( $\delta$ KO) ont été utilisés. Les sécrétions simultanées de glucagon (A) et de SST (B) en réponse à l’arginine (10 mM) et au Compound A (50  $\mu$ M) par des îlots isolés de souris WT et GPR120KO ont été mesurées lors d’incubation statique d’1h sans glucoses (1mM). Pareillement les sécrétions de glucagon (C) et de SST (D) d’îlots isolés de souris  $\delta$ KO ont été mesurées et comparées aux différents contrôles. 100-150 îlots ont été utilisés par conditions. Valeurs comparées par ANOVA à 2 voies, suivis de comparaisons appariées avec une correction de Dunnett comparant les différentes conditions à la condition 1 mM + ARG. \* :  $p < 0,05$ ; \*\* :  $p < 0,005$ ; \*\*\* :  $p < 0,0005$ ; \*\*\*\* :  $p < 0,0001$ ; ns: non-significative. Moyenne  $\pm$  écart-type. Données récoltées avec Marine Croze.

Pour savoir si la diminution de la sécrétion de SST est responsable de l'augmentation de la sécrétion d'insuline et de glucagon, nous avons reproduit les expériences précédemment décrites en utilisant des îlots isolés de souris  $\delta$ KO. Les sécrétions d'hormones par les îlots  $\delta$ KO ont été comparées aux sécrétions d'îlots isolés de congénères WT, FLOX et SST-Cre. Le CpdA potentialise la sécrétion d'insuline en réponse au glucose par les îlots WT, Flox et Cre, mais pas  $\delta$ KO (Figure 9, C). Parallèlement, la sécrétion de SST est diminuée en réponse au CpdA dans les îlots WT, Flox et Cre, mais encore une fois, il est sans effet sur les îlots isolés de souris  $\delta$ KO (Figure 9, D). Ces résultats sont similaires à ceux observés avec les îlots isolés de souris n'exprimant pas Gpr120 (GPR120KO). Ils suggèrent que l'activation de GPR120 dans les cellules  $\delta$  est responsable, en très grande partie, de l'effet insulino-tropique du CpdA.

En réponse à l'arginine, le CpdA potentialise la sécrétion de glucagon d'îlots isolés de souris Cre, Flox et WT (Figure 10, C). Similairement à ce qui fût observé avec une délétion complète de GPR120, le CpdA est sans effet sur les îlots  $\delta$ KO. Pour ce qui est de la sécrétion de SST, en parallèle, nous observons une inhibition par le CpdA de la sécrétion de SST par les îlots WT, et Flox (Figure 10, D). Cependant, l'effet n'est pas significatif avec des îlots isolés de souris  $\delta$ KO. Cela peut s'expliquer par le fait que l'expression de l'enzyme Cre-recombinante dans les cellules  $\delta$  semble abolir la sécrétion de SST en réponse à l'arginine, visualisé chez les souris SST-Cre. Les souris  $\delta$ KO exprimant aussi cette enzyme dans les cellules  $\delta$ , il est possible que le même phénomène ait lieu. Nos résultats suggèrent donc que la signalisation GPR120 dans les cellules  $\delta$  est responsable de l'effet insulino-tropique et gluco-tropique de l'activation de GPR120 dans les îlots, un effet en partie dû à la diminution de la sécrétion de SST.

En parallèle, nous avons étudié le rôle de GP120 sur la prolifération des cellules  $\beta$ . En effet, ces cellules prolifèrent lorsque les îlots sont mis en culture avec du glucose et des acides gras (169). Les acides gras insaturés ont des effets bénéfiques sur l'homéostasie du glucose, en augmentant la sensibilité à l'insuline et protégeant les cellules  $\beta$  de l'apoptose. De plus, il a été montré que le traitement avec l'acide arachidonique, un acide gras poly-insaturé à longue chaîne, stimule directement la prolifération de cellules insulino-sécrétrices MIN6, une lignée de cellules insulino-

sécrétrices (170). L'activation de RCPG dans les cellules  $\beta$ , comme le récepteur à GLP-1, peut stimuler la prolifération de ces cellules (171), et la SST a un effet inhibiteur sur la prolifération des cellules insulino-sécrétrices MIN6 (172) et des cellules  $\beta$  de souris ou d'humains (173, 174). Est-ce que la signalisation GPR120 dans les îlots est impliquée dans la prolifération des cellules  $\beta$  en réponse aux acides gras? C'est ce que nous avons exploré. Pour cela, nous avons traité des îlots isolés de souris pendant 48h, avec du glucose (16,7 mM), du CpdA et de l'EdU pour mesurer la prolifération. Par méthode immunohistochimique et de cytométrie en flux (FACS), nous observons que le CpdA stimule la prolifération des cellules  $\beta$ , mais non  $\alpha$ , dans des îlots isolés de souris WT (Figure 11, A et B). Par FACS, nous avons ensuite étudié l'effet d'une délétion de GPR120 spécifiquement dans les cellules  $\delta$  ( $\delta$ KO). Le CpdA stimule la prolifération des cellules  $\beta$ , mais non  $\alpha$ , dans des îlots isolés de souris WT, Flox, SST-Cre et  $\delta$ KO. Ces résultats suggèrent que la signalisation GPR120 dans les cellules  $\delta$  n'est pas responsable du rôle prolifératif de l'activation de GPR120 dans les îlots (Figure 11, C et D).



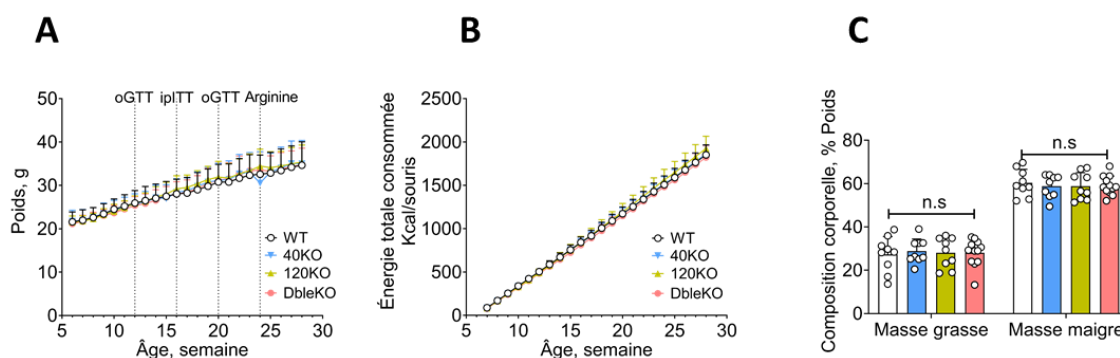
**Figure 11.** – La délétion de GPR120 dans les cellules  $\delta$  pancréatiques ne bloque pas l'action du Compound A (CpdA) sur la prolifération des cellules  $\beta$ . Des îlots isolés de souris mâles de 10-14 semaines sauvages (WT), avec l'exon 1 du gène codant pour GPR120 entouré de site LoxP (FLOX), exprimant l'enzyme Cre recombinante sous le contrôle du promoteur de la somatostatine (SST-Cre) ou avec une délétion de GPR120 dans les cellules produisant la somatostatine ( $\delta$ KO) ont été traités pendant 48 h pour mesurer la prolifération en réponse au CpdA. Le milieu de culture RPMI-1640 contenait 10 % de sérum fœtal bovin, 100 unités/ml de pénicilline, 100  $\mu$ g/ml de streptomycine et de l'EdU pour mesurer la prolifération, en réponse à une stimulation par le glucose (H: 16,7 mM). À ce milieu pouvait être ajouté l'agoniste de synthétique de GPR120 Compound A 50  $\mu$ M (CpdA, 50  $\mu$ M). Les cellules  $\beta$  ont été marquées avec des anticorps anti-insuline (A et C) et anti-glucagon (GCG) (B et D) et les cellules comptées par cytométrie en flux. Valeurs comparées par ANOVA à 2 voies, suivis de comparaisons appariées avec une correction de Dunnett comparant les différentes conditions à la condition 16,7 mM +ETOH. \* :  $p < 0,05$ ; \*\* :  $p < 0,005$ ; \*\*\* :  $p < 0,0005$ ; \*\*\*\* :  $p < 0,0001$ ; ns: non-significative. Moyenne  $\pm$  écart-type. Données récoltées avec Marine Croze.

## 2.1.4.2 Le rôle des récepteurs aux acides gras GPR120 et GPR40 dans l'homéostasie du glucose, étude *in vivo* chez la souris

### 2.1.4.2.1 Contribution aux résultats

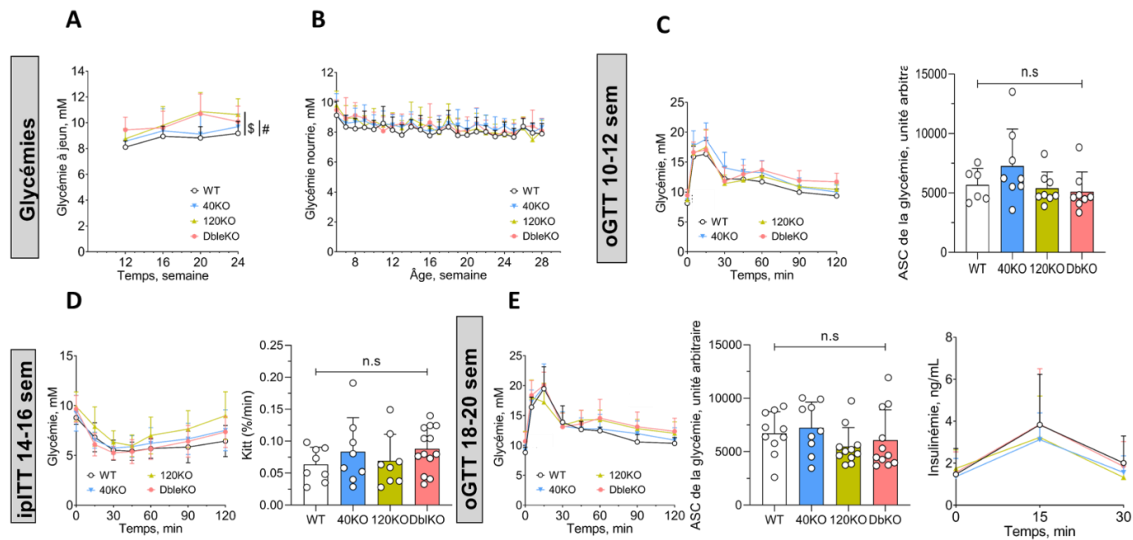
Dans l'étude de suivi *in vivo* comparant les génotypes GPR120 et GPR40, j'ai fait le suivi hebdomadaire des colonies qui consistait à peser les souris, relever la glycémie et la quantité de nourriture consommée, et prélever le plasma lorsque nécessaire. Il en va de même durant les tests métaboliques, réalisés avec Grace Fergusson et Mélanie Éthier de la plateforme de phénotypage métabolique du CRCHUM, qui ont réalisé les différents injections ou gavages et mené le CHG. Pour les données présentées dans ce mémoire, j'ai compilé les données et réalisé les analyses et graphiques avec des modèles faits par Marine Croze. Cette dernière a fait le devis, planifié, organisé et supervisé le projet.

### 2.1.4.2.2 Les souris mâles sous une diète normale (CHOW)



**Figure 12.** – La double délétion de GPR120 ou GPR40 n'a pas d'effet majeur sur l'homéostasie énergétique chez la souris mâle. Dès 6 semaines, des souris mâles de souches C57BL/6N avec une délétion constitutive de GPR120 (GPR120KO), GPR40 (GPR40KO) ou une double délétion de GPR120 et GPR40 (DbleKO) ont été suivies pendant 24 semaines. Le poids (A), la quantité de calories consommées (B) ont été relevés hebdomadairement. La composition corporelle a été mesurée par Echo MRI (C). Les groupes comptaient 9-12 souris. Moyenne  $\pm$  écart-type.

Après avoir été sevrées, les souris ont été nourries avec une nourriture normale CHOW *ad libidum* jusqu'à l'âge de 30 semaines. L'absence des récepteurs à acides gras n'a influencé ni le gain de poids, ni la quantité totale de calories consommées, ni la masse grasse (Figure 12, A à C).



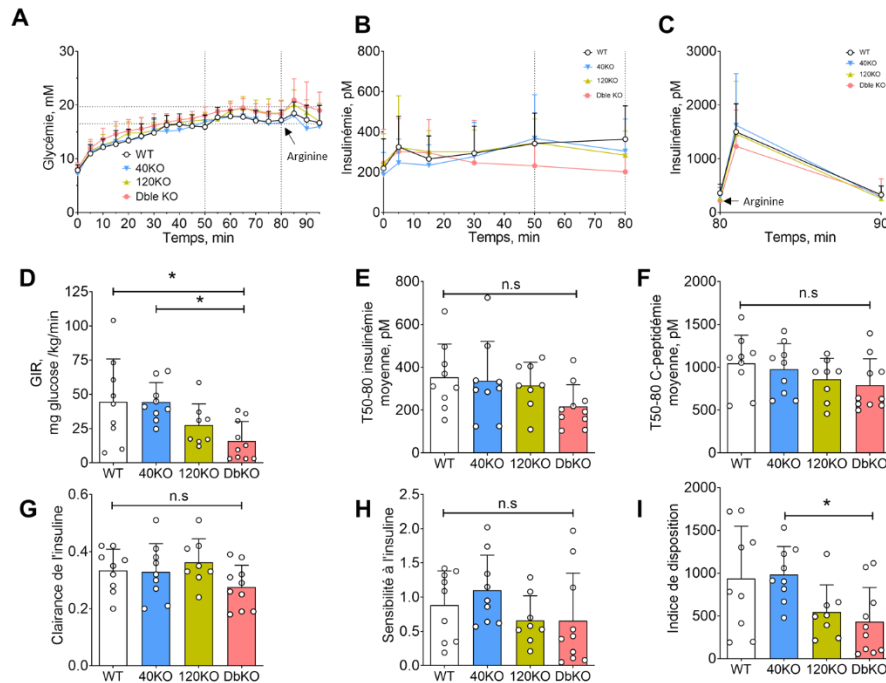
**Figure 13.** – Le récepteur aux acides gras GPR120 est impliquée dans le contrôle de la glycémie en état de jeûne chez la souris mâle. Dès 6 semaines, des souris mâles ont été observées pendant 24 semaines. La glycémie nourries (B) et à jeun (C) ont été relevées régulièrement. Un test de tolérance à une dose de 1 g/kg de glucose (oGTT) a été réalisé chez les souris à 10-12 semaines (F) et 18-20 semaines (G) durant lesquels la glycémie a été relevée aux temps t=0, 15, 30, 45, 60, 90 et 120 minutes, et l'insulinémie mesurée aux temps t=0, 15 et 30 minutes, lorsqu'indiquée. La résistance à l'insuline a été mesurée avec l'injection i.p. d'une dose de 0,75 U/kg d'insuline et la glycémie relevée aux temps t=0, 5, 15, 30, 45, 60, 90 et 120 minutes. La  $K_{itt}$  mesure le taux de retrait du glucose du plasma pendant ce test. Moyennes comparées par ANOVA à une ou 2 voies pour mesures répétées suivie de comparaisons appariées avec une correction de Tukey lorsque qu'indiqué. Dans le cas d'interaction significative entre les facteurs temps et génotype, des comparaisons appariées avec une correction de Tukey ont permis d'étudier à chaque temps l'effet du génotype Les groupes comptaient 9-12 souris. # : WT vs DbleKO  $p < 0,05$  ; \$ : WT vs 120 KO  $p < 0,05$ . n.s : non-significatif. Moyenne  $\pm$  écart-type.



Pour déterminer si les récepteurs sont impliqués dans le contrôle de la glycémie, nous avons régulièrement mesuré le glucose sanguin à l'état nourri et à jeun. L'absence des récepteurs modifie la glycémie moyenne à jeun (Figure 13, A) ( $p < 0,05$ ). Les souris GPR120KO ( $10,0 \pm 1,0$  mM) et DbleKO ( $10,0 \pm 0,6$  mM) ont une glycémie significativement plus haute que les WT ( $8,8 \pm 0,5$  mM) ( $p < 0,0005$  et  $P < 0,0001$ , respectivement). Les souris GPR40KO ( $9,2 \pm 0,5$  mM) ont une tendance non significative à avoir une glycémie moyenne plus faible que les DbleKO ( $p = 0,053$ ). Nous ne notons pas de différences sur la glycémie nourrie (Figure 13, B). La glycémie à jeun est un bon indicateur d'homéostasie glucidique perturbée et est principalement le reflet de la production de glucose par le foie (75% du glucose en circulation). Ces résultats suggèrent un effet de GPR120 dans l'homéostasie du glucose, mais non de GPR40.

Pour vérifier si la réponse insulinique après ingestion de glucose est efficace, un test d'hyperglycémie oral (oGTT) provoquée a été effectué à 10-12 et 18-20 semaines (Figure 13, C et E). Nous n'observons pas de différences dans la tolérance au glucose.

Pour évaluer la sensibilité à l'insuline en périphérie, nous avons effectué un ipITT à 14-16 semaines. En réponse à une injection intra-péritonéale d'insuline, nous mesurons les variations de glucose sanguin et calculons le taux de disparition du glucose du plasma ( $K_{ITT}$ ). Nous n'observons aucune différence à cet égard entre nos souris (Figure 13, D). Toutefois ce test n'est pas assez sensible pour conclure que les souris ont une sensibilité à l'insuline semblable.



**Figure 14.** – Le récepteur aux acides gras GPR120 agit dans le contrôle la glycémie en condition d’hyperglycémie. Nous avons réalisé un clamp hyperglycémique durant lequel les souris mâles reçoivent une infusion de dextrose 10 % par un cathéter implanté dans la veine jugulaire. Une hyperglycémie entre 15,7 et 19,7 mM était maintenue entre t=50 min et t= 80 min. Ensuite, les souris ont reçu une injection d’une dose de 1,25 g/kg de L-arginine (C). La glycémie (A) et l’insulinémie (B, C et E) ont été relevées tout au long du test ainsi que les niveaux de C-peptide durant la période de clamp (F). La quantité de glucose nécessaire à maintenir l’hyperglycémie est illustrée par le taux d’infusion de glucose (GIR, Figure D). La clairance de l’insuline (G) est le ratio d’insulinémie moyenne (E) et de la C-peptidémie moyenne durant la durée de clamp (F). La sensibilité à l’insuline (H) et le ratio de la quantité de glucose nécessaire pour maintenir l’hyperglycémie (D) sur l’insulinémie moyenne durant cette même période (E). L’indice de disposition est le produit de la sensibilité à l’insuline (H) sur la C-peptidémie (F) moyenne durant la période de clamp. \*: différence significative au seuil  $p < 0,05$  calculée par une ANOVA à une voie suivie de comparaisons multiples avec une correction de Tukey pour comparer les génotypes deux à deux. n.s : non-significatif. Moyenne  $\pm$  écart-type.

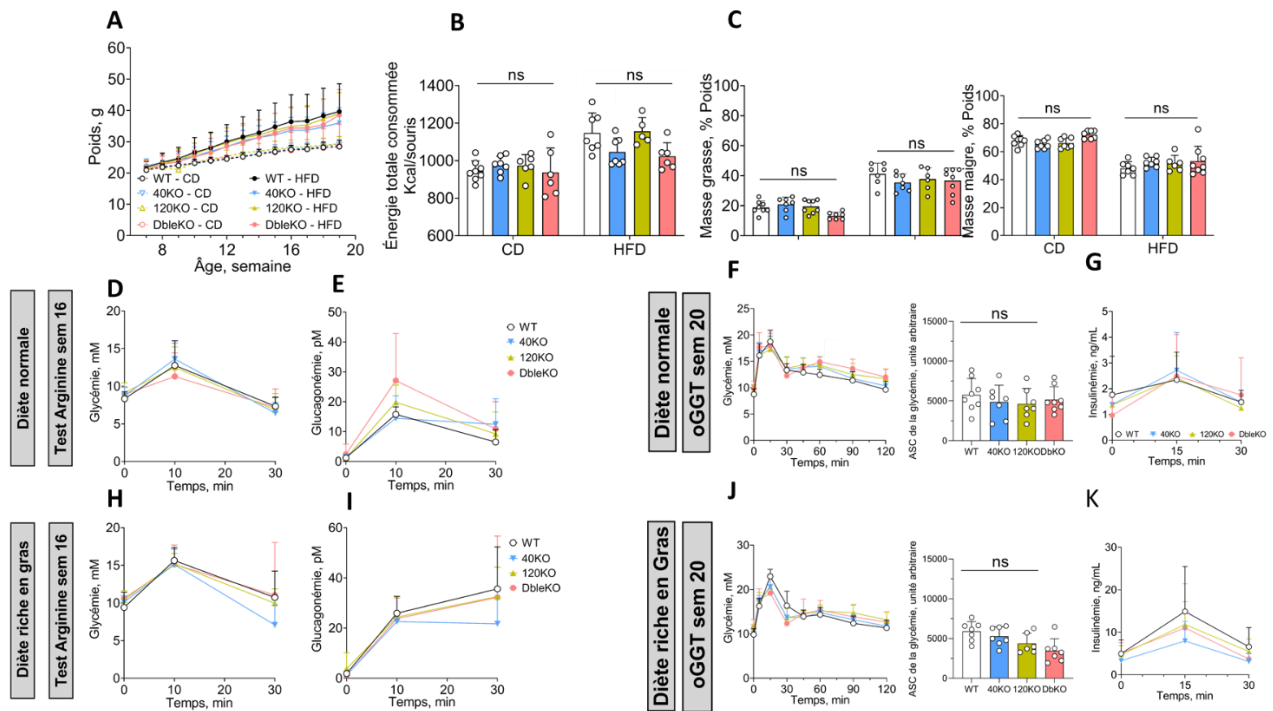
La meilleure façon d'évaluer la sécrétion d'insuline est un clamp hyperglycémique (CHG). L'objectif est de mesurer la capacité des îlots à sécréter de l'insuline en réponse au glucose. Pour cela, nous avons infusé du glucose par un cathéter pour amener les souris à un état hyperglycémique pendant 30 min. Nous observons que les souris DbleKO ( $15,9 \pm 14,2$  mg/kg/min) ont besoin de moins de glucose que leurs congénères GPR40KO ( $44,3 \pm 14,3$  mg/kg/min) ( $p < 0,05$ ) et WT ( $44,6 \pm 31,3$  mg/kg/min) ( $p < 0,05$ ) pour maintenir l'hyperglycémie (Figure 14, D). Cela n'est pas dû à une diminution de la sécrétion d'insuline par les îlots, les quantités de C-peptide ainsi que la capacité sécrétoire maximale stimulée par l'arginine ne variant pas (Figure 14, C, E et F). Dans un contexte de Rés.I, la sécrétion d'insuline va être augmentée pour maintenir la tolérance au glucose. Des niveaux semblables de sécrétion d'insuline n'indiquent donc pas une fonction des cellules  $\beta$  semblable. L'indice de disposition (DI), produit de la sensibilité à l'insuline et de la quantité de C-peptide sécrétés pendant le clamp, est l'indice le plus approprié pour mesurer cette dernière. Nous observons que cet index diffère selon le génotype ( $p < 0,05$ ), les souris DbleKO ( $431 \pm 400$  mg/kg/min\*pM) ayant un DI significativement plus faible que les GPR40KO ( $986 \pm 325$  mg/kg/min\*pM) ( $p < 0,05$ ) et une tendance non significative à avoir un indice plus faible que les WT ( $937 \pm 613$  mg/kg/min\*pM) ( $p = 0,0728$ ) (Figure 14, H). L'indice de disposition définit la relation entre la Rés.I et la sécrétion d'insuline, et mesure la fonction des cellules  $\beta$ . On peut conclure que dans un contexte de Rés.I, la sécrétion d'insuline en réponse au glucose est diminuée chez les souris Dble KO, un effet probablement dû à la perte de GPR120. Nous ne percevons toutefois pas de Rés.I lors de ce test (Figure 14, H). On peut conclure que dans un contexte de Rés.I, la sécrétion d'insuline en réponse au glucose est diminuée chez les souris Dble KO, un effet principalement dû à la perte de GPR120.

Tableau 1. – Étude du rôle des récepteurs aux acides gras GPR120 et GPR40 dans le métabolisme énergétique des souris mâles

	WT (n=9)	GPR40KO (n=9)	GPR120KO (n=9)	DbleKO (n=12)
Poids gagné (% poids initial)	60,0 ± 14,0	61,8 ± 24,1	64,8 ± 15,1	64,8 ± 18,5
Nourriture (Kcal total)	1849 ± 115	1898 ± 248	1850 ± 175	1808 ± 178
Masse grasse (%poids total)	27,3 ± 8,2	28,8 ± 5,6	28,1 ± 6,9	28,1 ± 6,2
Masse maigre (%poids total)	60,4 ± 6,2	58,8 ± 5,3	58,8 ± 6,3	59,1 ± 4,4
Glycémie 10-12 (mM)	8,1 ± 0,5 <sup>#</sup>	8,6 ± 1,0	8,8 ± 0,8	9,5 ± 1,0 <sup>#</sup>
Glycémie 22-24 (mM)	9,2 ± 0,9 <sup>§</sup>	9,7 ± 1,0	10,6 ± 1,2 <sup>§</sup>	10,1 ± 1,2
Insuline 18-20 (ng/mL)	1,5 ± 1,2	1,4 ± 0,9	1,8 ± 1,1	1,6 ± 1,0

L'absence de GPR120 et GPR40 n'a pas eu d'effet significatif sur le métabolisme énergétique. Des souris mâles ont été observées pendant 24 semaines. Nourriture : quantité totale de nourriture consommée, convertie en Kcal. Sont rapportées la glycémie à jeun aux semaines 10-12 et 22-24, ainsi que l'insulinémie aux semaines 18-20. Les résultats ont été comparés par ANOVA à une voie, suivi de comparaisons appariées avec une correction de Tukey. **&** : WT vs GPR40KO p<0,05; **\$** : WT vs GPR120KO p<0,05; **#** : **WT** vs DbleKO p<0,05; **€** : GPR40KO vs GPR120KO p<0,05; **⊖** : GPR40KO vs DbleKO p<0,05; **¥** : GPR120KO vs DbleKO p<0,05. Moyenne ± écart type.

### 2.1.4.2.3 Les souris mâles sous une diète riche en gras (HFD)



**Figure 15.** – La double délétion de GPR120 ou GPR40 n’a pas sur la réponse à la diète HFD chez la souris mâle. Des souris mâles de souches C57BL/6N ont été observées pendant 12 semaines sous une diète dont 60 % des calories proviennent du gras (HFD). En parallèle, un groupe contrôle consommait une diète régulière de laboratoire (CD). Le poids (A) et la quantité de nourriture consommée (B) ont été relevés hebdomadairement. La composition corporelle a été mesurée par échographie par résonance magnétique-IRM (C). La sécrétion des cellules  $\alpha$  a été évaluée lors d’un test de stimulation à une dose de 1,25 g/kg de L-arginine injecté i. p. La glycémie (D, H) et glucagonémie (E, I) ont été mesurées à t=0,10, 30 minutes. Un test de tolérance à une dose de 1 g/kg de glucose (oGTT) a été réalisé chez les souris à 20 semaines durant lesquels la glycémie a été relevée aux temps t=0, 15, 30, 45, 60, 90 et 120 minutes (F, J), et l’insulinémie mesurée aux temps t=0, 15 et 30 min (G, K). Les groupes comptaient 6-8 souris. ns: non significatif. Moyenne  $\pm$  écart-type.

Le modèle de souris suivant une diète riche en gras, qui mime la diète occidentale, est utilisé pour étudier le développement de l'obésité. Cette alimentation offre une bonne représentation de l'augmentation de la consommation de nourriture riche en calories dans nos sociétés. Ici, nous avons étudié le rôle que jouent les récepteurs aux acides gras GPR120 et GPR40 dans le développement de l'obésité et les perturbations métaboliques qui y sont associées. Pour cela, les souris consommaient exclusivement, à partir de l'âge de 8 semaines et jusqu'à 20 semaines, une nourriture dont 60% des calories proviennent du gras. Un groupe apparié sous diète CHOW servait de contrôle (CD). La diète HFD a bien induit un gain de poids plus important ( $69,7 \pm 14,6$  % vs  $34,4 \pm 6,1$  %) et une glycémie plus élevée comparativement au contrôle (Tableau 2). Nous n'observons pas de différences dans le poids gagné (Figure 15, A et Tableau 2) ou la composition corporelle sous HFD (Figure 15, B-C et tableau 2). Le génotype a une tendance non significative à modifier la quantité d'énergie consommée par les souris ( $p=0,065$ ) avec les souris DbleKO (1024 Kcal  $\pm$ 73) qui consomment moins de calories que les WT (1148 Kcal  $\pm$ 105) ( $p=0,037$ ) et que les GPR120KO (1156 Kcal  $\pm$  73,14) ( $p=0,044$ ) (Figure 15, B). Il a été montré que la sécrétion de glucagon des cellules  $\alpha$  était diminuée chez des souris sans GPR120 (108). L'obésité est associée à une sécrétion de glucagon par les cellules  $\alpha$  excessive et promeut la Rés.I, prédisposant au DT2. Nous avons donc mesuré la capacité sécrétoire des cellules  $\alpha$  avec un test de stimulation à l'arginine à 16 semaines, après 8 semaines de HFD. L'arginine est un acide aminé polaire qui stimule la sécrétion d'insuline par les cellules  $\beta$  rapidement après son injection, pour une courte durée (<5 min). Une même dose d'arginine stimule aussi la sécrétion de glucagon par les cellules  $\alpha$ , un effet visible sur une plus longue durée (ici 30 minutes). Nous observons bien une augmentation de la sécrétion de glucagon lors du test chez les souris obèses sous HFD comparativement au contrôle (Figures 15, E et I), sans effet du génotype. L'oGTT effectué à la fin du suivi chez les souris rendues obèses ne montre pas de différence dans la tolérance au glucose (Figure 15, F à K). On observe qu'une plus grande quantité d'insuline est sécrétée comparativement aux souris contrôles CD (Figure 15, G vs K et Tableau 2). Cependant, nous n'observons pas d'effet de la délétion des récepteurs sur la sécrétion d'insuline (Figure 15, J et Tableau 2). Chez la souris mâle, ces résultats montrent que les récepteurs à acides gras GPR120

et GPR40 ne jouent pas de rôle important dans la régulation de la glycémie, et qu'ils ne sont pas impliqués dans le développement de l'obésité et l'insulinorésistance qui l'accompagne.

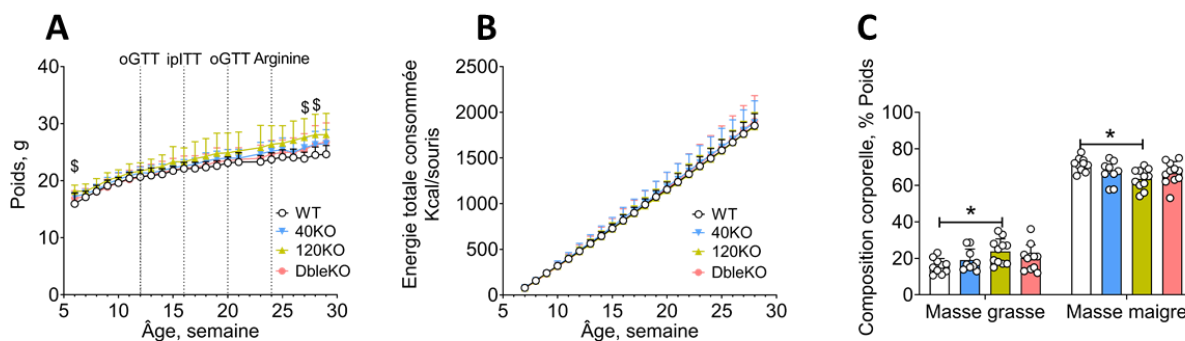
Tableau 2. – Étude du rôle des récepteurs aux acides gras GPR120 et GPR40 dans le métabolisme énergétique des souris mâles sous HFD

	WT		GPR40KO		GPR120KO		DbleKO	
	CHOW (n=8)	HFD (n=7)	CHOW (n=7)	HFD (n=7)	CHOW (n=7)	HFD (n=7)	CHOW (n=7)	HFD (n=7)
<b>Gain de poids</b> <b>(% poids initial)</b>	<b>39,8 ± 9,1</b>	<b>88,3 ± 29,2*</b>	<b>41,1 ± 5,8</b>	<b>67,7 ± 9,7*</b>	<b>42,0 ± 5,1</b>	<b>89,5 ± 16,1*</b>	<b>35,8 ± 11,8</b>	<b>85,7 ± 28,1*</b>
<b>Nourriture</b> <b>(Kcal totales)</b>	<b>973 ± 56</b>	<b>1148 ± 103</b>	<b>1010 ± 53</b>	<b>1044 ± 761</b>	<b>982 ± 736</b>	<b>1116 ± 120</b>	<b>938 ± 130</b>	<b>1057 ± 101</b>
<b>Masse grasse</b> <b>(% poids total)</b>	<b>18,9 ± 4,2</b>	<b>26,4 ± 13,8*</b>	<b>20,9 ± 4,9</b>	<b>24,0 ± 9,4*</b>	<b>19,5 ± 4,5</b>	<b>32,4 ± 12,3*</b>	<b>15,4 ± 6,3</b>	<b>20,2 ± 13,2*</b>
<b>Masse maigre</b> <b>(% poids total)</b>	<b>67,8 ± 3,7</b>	<b>62,4 ± 12,3*</b>	<b>65,3 ± 3,1</b>	<b>62,2 ± 7,8*</b>	<b>66,1 ± 3,7</b>	<b>56,2 ± 11,7*</b>	<b>72,3 ± 2,9</b>	<b>57,9 ± 11,2*</b>
<b>Glycémie 14-16</b> <b>(mM)*</b>	<b>8,3 ± 0,9</b>	<b>9,4 ± 2,0</b>	<b>8,7 ± 1,2</b>	<b>10,1 ± 0,8</b>	<b>9,2 ± 1,2</b>	<b>10,4 ± 1,2</b>	<b>8,9 ± 0,9</b>	<b>10,6 ± 1,0</b>
<b>Glycémie 18-20</b> <b>(mM)*</b>	<b>8,8 ± 1,0</b>	<b>9,8 ± 1,3</b>	<b>9,6 ± 0,9</b>	<b>10,1 ± 1,1</b>	<b>9,8 ± 0,8</b>	<b>11,1 ± 1,0</b>	<b>9,6 ± 1,4</b>	<b>12,0 ± 2,3</b>
<b>ASC<sub>oGTT20</sub></b> <b>(UA)</b>	<b>5736 ± 2055</b>	<b>5900 ± 1237</b>	<b>4854 ± 2150</b>	<b>5285 ± 1185</b>	<b>4636 ± 1920</b>	<b>4386 ± 1290</b>	<b>5170 ± 1608</b>	<b>4414 ± 3041</b>
<b>Insuline 18-20</b> <b>(ng/ml)*</b>	<b>1,8 ± 1,5</b>	<b>5,0 ± 3,2</b>	<b>1,4 ± 0,5</b>	<b>3,3 ± 1,8</b>	<b>1,4 ± 0,4</b>	<b>4,8 ± 2,1</b>	<b>1,0 ± 0,9</b>	<b>5,1 ± 2,5</b>

Des souris mâles ont été observées pendant 12 semaines sous HFD ou diète normale CHOW. Nourriture : quantité totale de nourriture consommée, convertie en Kcal. Sont rapportées la glycémie à jeun aux semaines 14-16 et 18-20, ainsi que L'ASC de la glycémie lors de l'oGTT (ASC<sub>oGTT20</sub>) et l'insulinémie aux semaines 18-20. Les résultats ont été comparés lors d'ANOVA à deux voies, avec le génotype et la diète comme facteurs, suivi de comparaisons appariées avec une correction de Tukey pour comparer l'effet du génotype au sein d'une même diète \* : CD vs HFD = p<0,05. & : WT vs GPR40KO p<0,05; \$ : WT vs GPR120KO p<0,05; # : WT vs DbleKO p<0,05; € : GPR40KO vs GPR120KO p<0,05; Θ : GPR40KO vs DbleKO p<0,05; ¥ : GPR120KO vs DbleKO p<0,05. Moyenne ± écart type.

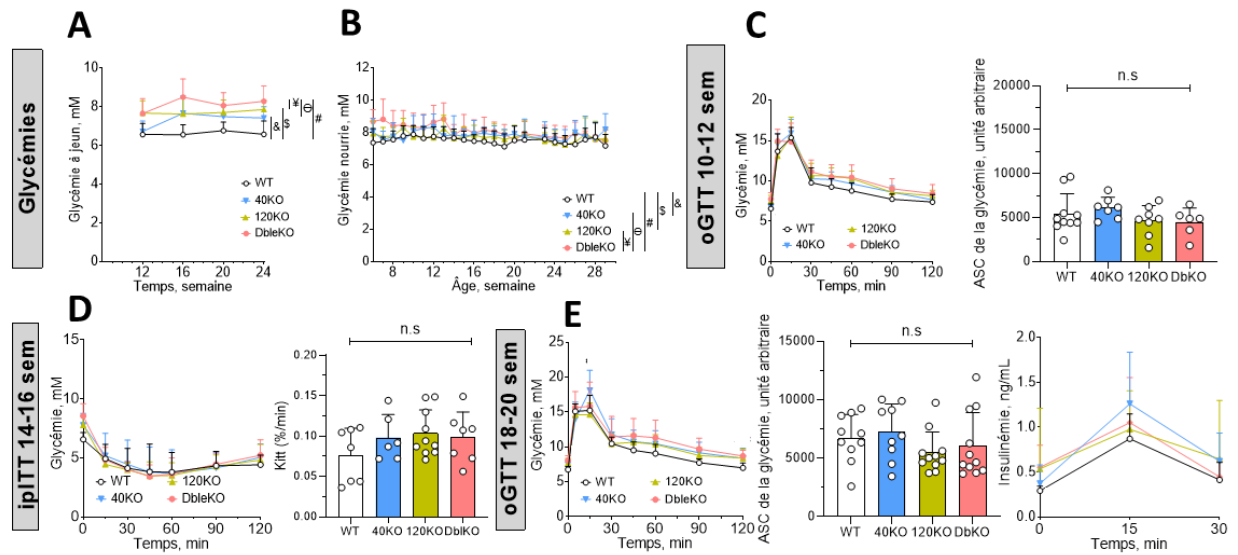


#### 2.1.4.2.4 Les souris femelles sous diète régulière (CHOW)



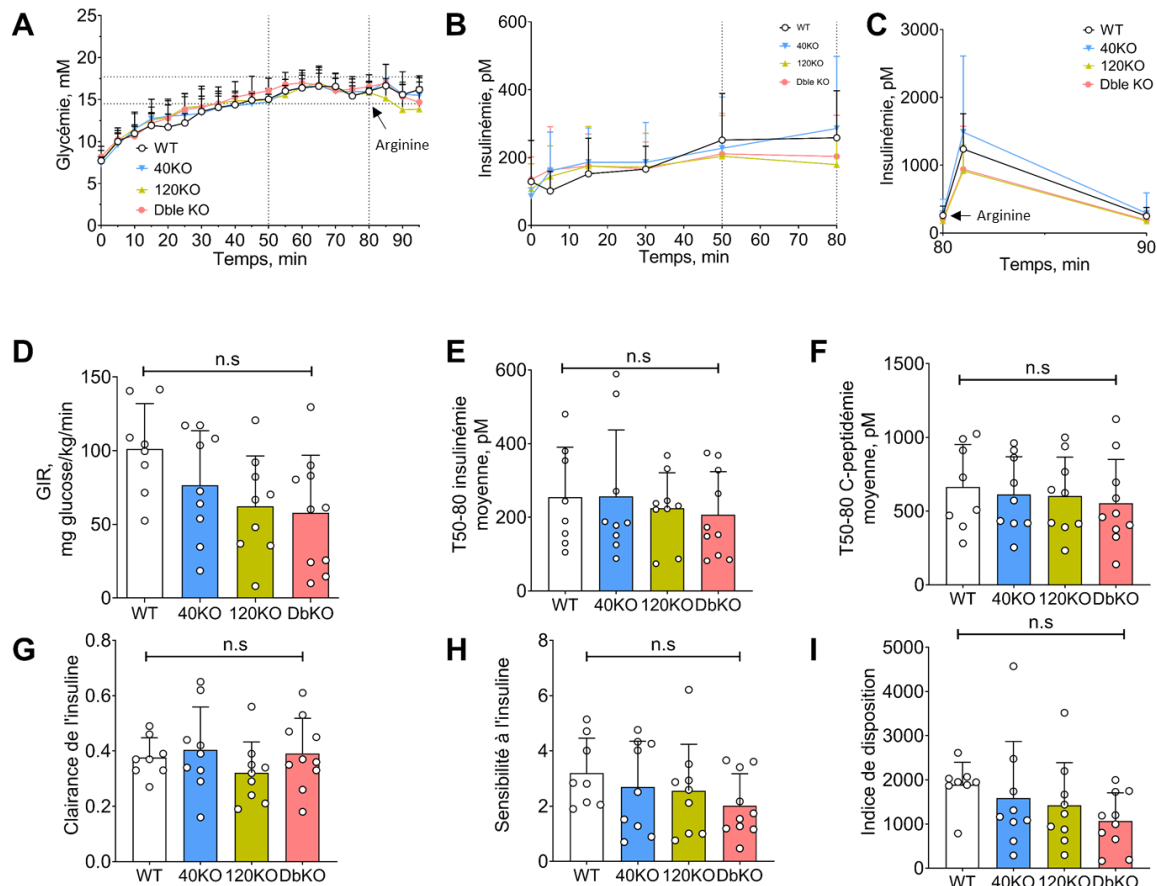
**Figure 16.** – Le récepteur à acides gras GPR120 participe à la régulation du poids chez la souris femelle. Dès 6 semaines, des souris femelles de souches C57BL/6N avec une délétion constitutive de GPR120 (GPR120KO), GPR40 (GPR40KO) ou une double délétion de GPR120 et GPR40 (DbleKO) ont été suivies pendant 24 semaines. Le poids (A) et la quantité de nourriture consommée ont été relevés hebdomadairement (B). La composition corporelle a été mesurée par IRM (C). Moyennes comparées par ANOVA à 2 voies pour mesures répétées suivies de comparaisons appariées avec une correction de Tukey lorsque qu'indiqué. Dans le cas d'interaction significative entre les facteurs temps et génotype, des comparaisons appariées avec une correction de Tukey ont permis d'étudier à chaque temps l'effet du génotype. Les groupes comptaient 9-11 souris. \$ : WT vs 120 KO  $p < 0,05$ . Moyenne  $\pm$  écart-type.

Chez la souris femelle, l'absence des récepteurs à acides gras a eu un effet plus important que pour les mâles. Le génotype influe sur la façon dont le poids des souris évolue au cours du temps ( $p < 0,005$ ) (Figure 16, A). Ces différences proviennent du fait que les souris GPR120KO sont significativement plus massives que les WT dès la première semaine du suivi ( $15,9 \pm 1,9$  g comparativement à  $19,0 \pm 1,3$  g) et cette tendance se confirme dans les 4 dernières semaines avant le sacrifice, quand les souris WT pèsent alors  $24,6 \pm 1,5$  g comparativement à  $28,1 \pm 3,7$  g pour les GPR120KO ( $p = 0,0615$ ). Le génotype influe aussi sur la masse grasse à la fin du suivi ( $p = 0,023$ ) (Figure 16, C), les souris GPR120KO ayant une plus grande masse grasse ( $23,7 \pm 6,9$  g) que leurs congénères WT ( $15,8 \pm 4,1$  g) ( $p = 0,012$ ) (Figure 16, C). Cette différence ne provient pas de la prise alimentaire (Figure 16, B).



**Figure 17.** – Les récepteurs à acides gras GPR120 et GPR40 participent au contrôle de la glycémie chez la souris femelle. Dès 6 semaines, des souris femelles de souches C57BL6N avec une délétion constitutive de GPR120 (GPR120KO), GPR40 (GPR40KO) ou une double délétion de GPR120 et GPR40 (DbleKO) ont été suivies pendant 24 semaines. La glycémie nourrie (B) et à jeun (A) ont été relevées régulièrement. Un test de tolérance à une dose de 1 g/kg de glucose (oGTT) a été réalisé chez les souris à 10-12 semaines (F) et 18-20 semaines (G), durant lesquels la glycémie a été relevée aux temps t=0, 15, 30, 45, 60, 90 et 120 minutes, et l’insulinémie mesurée aux temps t=0, 15 et 30 minutes, lorsqu’indiquée. La résistance à l’insuline a été mesurée avec l’injection i.p. d’une dose de 0,75 U/kg d’insuline et la glycémie relevée aux temps t=0, 5, 15, 30, 45, 60, 90 et 120 minutes. Le  $K_{itt}$  représente le taux de disparition de glucose du plasma. Moyennes comparées par ANOVA à une voie ou 2 voies pour mesures répétées suivies de comparaisons appariées des génotypes avec une correction de Tukey. Dans le cas d’interaction significative entre les facteurs temps et génotype, un post hoc de Tukey a permis de comparer à chaque temps l’effet du génotype. Les groupes comptaient 9-11 souris. # : WT vs DbleKO  $p < 0,05$  ; \$ : WT vs 120KO  $p < 0,05$  ; Θ : 40KO vs DbleKO  $p < 0,05$  ; ¥ : 120KO vs DbleKO  $p < 0,05$  ; & : WT vs 40KO  $p < 0,05$ . n.s : non significatif. Moyenne  $\pm$  écart-type.

Les récepteurs sont impliqués dans le contrôle de la glycémie. Le génotype influe sur la concentration de glucose dans le sang à jeun ( $p < 0,0001$ ), chaque génotype ayant une glycémie moyenne significativement différente des autres, excepté pour les GPR120 et GPR40KO qui ont une tendance non significative à différer ( $p = 0,062$ ). Une délétion de GPR40 ( $7,3 \pm 0,4$  mM) ou GPR120KO ( $7,7 \pm 0,1$  mM) cause une hyperglycémie similaire comparativement aux souris WT ( $6,6 \pm 0,1$  mM) ( $p < 0,001$ ). Cet effet est amplifié en l'absence des deux récepteurs avec une glycémie de  $8,1 \pm 0,4$  mM ( $p < 0,05$ ), suggérant un effet additif de GPR120 et GPR40 dans le métabolisme du glucose (Figure 17, A). Le même effet est observé avec la glycémie nourrie moyenne au cours du suivi ( $p < 0,005$ ) : La délétion de GPR40 ( $7,8 \pm 0,4$  mM) et GPR120 ( $7,7 \pm 0,2$  mM) cause une hyperglycémie par rapport aux souris WT ( $7,5 \pm 0,2$  mM) ( $p < 0,0001$  et  $p < 0,005$ , respectivement) (Figure 17, B). L'absence de différence entre les souris GPR120 et GPR40 ( $p = 0,375$ ) suggère que ces récepteurs sont similairement impliqués dans la régulation de la glycémie. De plus, la double délétion de GPR120 et GPR40 à un effet additif ( $8,1 \pm 0,4$  mM), et entraîne une glycémie moyenne significativement plus élevée que l'absence de GPR120 ( $p < 0,0001$ ) ou GPR40 ( $p < 0,05$ ). Pris ensemble, ces résultats montrent que chez les femelles, contrairement aux mâles, GPR120 et GPR40 ont un rôle complémentaire additif dans le maintien de la glycémie. Les oGTT à 10-12 et 18-20 semaines n'ont révélé aucun effet du génotype sur la tolérance au glucose, sur la capacité à sécréter de l'insuline en réponse à une glycémie élevée (Figure 17, C et E) ou sur la sensibilité à l'insuline mesurée lors d'un ipITT (Figure 17, D).



**Figure 18.** – Caractérisation de l'homéostasie du glucose lors d'un clamp hyperglycémique. Nous avons réalisé un clamp hyperglycémique durant lequel les souris femelles reçoivent une infusion de dextrose 10 % par un cathéter implanté dans la veine jugulaire. Une hyperglycémie entre 14,5 et 17,7 mM était maintenue entre t=50min et t= 80 min. Ensuite, les souris ont reçu une injection d'une dose de 1,25 g/kg de L-arginine (C). La glycémie (A) et l'insulinémie (B, C et E) ont été relevées tout au long du test ainsi que les niveaux de C-peptide durant la période de clamp (F). La quantité de glucose nécessaire à maintenir l'hyperglycémie est illustrée par le taux d'infusion de glucose (GIR, Figure D). La clairance de l'insuline (G) est le ratio d'insulinémie moyenne (E) et de la C-peptidémie moyenne durant la durée de clamp (F). La sensibilité à l'insuline (H) et le ratio de la quantité de glucose nécessaire pour maintenir l'hyperglycémie (D) sur l'insulinémie moyenne durant cette même période (E). L'indice de disposition est le produit de la sensibilité à l'insuline (H) sur la C-peptidémie (F) moyenne

durant la période de clamp. Les groupes comptaient 9-10 souris. n.s : non-significatif.  
Moyenne  $\pm$  écart-type.

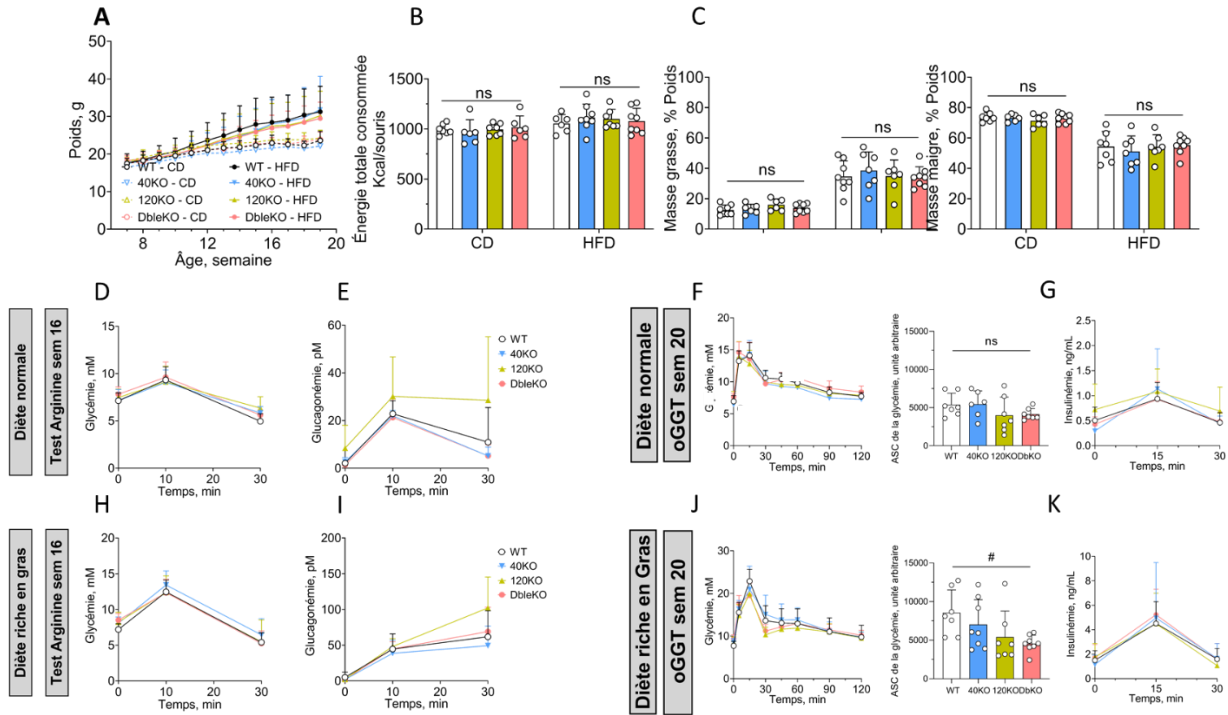
Lors du clamp hyperglycémique, nous n'avons observé aucun effet significatif du génotype sur le GIR (Figure 18, C), l'insulinémie (Figure 18, D), la C-peptidémie (Figure 18, E), la clairance de l'insuline (Figure 18, F), la sensibilité à l'insuline (Figure 18, G) ou l'indice de disposition de l'insuline (Figure 18, H). Cependant, il y a une tendance non significative du GIR à être différent selon le génotype ( $p=0,071$ ), un effet qui proviendrait de la différence dans la tolérance au glucose entre les souris WT ( $101,2 \pm 30,8$  mg/kg/min) et DbleKO ( $57,9 \pm 39,0$  mg/kg/min) ( $p=0,065$ ). Ces résultats suggèrent un rôle additif de GPR120 et GPR40 dans l'homéostasie du glucose, observés sur la glycémie. La tolérance au glucose semble plus faible chez les DbleKO lors du clamp, et la difficulté à clamer les souris rend l'analyse de la fonction sécrétoire des cellules  $\beta$  compliquée.

Tableau 3. – Étude du rôle des récepteurs aux acides gras GPR120 et GPR40 dans le métabolisme énergétique des souris femelles

	WT (n=10)	GPR40KO (n=9)	GPR120KO (n=11)	DbleKO (n=11)
Poids gagné (% poids initial)	53,1 ± 13,7	54,0 ± 13,3	54,5 ± 16,4	58,7 ± 20,4
Nourriture (Kcal totales)	1926 ± 110	1890 ± 120	1852 ± 168	1877 ± 160
Masse grasse (%poids total)	15,8 ± 4,1 <sup>§</sup>	19,1 ± 6,1	23,7 ± 6,9 <sup>§</sup>	20,2 ± 7,1
Masse maigre (%poids total)	71,3 ± 3,8 <sup>§</sup>	67,1 ± 6,1	63,6 ± 5,5 <sup>§</sup>	66,6 ± 6,3
Glycémie 10-12 (mmol/l)	6,6 ± 0,6 <sup>§,#</sup>	6,7 ± 0,5 <sup>€,</sup>	7,7 ± 0,6 <sup>€,\$</sup>	7,7 ± 0,8 <sup>#,</sup>
Glycémie 18-20 (mmol/l)	6,6 ± 0,7 <sup>§,#,&amp;</sup>	7,4 ± 0,6 <sup>&amp;</sup>	7,9 ± 0,5 <sup>§</sup>	8,3 ± 0,8 <sup>#</sup>
Insuline 18-20 (ng/ml)	0,3 ± 0,5	0,4 ± 0,2	0,5 ± 0,7	0,6 ± 0,2

GPR120 et GPR40 sont impliqués dans le maintien de la glycémie à jeun. Des souris femelles de souches C57BL/6N avec une délétion de GPR40 (GPR40KO), GPR120 (GPR120KO) ou les deux (DbleKO) ont été observées à partir de 6 semaines pendant 24 semaines, et comparées à leurs congénères WT. Les résultats ont été comparés par ANOVA à une voie, suivi de comparaisons appariées avec une correction de Tukey. # : WT vs DbleKO p<0,05 ; § : WT vs 120 KO p<0,05 ; € : 40 KO vs DbleKO p<0,05 ; € : 40 vs 120 KO p<0,05 ; & : WT vs 40 KO p<0,05. Moyenne ± écart-type.

### 2.1.4.2.5 Les souris femelles sous une diète riche en gras (HFD)



**Figure 19.** – La double délétion de GPR120 et GPR40 n’a pas d’effet majeur sur l’homéostasie du glucose chez la souris femelle sous HFD. Des souris femelles ont été observées pendant 12 semaines sous une HFD. En parallèle, un groupe contrôle consommait une diète régulière de laboratoire (CD). Le poids (A) et la quantité de nourriture consommée (B) ont été relevés hebdomadairement. La composition corporelle a été mesurée par échographie par résonance magnétique (echo-MRI) (C). La fonction des cellules  $\alpha$  a été évaluée lors d’un test de stimulation à une dose de 1,25 g/kg de L-arginine injectée i.p. La glycémie (D, H) et glucagonémie (E, I) ont été mesurées à t=0, 10 et 30 minutes. Un test de tolérance à une dose de 1 g/kg de glucose (oGTT) a été réalisé chez les souris à 20 semaines durant lesquels la glycémie a été relevée aux temps t=0, 15, 30, 45, 60, 90 et 120 minutes (F, J), et l’insulinémie mesurée aux temps t=0, 15 et 30 min (G, K). Les groupes comptaient 6-7 souris. n.s : non-significatif. Moyenne  $\pm$  écart-type.

Similairement à ce qui est observé chez les mâles, la diète HFD a rendu les souris obèses, indépendamment du génotype. Collectivement, les souris sous HFD ont un poids qui a augmenté de  $70,2 \pm 27,4\%$  après 12 semaines, comparativement à  $31,0 \pm 7,0\%$  pour les contrôles sous diète CHOW (Figure 19, A et Tableau 4). Les souris sous HFD avaient des masses grasses similaires (Figure 19, C) et avaient consommé autant de calories (Figure 19, B). La diète HFD a entraîné une augmentation de la glycémie chez les souris comparativement au contrôle à 16 semaines, cependant cet effet hyperglycémiant disparaît 4 semaines plus tard chez les WT, mais persévère chez les GPR40KO, GPR120KO et DbleKO (Tableau 4). Il est reconnu que la diète HFD chez des souris femelles C57BL/6N n'entraîne pas une hyperglycémie (175), et c'est ce que nous observons à la fin de notre étude chez les souris WT.

L'absence de GPR120 rend les souris femelles moins sensibles à la diète HFD. Nous ne notons pas d'effet du génotype sur la glycémie (Tableau 4). Lors du test de stimulation à l'arginine, nous n'observons pas d'effet du génotype sur la sécrétion de Glucagon (Figure 19, D à I). Comparativement aux souris contrôle, nous observons une hyperglucagonémie lors de ce test provoqué par la diète HFD. L'OGTT réalisé à la fin du suivi indique une différence dans la tolérance au glucose entre les génotypes (Figure 19, F à K) ( $p < 0,05$ ). De façon surprenante, les souris DbleKO semblent retirer plus vite le glucose de leur circulation ( $p = 0,05$ ) que leur congénères WT (Figures 19, F et J). Cette tendance est retrouvée chez les souris GPR120KO ( $p = 0,069$ ), l'absence de GPR120 semble donc être la cause de cet effet. En revanche, aucune différence n'est observée dans la sécrétion d'insuline pendant ce test, suggérant un début de Rés.I plutôt qu'une atteinte des cellules  $\beta$  (Figures 19, G et K). La diète HFD a rendu les souris plus intolérantes au glucose indépendamment du génotype ( $p = 0,05$ ).



Tableau 4. – Étude du rôle des récepteurs aux acides gras GPR120 et GPR40 dans le métabolisme énergétique des souris mâles sous diète HFD

	WT		GPR40KO		GPR120KO		DbleKO	
	CHOW(n=7)	HFD(n=7)	CHOW(n=6)	HFD(n=8)	CHOW(n=6)	HFD(n=7)	CHOW(n=8)	HFD(n=8)
<b>Gain de poids (% poids initial)</b>	<b>38,3 ± 10,0</b>	<b>80,2 ± 31,4*</b>	<b>35,6 ± 9,2</b>	<b>92,9 ± 46,6*</b>	<b>37,5 ± 8,3</b>	<b>84,1 ± 24,2</b>	<b>40,5 ± 5,3</b>	<b>70,6 ± 22,4</b>
<b>Nourriture (Kcal totales)</b>	<b>1021 ± 62</b>	<b>1053 ± 85</b>	<b>1021 ± 62</b>	<b>1090 ± 108</b>	<b>994 ± 126</b>	<b>1110 ± 137</b>	<b>1005 ± 98</b>	<b>1080 ± 128</b>
<b>Masse grasse (% poids total)</b>	<b>12,5 ± 3,3</b>	<b>24,9 ± 13,9*</b>	<b>13,2 ± 3,2</b>	<b>23,1 ± 12,9*</b>	<b>16,0 ± 3,9</b>	<b>21,8 ± 10,9*</b>	<b>13,9 ± 2,9</b>	<b>25,1 ± 13,4*</b>
<b>Masse maigre (% poids total)</b>	<b>73,7 ± 3,0</b>	<b>63,1 ± 11,9*</b>	<b>73,2 ± 2,3</b>	<b>64,7 ± 11,0*</b>	<b>71,3 ± 3,9</b>	<b>65,3 ± 9,5*</b>	<b>73,0 ± 3,1</b>	<b>62,3 ± 11,1*</b>
<b>Glycémie 14-16 (mM)*</b>	<b>7,1 ± 0,8</b>	<b>7,2 ± 0,8</b>	<b>7,1 ± 1,2</b>	<b>8,1 ± 0,9</b>	<b>7,5 ± 0,9</b>	<b>8,2 ± 1,4</b>	<b>7,8 ± 0,8</b>	<b>8,5 ± 0,9</b>
<b>Glycémie 18-20 (mM)*</b>	<b>6,9 ± 0,9</b>	<b>7,7 ± 1,0</b>	<b>6,6 ± 0,5</b>	<b>8,6 ± 0,9*</b>	<b>7,2 ± 1,1</b>	<b>8,5 ± 1,3*</b>	<b>7,8 ± 0,9</b>	<b>9,3 ± 1,0*</b>
<b>ASC<sub>oGTT</sub>20 * (UA)</b>	<b>5384 ± 1499</b>	<b>8557 ± 2943</b>	<b>3994 ± 2369</b>	<b>7016 ± 3227</b>	<b>5450 ± 1745</b>	<b>4237 ± 1558<sup>§</sup></b>	<b>4138 ± 750</b>	<b>4561 ± 1097<sup>#</sup></b>
<b>Insuline 18-20 (ng/ml)</b>	<b>0,5 ± 0,3</b>	<b>1,5 ± 0,8*</b>	<b>0,3 ± 0,1</b>	<b>1,2 ± 0,8</b>	<b>0,7 ± 0,5</b>	<b>1,6 ± 1,1</b>	<b>0,4 ± 0,2</b>	<b>1,7 ± 1,1*</b>

Des souris femelles ont été observées pendant 12 semaines sous HFD ou diète normale CHOW. L'effet de la diète HFD a été comparé à celui d'une diète normale CHOW. Les résultats ont été comparés lors d'ANOVA à deux voies, suivi de comparaisons appariées avec une correction de Tukey pour chaque diète. ASC<sub>oGTT</sub>20 : Air sous la courbe de la glycémie durant l'oGTT réalisé à 18-20 semaines. & : WT vs GPR40KO p<0,05; \$ : WT vs GPR120KO p<0,05; # : WT vs DbleKO p<0,05; € : GPR40KO vs GPR120KO p<0,05; θ : GPR40KO vs DbleKO p<0,05; ¥ : GPR120KO vs DbleKO. \* : CD vs HFD p<0,05. Moyenne ± écart type

## 2.1.5 Discussion et conclusions

### 2.1.5.1 L'activation de GPR120 dans les îlots de Langerhans *ex vivo* potentialise la sécrétion d'insuline

L'homéostasie du glucose est régulée par plusieurs signaux, dont le glucagon ainsi que l'insuline qui jouent des rôles cruciaux à cet égard. GPR120 est exprimé dans les cellules des îlots pancréatiques; il est activé par les acides gras à longue chaîne et est une cible thérapeutique considérée pour le DT2 de par ses effets sur le métabolisme et sa capacité à augmenter la sécrétion d'insuline par les îlots. Cependant, l'étude du rôle précis de GPR120 dans le métabolisme et la fonction des îlots est compliquée par l'existence de GPR40, un autre récepteur aux acides gras, et par le fait que GPR120 est exprimé dans les cellules principales des îlots :  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\delta$ . Les agonistes synthétiques spécifiques à GPR120 (CpdA et AZ13581837) potentialisent comme attendu la SISG et la sécrétion de glucagon en réponse à l'arginine. L'effet du CpdA sur la SISG disparaît chez les souris GPR120KO et est maintenu chez les souris GPR40KO, confirmant la spécificité de la molécule.

### 2.1.5.2 L'activation *in vivo* de GPR120 améliore la tolérance et la sécrétion d'insuline, en plus de potentialiser la sécrétion de glucagon

L'activation *in vivo* de GPR120 montre un effet positif du CpdA sur la tolérance et la sécrétion d'insuline en réponse au glucose, ainsi que la sécrétion de glucagon en réponse à une dose d'arginine. Oh et al. (176) avaient précédemment démontré que l'ingestion chronique de CpdA avec une diète obésogène riche en gras permettait, après 5 semaines d'améliorer la tolérance au glucose, la sensibilité à l'insuline et la sécrétion d'insuline comparativement à la diète HFD seule, un effet qui disparaît avec une délétion de GPR120. Nous montrons qu'une ingestion unique de CpdA améliore ces mêmes paramètres; l'efficacité d'une ingestion répétée reste à confirmer. En effet, il a suggéré qu'une ingestion quotidienne de CpdA à une dose 30 mg/kg tendance à diminuer la glycémie chez des souris mâle C57Bl/6J dans les premiers jours du traitement, mais que cet effet disparaît après 10 jours (177). Il a été rapporté que chez des souris GPR120KO, la sécrétion de glucagon, en réponse à l'arginine, était augmentée comparativement à des souris WT (108), ce qui suggère que l'activation de GPR120 dans les îlots diminue la sécrétion de

glucagon; cela va à l'encontre de nos observations avec le CpdA *in vivo*. Il est toutefois difficile de tirer des conclusions de ce test : à différents moments pendant ce dernier, la sécrétion d'insuline et de SST est augmentée. De plus, GPR120 est exprimé par les cellules entéroendocrines, où l'augmentation de la sécrétion de GLP-1 secondaire à l'activation de GPR120 dans ces cellules inhibe la sécrétion de glucagon et stimule la sécrétion d'insuline par les îlots (178). En parallèle, la sécrétion de CCK par les cellules entéro endocrines stimule directement la SISG, la sécrétion de glucagon en réponse au glucose ainsi que la SSRG (179). Mesurer la quantité de SST dans le plasma ne serait pas très indicatif de l'action directe du CpdA sur les îlots, la demi-vie de la protéine étant courte et la majorité étant l'isoforme SST-28 provenant des intestins. Il faudrait prélever du plasma directement dans la veine hépatique drainant le pancréas pour mesurer l'effet du CpdA sur la sécrétion de SST par les îlots *in vivo*. Nous montrons que l'activation de GPR120 dans les cellules  $\delta$  potentialise la sécrétion de glucagon et de SST, et la logique veut que ces effets proviennent en partie de la SST. Cependant, il faudrait utiliser un antagoniste compétitif de la SST, comme la cyclo-SST pour montrer que le récepteur à SST est impliqué. En effet, on ne peut pas exclure qu'un autre mécanisme soit impliqué; par exemple, les cellules  $\delta$  produisent aussi le PYY (180) qui a un effet inhibiteur direct sur la sécrétion d'insuline et de glucagon (181).

#### 2.1.5.3 L'activation de GPR120 *ex vivo* stimule la prolifération des $\beta$

L'activation de GPR120 dans les îlots stimule la prolifération des cellules  $\beta$ , possiblement en diminuant la relâche de SST, reconnue pour être un inhibiteur de la prolifération cellulaire, notamment des cellules  $\beta$  (174, 182). En inhibant la SISG, la SST inhiberait en même temps l'effet autocrine que l'insuline a sur la prolifération des cellules  $\beta$  (183). L'activation de GPR120 *in vivo* a été reliée à une augmentation du nombre de cellules  $\beta$ , un effet attribué à l'augmentation de la sécrétion de GLP-1 par les cellules entéroendocrines (184). Nous montrons ici qu'il y a aussi un effet direct de l'activation de GPR120 dans les îlots sur la prolifération des cellules  $\beta$ . Exposé au CpdA, nous observons une augmentation de la prolifération des cellules  $\beta$  dans les îlots isolés de souris WT. Nous supposons que cet effet prolifératif était secondaire à l'inhibition de la SST. Toutefois, nous n'observons pas de perte de l'effet du CpdA dans les îlots  $\delta$ 120KO. Il est possible que le CpdA active GPR120 directement sur les  $\beta$ , stimulant la prolifération de façon direct ou indirect en stimulant la sécrétion d'insuline. L'observation que GPR120 est surexprimé dans des

cellules cancéreuses et favorise leur prolifération, indique que GPR120 peut être directement impliqué dans la prolifération cellulaire (185). Il reste toutefois à étudier la prolifération des cellules  $\beta$  en réponse au CpdA sur des îlots isolés de souris GPR120KO pour confirmer que l'effet du CpdA sur la prolifération est bien dû à l'activation de GPR120.

#### 2.1.5.4 GPR120 est impliqué dans le contrôle de la glycémie à jeun et la réponse compensatoire des cellules $\beta$ à la résistance à l'insuline

Pour démêler les contributions respectives de GPR120 et GPR40 dans l'homéostasie du glucose *in vivo*, nous avons comparé les phénotypes métaboliques de souris avec une double délétion de GPR120 et GPR40 avec des souris ayant une simple délétion d'un de ces récepteurs. Notre étude est la première à étudier côte à côte ces trois génotypes, ainsi qu'à étudier l'influence du sexe. Nous n'observons pas d'effets majeurs sur le métabolisme énergétique chez les mâles DbleKO. Nous observons que les femelles GPR120KO ont une plus grande masse grasse que les WT et sont plus massives, similairement à ce qui est observé par Suckow et al. à 5 semaines (108). Cet effet pourrait être expliqué par un métabolisme basal plus bas, comme cela a été observé par calorimétrie indirecte par Ichimura et al. chez des juvéniles (186). L'absence de GPR120 a aussi été reliée à une augmentation de la taille des adipocytes, et stimuler GPR120 dans des adipocytes primaires inhibe la lipolyse ce qui pourrait expliquer la plus grande masse grasse observée (177, 186). Nos résultats suggèrent que GPR120 est impliqué dans l'homéostasie énergétique chez la femelle, contrairement aux mâles. Ces résultats sont surprenants étant donné que l'effet de la perte de GPR120 a précédemment été rapporté chez les mâles, mais provient peut-être des différentes souches de souris. En effet nos souris étaient de souches C57BL/6N tandis que pour Suckow et al. (108), par exemple, nous ne savons pas quelles souches de C57Bl/6 ont été utilisées. Nous montrons que la délétion de GPR120 et GPR40 entraîne une perturbation de l'homéostasie du glucose. La glycémie moyenne est significativement plus élevée chez les souris mâles et femelles en l'absence de GPR120 (GPR120KO et DbleKO). Chez le mâle, la délétion de GPR40 est sans effet sur la glycémie tandis que chez la femelle, l'absence de l'un ou l'autre des récepteurs a un effet semblable sur le contrôle de la glycémie, et l'absence des deux a un effet additif.

Nous n'observons pas d'hyperinsulinémie ni de différence dans la sensibilité à l'insuline. Un CHG nous permet d'observer une nette intolérance au glucose chez les souris mâles DbleKO par rapport au souris WT et 40KO (mesuré par le GIR), et cette tendance non significative se retrouve chez la femelle. Ces résultats sont cohérents avec les mesures de glycémie qui indiquent que GPR120 joue un rôle plus important que GPR40 dans l'homéostasie du glucose dans des conditions basales. Lors du CHG, l'insulinémie, la C-peptidémie, la clairance et la sensibilité à l'insuline ne diffèrent pas significativement entre les génotypes. L'indice de disposition, une mesure de la compensation de la Rés.I par les cellules  $\beta$  plus faible chez les souris DbleKO montre une altération de la fonction des cellules  $\beta$  et signifie que dans un contexte de Rés.I, ces souris vont sécréter moins d'insuline que leur congénères WT ou GPR40KO et seront moins aptes à compenser pour la Rés.I. Ces résultats sont cohérents avec l'observation que l'amélioration des mécanismes de signalisation cellulaire, en réponse aux lipides, sont impliqués dans la réponse compensatoire des cellules  $\beta$  à la Rés.I et suggèrent que GPR120 est nécessaire à ce processus (187). La combinaison du plus faible GIR chez les souris GPR120KO et DbleKO, sans altération de la production d'insuline ni de la clairance de l'insuline, avec une capacité compensatoire des cellules  $\beta$  diminuée, suggèrent qu'il y a une Rés.I. Pour évaluer la sensibilité à l'insuline, nous aurions pu faire un clamp hyperinsulinémique et euglycémique, pendant lequel la production de glucose hépatique est stoppée par l'infusion concomitante d'insuline. Malheureusement, il n'est pas réaliste de réaliser les deux tests : ils sont terminaux. Dans un cas, on veut mesurer la sécrétion d'insuline et dans l'autre, on veut mesurer la sensibilité à l'insuline en infusant de l'insuline. L'utilisation d'un traceur radioactif comme le (3-<sup>3</sup>H) glucose permettrait, durant le clamp, de localiser les organes captant moins de glucose et étant résistant à l'insuline. L'ipITT effectué à 14 semaines n'est pas très sensible et évalue la Rés.I indistinctement dans tous les organes. Le CHG, lui, n'est pas conçu pour mesurer la sensibilité à l'insuline. Il se peut, par exemple, qu'il y ait une Rés.I dans le foie, montrée en l'absence de GPR120 par Oh et al (97). Dans cet état, la néoglucogénèse n'est pas stoppée par l'insuline, et la production de glucose par le foie est maintenu malgré l'hyperglycémie.

2.1.5.5 L'activation de GPR120 dans les cellules  $\delta$  des îlots pancréatiques est responsable de l'action insulinothrompique et glucagonotopique de l'activation de GPR120 dans les îlots *ex vivo*.

Nous avons confirmé que GPR120 est impliqué dans la potentialisation de la SISG *ex vivo*. Il a été montré que la déplétion des AG en circulation inhibe la SISG et que les acides gras à longue chaînes stimulent la sécrétion d'insuline (188) et que l'amélioration des mécanismes de signalisation cellulaire, en réponse aux lipides, est impliqué dans la réponse compensatoire des cellules  $\beta$  à la Rés.I (187). Il se peut donc que l'absence de GPR120 inhibe en partie la GSIS lors du clamp. Dans l'étude de la signalisation GPR120 *ex vivo*, une nouveauté apportée par notre étude est de démontrer que la diminution de la sécrétion de SST observé en réponse à l'activation de GPR120, conformément aux résultats obtenus par Stone et al. (98), est concomitante à l'augmentation de la sécrétion d'insuline. Ces résultats suggèrent que l'inhibition de la sécrétion de SST pourrait causer l'augmentation de l'insuline. Suite à l'activation de GPR120 par le CpdA et en réponse à l'arginine, la sécrétion de glucagon augmente aussi, en concordance avec Suckow et al. (108), et la relâche de SST diminue en parallèle, ce qui renforce notre hypothèse. Grace à des îlots isolées de souris GPR120KO, nous montrons que l'effet du CpdA sur la sécrétion d'hormones provient de GPR120. En effet, en l'absence de GPR120, le CpdA est sans effet sur la sécrétion d'insuline, glucagon et SST. Une délétion de GPR120 spécifiquement dans les cellules  $\delta$  a le même effet qu'une délétion complète, avec une perte d'effet du CpdA sur la sécrétion d'insuline et de SST, ainsi qu'une diminution de son effet sur le glucagon. Ces résultats montrent que l'activation GPR120 dans les cellules  $\delta$  est responsable en grande partie de l'effet insulinothrompique et glucagonotropique de l'activation de GPR120 dans les îlots. Ces résultats sont cohérents avec différentes observations montrant que GPR120 est exprimé principalement dans les  $\delta$  des îlots, par immunohistochimie (98) et analyse transcriptomique (68). L'activation *in vivo* de GPR120 améliore la tolérance et la sécrétion d'insuline, en plus de potentialiser la sécrétion de glucagon.

#### 2.1.5.6 GPR120 et GPR40 n'ont pas de rôle complémentaire dans les l'homéostasie du glucose sous diète HFD.

Il est donc possible que la perturbation de la signalisation GPR120 dans les îlots joue un rôle dans la fonction des cellules  $\beta$  GPR120. Mais il y a de nombreuses pistes à explorer : il se peut, par exemple, qu'il y ait une Rés.I dans le foie, montrée en l'absence de GPR120 par Oh et al (97). Dans cet état, la néoglucogénèse n'est pas stoppée par l'insuline et la production de glucose par le foie est maintenue malgré l'hyperglycémie (108). GPR120 a surtout était impliqué dans le développement de l'obésité et des perturbations métaboliques qui y sont associées (186). L'absence de GPR120 a été associée à une réponse inflammatoire augmentée dérivée des adipocytes en favorisant la portion de macrophages de type M1 pro-inflammatoires (97) en plus d'augmenter la stéatose et diminuer la lipolyse hépatique. L'accumulation de gras dans les hépatocytes qui en découle entraine une Rés.I dans ce tissu (189). GPR120 est peu présent dans le foie et GPR120 est fortement exprimé dans les tissus adipeux, où il promeut l'adipogénèse des adipocytes blancs et bruns (190). Steneberg et al. furent les premiers à montrer qu'une délétion de GPR40 diminuait fortement la SISG en réponse à l'exposition chronique aux acides gras, et que la surexpression de GPR40 dans les cellules  $\beta$  protège les souris de l'hyperglycémie secondaire à une diète dont 58 % des calories proviennent du gras. En parallèle, une surexpression de GPR40 dans un modèle de souris diabétique (KK) augmente la tolérance au glucose et la sécrétion d'insuline, et des îlots isolés de ces souris montrent une SISG augmentée par rapport à des souris sauvages (191). Au contraire, d'autres études montrent une diminution de la tolérance au glucose sous une diète classique suite à une délétion de GPR40, une diminution de la sécrétion d'insuline en réponse au glucose ou à une injection de lipides, suggérant globalement une augmentation du risque de développer une dysfonction du métabolisme en absence de GPR40 (192-194).

Il est intéressant d'étudier, en parallèle les mâles et femelles, car ils répondent différemment à la diète HFD. Chez l'humain, la prévalence de l'obésité et de la Rés.I est plus faible chez la femme que chez l'homme, possiblement dû aux œstrogènes (195). Chez la souris, les femelles maintiennent une population de lymphocytes  $T_{reg}$  anti-inflammatoires plus importante que leurs congénères du sexe opposé et sont globalement protégées contre les perturbations métaboliques induites par la diète riche en gras (175). Les précédents travaux étudiant le rôle de GPR120 dans

le développement de l'obésité montrent qu'en réponse à une diète HFD, l'absence de GPR120 aggrave la stéatose hépatique. L'accumulation de gras dans les hépatocytes qui en découle entraîne une Rés.I dans ce tissu (189). Dans le foie, GPR120 est exprimé dans les cellules de Kupffer, et son activation par un agoniste (Omegaven®) favorise l'expression des marqueurs typiques des macrophages M2 anti-inflammatoires (196). Ces différentes études suggèrent un rôle anti-inflammatoire de GPR120, notamment dans le foie. Cependant, l'absence d'effet de la délétion de GPR120 sur le métabolisme du glucose en réponse à une diète riche en gras a aussi été rapportée (197, 198).

Notre étude ne montre pas d'effet de l'absence de GPR120 ni de GPR40 dans le développement de l'obésité. Les souris mâles deviennent toutes aussi obèses, développent une hyperglycémie peu importe le génotype. Chez les femelles, idem : on observe un gain de poids significativement plus important sous diète HFD et une augmentation de la glycémie à la fin du suivi. Nous observons chez la souris femelle, néanmoins, une meilleure tolérance au glucose lors de l'oGTT en l'absence de GPR120, sans différences dans la sécrétion d'insuline. Les souris DbleKO et GPR120KO semblent donc à ce point de vue moins sensibles à la diète HFD que leurs congénères. Différentes études faites chez des mâles rapportent au contraire que l'absence de GPR120 n'est pas reliée à un défaut de la régulation du métabolisme et nous sommes les premiers à étudier la réponse à la diète HFD chez des souris GPR120KO femelles. Ces souris femelles devenant aussi obèses et développant une hyperglycémie à jeun comparables à leurs congénères avec la diète HFD, il serait intéressant d'évaluer la tolérance au glucose lors d'un test d'hyperglycémie par voie i.p. qui permet une plus forte augmentation de la glycémie, ainsi que la sensibilité à l'insuline. Malheureusement, nous ne pouvons pas conclure sur la cause de cette tolérance améliorée en l'absence de GPR120. Ces résultats sont surprenants: si les souris femelles maintiennent un environnement anti-inflammatoire dans les tissus adipeux et que GPR120 dans ces tissus participe au maintien de cet environnement, on s'attendrait plutôt à une tolérance au glucose diminuée. L'effet de l'absence de GPR120 sur la tolérance au glucose reste toutefois mineur et globalement nous n'observons pas d'effet majeur de l'absence de GPR120 et GPR40 sur l'homéostasie du glucose en réponse à la diète HFD.



#### 2.1.5.7 Limites de l'étude

Une des limites de l'étude est la quantification de la SST sécrétée dans le milieu lors des expériences de sécrétion. En effet, la SST a une action paracrine sur des cellules en contact avec les cellules  $\delta$  à l'intérieur de l'îlot. La SST dans le milieu n'est donc pas un reflet exact de ce qui se passe dans l'îlot : il se peut que lorsque nous observons une diminution dans le milieu, cela ne corresponde pas directement à une diminution de l'action inhibitrice des cellules  $\delta$  sur les cellules  $\alpha$  et  $\beta$ . En effet, ceci expliquerait nos résultats de prolifération. Même si la SST semble un bon candidat pour expliquer l'action de l'activation de GPR120 dans les cellules  $\delta$ , il faudrait le confirmer avec un antagoniste des SSTR, comme la cyclo-SST, ou un anticorps dirigé spécifiquement contre les SSTR. Pour finir, la présence de la Cre-recombinase semble altérer la sécrétion de SST en réponse au glucose et à l'arginine.

Nous avons utilisé des souris avec une délétion constitutive des récepteurs GPR120 et GPR40. Il est possible qu'une compensation se fasse en l'absence de ces récepteurs et il serait intéressant et instructif d'utiliser un modèle où la délétion de GPR120 et GPR40 serait inducible par le tamoxifène, pour voir l'impact de la perte des récepteurs. Nous n'avons pas réussi à identifier la source de l'hyperglycémie à jeun observé en absence de GPR120. Le développement d'agonistes thérapeutiques de GPR40 a été grandement ralenti par peur de causer des dommages hépatiques. Nous n'avons pas étudié le devenir du CpdA *in vivo* et évalué sa toxicité.

#### 2.1.5.8 Perspectives et conclusions

Nous montrons que le récepteur aux acides GPR120 dans les cellules  $\delta$  potentialise la sécrétion d'insuline et de glucagon, probablement en diminuant la sécrétion de SST par les cellules  $\delta$ . De plus l'activation de GPR120 dans les îlots stimule la prolifération des cellules  $\beta$ . Ces deux stratégies sont envisagées dans le traitement du DT2 et favorisent un meilleur contrôle glycémique. Ajouté au fait que GPR120 semble jouer un plus grand rôle que GPR40 dans l'homéostasie du glucose, ces résultats contribueront à améliorer notre compréhension du rôle de la régulation de la fonction des îlots par les acides gras et des mécanismes d'action d'éventuels traitements antidiabétiques visant GPR120.

## Références bibliographiques

1. Rolfe DF, Brown GC. Cellular energy utilization and molecular origin of standard metabolic rate in mammals. 1997;77(3):731-58.
2. Cherrington A, Vranic M. Role of glucagon and insulin in control of glucose turnover. *Metabolism: clinical and experimental*. 1971;20(6):625-8.
3. Møller N, Jørgensen JOL. Effects of Growth Hormone on Glucose, Lipid, and Protein Metabolism in Human Subjects. *Endocrine Reviews*. 2009;30(2):152-77.
4. Kokka N, Eisenberg R, Garcia J, George R. Blood glucose, growth hormone, and cortisol levels after hypothalamic stimulation. 1972;222(2):296-301.
5. Sherwin RS, Sacca L. Effect of epinephrine on glucose metabolism in humans: contribution of the liver. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*. 1984;247(2):E157-E65.
6. Kaiser N, Sasson S, Feener EP, Boukobza-Vardi N, Higashi S, Moller DE, et al. Differential Regulation of Glucose Transport and Transporters by Glucose in Vascular Endothelial and Smooth Muscle Cells. 1993;42(1):80-9.
7. Heilig CW, Concepcion LA, Riser BL, Freytag SO, Zhu M, Cortes P. Overexpression of glucose transporters in rat mesangial cells cultured in a normal glucose milieu mimics the diabetic phenotype. *The Journal of clinical investigation*. 1995;96(4):1802-14.
8. Yagihashi S, Mizukami H, Sugimoto K. Mechanism of diabetic neuropathy: Where are we now and where to go? *J Diabetes Investig*. 2011;2(1):18-32.
9. Imran SA, Agarwal G, Bajaj HS, Ross S. Targets for Glycemic Control. *Canadian journal of diabetes*. 2018;42 Suppl 1:S42-s6.
10. Khan A, Pessin J. Insulin regulation of glucose uptake: a complex interplay of intracellular signalling pathways. *Diabetologia*. 2002;45(11):1475-83.
11. Dolensek J, Rupnik MS, Stozer A. Structural similarities and differences between the human and the mouse pancreas. *Islets*. 2015;7(1):e1024405.
12. Cabrera O, Berman DM, Kenyon NS, Ricordi C, Berggren P-O, Caicedo A. The unique cytoarchitecture of human pancreatic islets has implications for islet cell function. 2006;103(7):2334-9.
13. Orci L. The microanatomy of the islets of langerhans. *Metabolism: clinical and experimental*. 1976;25(11, Supplement):1303-13.
14. . !!! INVALID CITATION !!! {Cabrera, 2006 #51; Johnston, 2016 #283}.
15. Loppini A, Chiodo L. Biophysical modeling of  $\beta$ -cells networks: Realistic architectures and heterogeneity effects. *Biophysical Chemistry*. 2019;254:106247.
16. Bosco D, Armanet M, Morel P, Niclauss N, Sgroi A, Muller YD, et al. Unique arrangement of alpha- and beta-cells in human islets of Langerhans. *Diabetes*. 2010;59(5):1202-10.
17. Noguchi G, Huisin M. Integrating the inputs that shape pancreatic islet hormone release. *Nature Metabolism*. 2019;1:1189-201.
18. Rahier J, Wallon J, Henquin JC. Cell populations in the endocrine pancreas of human neonates and infants. *Diabetologia*. 1981;20(5):540-6.

19. Kim A, Miller K, Jo J, Kilimnik G, Wojcik P, Hara M. Islet architecture: A comparative study. *Islets*. 2009;1(2):129-36.
20. Bailyes EM, Shennan KI, Seal AJ, Smeekens SP, Steiner DF, Hutton JC, et al. A member of the eukaryotic subtilisin family (PC3) has the enzymic properties of the type 1 proinsulin-converting endopeptidase. *Biochem J*. 1992;285 ( Pt 2):391-4.
21. Bennett DL, Bailyes EM, Nielsen E, Guest PC, Rutherford NG, Arden SD, et al. Identification of the type 2 proinsulin processing endopeptidase as PC2, a member of the eukaryote subtilisin family. *The Journal of biological chemistry*. 1992;267(21):15229-36.
22. Wang Z, Thurmond DC. Mechanisms of biphasic insulin-granule exocytosis - roles of the cytoskeleton, small GTPases and SNARE proteins. *Journal of cell science*. 2009;122(Pt 7):893-903.
23. Knudsen L, De Meyts P, Kiselyov VV. Insight into the molecular basis for the kinetic differences between the two insulin receptor isoforms. *Biochem J*. 2011;440(3):397-403.
24. Belfiore A, Frasca F, Pandini G, Sciacca L, Vigneri R. Insulin receptor isoforms and insulin receptor/insulin-like growth factor receptor hybrids in physiology and disease. *Endocr Rev*. 2009;30(6):586-623.
25. Haeusler RA, McGraw TE, Accili D. Biochemical and cellular properties of insulin receptor signalling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2018;19(1):31-44.
26. Fujita S, Rasmussen BB, Cadenas JG, Grady JJ, Volpi E. Effect of insulin on human skeletal muscle protein synthesis is modulated by insulin-induced changes in muscle blood flow and amino acid availability. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2006;291(4):E745-E54.
27. Abdulla H, Smith K, Atherton PJ, Idris I. Role of insulin in the regulation of human skeletal muscle protein synthesis and breakdown: a systematic review and meta-analysis. *Diabetologia*. 2016;59(1):44-55.
28. Kraegen EW, James DE, Jenkins AB, Chisholm DJ. Dose-response curves for in vivo insulin sensitivity in individual tissues in rats. 1985;248(3):E353-E62.
29. Sindelar DK, Balcom JH, Chu CA, Neal DW, Cherrington AD. A Comparison of the Effects of Selective Increases in Peripheral or Portal insulin on Hepatic Glucose Production in the Conscious Dog. 1996;45(11):1594-604.
30. Cherrington AD, Edgerton D, Sindelar DK. The direct and indirect effects of insulin on hepatic glucose production in vivo. *Diabetologia*. 1998;41(9):987-96.
31. Prager R, Wallace P, Olefsky JM. Direct and indirect effects of insulin to inhibit hepatic glucose output in obese subjects. *Diabetes*. 1987;36(5):607-11.
32. Rubenstein AH, Clark JL, Melani F, Steiner DF. Secretion of Proinsulin C-Peptide by Pancreatic  $\beta$  Cells and its Circulation in Blood. *Nature*. 1969;224(5220):697-9.
33. Leighton E, Sainsbury CAR, Jones GC. A Practical Review of C-Peptide Testing in Diabetes. *Diabetes Therapy*. 2017;8(3):475-87.
34. Benner C, van der Meulen T, Cáceres E, Tigyi K, Donaldson CJ, Huising MO. The transcriptional landscape of mouse beta cells compared to human beta cells reveals notable species differences in long non-coding RNA and protein-coding gene expression. *BMC genomics*. 2014;15:620.
35. van der Meulen T, Donaldson CJ, Cáceres E, Hunter AE, Cowing-Zitron C, Pound LD, et al. Urocortin3 mediates somatostatin-dependent negative feedback control of insulin secretion. *Nature Medicine*. 2015;21(7):769-76.

36. Brissova M, Fowler MJ, Nicholson WE, Chu A, Hirshberg B, Harlan DM, et al. Assessment of human pancreatic islet architecture and composition by laser scanning confocal microscopy. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society*. 2005;53(9):1087-97.
37. Furuta M, Zhou A, Webb G, Carroll R, Ravazzola M, Orci L, et al. Severe defect in proglucagon processing in islet A-cells of prohormone convertase 2 null mice. *The Journal of biological chemistry*. 2001;276(29):27197-202.
38. Mojsov S, Heinrich G, Wilson IB, Ravazzola M, Orci L, Habener JF. Preproglucagon gene expression in pancreas and intestine diversifies at the level of post-translational processing. *The Journal of biological chemistry*. 1986;261(25):11880-9.
39. Svoboda M, Tastenoy M, Vertongen P, Robberecht P. Relative quantitative analysis of glucagon receptor mRNA in rat tissues. *Mol Cell Endocrinol*. 1994;105(2):131-7.
40. Ramnanan CJ, Edgerton DS, Kraft G, Cherrington AD. Physiologic action of glucagon on liver glucose metabolism. *Diabetes, obesity & metabolism*. 2011;13 Suppl 1:118-25.
41. J D McGarry a, Foster DW. Regulation of Hepatic Fatty Acid Oxidation and Ketone Body Production. *Annual Review of Biochemistry*. 1980;49(1):395-420.
42. Moens K, Flamez D, Van Schravendijk C, Ling Z, Pipeleers D, Schuit F. Dual glucagon recognition by pancreatic beta-cells via glucagon and glucagon-like peptide 1 receptors. *Diabetes*. 1998;47(1):66-72.
43. Zhu L, Dattaroy D, Pham J, Wang L, Barella LF, Cui Y, et al. Intra-islet glucagon signaling is critical for maintaining glucose homeostasis. *JCI Insight*. 2019;5.
44. Janah L, Kjeldsen S, Galsgaard KD, Winther-Sørensen M, Stojanovska E, Pedersen J, et al. Glucagon Receptor Signaling and Glucagon Resistance. *Int J Mol Sci*. 2019;20(13):3314.
45. Briant LJB, Reinbothe TM, Spiliotis I, Miranda C, Rodriguez B, Rorsman P.  $\delta$ -cells and  $\beta$ -cells are electrically coupled and regulate  $\alpha$ -cell activity via somatostatin. *J Physiol*. 2018;596(2):197-215.
46. Arrojo E Drigo R, Jacob S, García-Prieto CF, Zheng X, Fukuda M, Nhu HTT, et al. Structural basis for delta cell paracrine regulation in pancreatic islets. *Nat Commun*. 2019;10(1):3700-.
47. Roosterman D, Kempkes C, Cottrell GS, Padilla BE, Bunnett NW, Turck CW, et al. Endothelin-converting enzyme-1 degrades internalized somatostatin-14. *Endocrinology*. 2008;149:2200-7.
48. Patel YC, Greenwood MT, Warszynska A, Panetta R, Srikant CB. All five cloned human somatostatin receptors (hSSTR1-5) are functionally coupled to adenylyl cyclase. *Biochem Biophys Res Commun*. 1994;198(2):605-12.
49. Strowski MZ, Parmar RM, Blake AD, Schaeffer JM. Somatostatin Inhibits Insulin and Glucagon Secretion via Two Receptor Subtypes: An in Vitro Study of Pancreatic Islets from Somatostatin Receptor 2 Knockout Mice\*. *Endocrinology*. 2000;141(1):111-7.
50. Strowski MZ, Kohler M, Chen HY, Trumbauer ME, Li Z, Szalkowski D, et al. Somatostatin receptor subtype 5 regulates insulin secretion and glucose homeostasis. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md)*. 2003;17(1):93-106.
51. Cejvan K, Coy DH, Efendic S. Intra-Islet Somatostatin Regulates Glucagon Release via Type 2 Somatostatin Receptors in Rats. 2003;52(5):1176-81.

52. Adriaenssens AE, Svendsen B, Lam BY, Yeo GS, Holst JJ, Reimann F, et al. Transcriptomic profiling of pancreatic alpha, beta and delta cell populations identifies delta cells as a principal target for ghrelin in mouse islets. *Diabetologia*. 2016;59(10):2156-65.
53. Blodgett DM, Nowosielska A, Afik S, Pechhold S, Cura AJ, Kennedy NJ, et al. Novel Observations From Next-Generation RNA Sequencing of Highly Purified Human Adult and Fetal Islet Cell Subsets. *Diabetes*. 2015;64(9):3172-81.
54. Kailey B, Bunt Mvd, Cheley S, Johnson PR, MacDonald PE, Gloyn AL, et al. SSTR2 is the functionally dominant somatostatin receptor in human pancreatic  $\beta$ - and  $\alpha$ -cells. 2012;303(9):E1107-E16.
55. Iwanaga T, Miki T, Takahashi-Iwanaga H. Restricted expression of somatostatin receptor 3 to primary cilia in the pancreatic islets and adenohypophysis of mice. *Biomed Res*. 2011;32(1):73-81.
56. Hughes JW, Cho JH, Conway HE, DiGrucchio MR, Ng XW, Roseman HF, et al. Primary cilia control glucose homeostasis via islet paracrine interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2020.
57. Singh V, Brendel MD, Zacharias S, Mergler S, Jahr H, Wiedenmann B, et al. Characterization of Somatostatin Receptor Subtype-Specific Regulation of Insulin and Glucagon Secretion: An in Vitro Study on Isolated Human Pancreatic Islets. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2007;92(2):673-80.
58. Renstrom E, Ding WG, Bokvist K, Rorsman P. Neurotransmitter-induced inhibition of exocytosis in insulin-secreting beta cells by activation of calcineurin. *Neuron*. 1996;17(3):513-22.
59. Kailey B, van de Bunt M, Cheley S, Johnson PR, MacDonald PE, Gloyn AL, et al. SSTR2 is the functionally dominant somatostatin receptor in human pancreatic beta- and alpha-cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2012;303(9):E1107-16.
60. Rorsman P, Huising MO. The somatostatin-secreting pancreatic  $\delta$ -cell in health and disease. *Nature reviews Endocrinology*. 2018;14(7):404-14.
61. Wang X, Zielinski MC, Misawa R, Wen P, Wang T-Y, Wang C-Z, et al. Quantitative analysis of pancreatic polypeptide cell distribution in the human pancreas. *PloS one*. 2013;8(1):e55501-e.
62. Adrian TE, Besterman HS, Cooke TJ, Bloom SR, Barnes AJ, Russell RC. Mechanism of pancreatic polypeptide release in man. *Lancet (London, England)*. 1977;1(8004):161-3.
63. Aragón F, Karaca M, Novials A, Maldonado R, Maechler P, Rubí B. Pancreatic polypeptide regulates glucagon release through PPYR1 receptors expressed in mouse and human alpha-cells. *Biochim Biophys Acta*. 2015;1850(2):343-51.
64. Kim W, Fiori JL, Shin Y-K, Okun E, Kim JS, Rapp PR, et al. Pancreatic polypeptide inhibits somatostatin secretion. *FEBS Lett*. 2014;588(17):3233-9.
65. Kojima M, Kangawa K. Ghrelin: structure and function. *Physiological reviews*. 2005;85(2):495-522.
66. Wierup N, Svensson H, Mulder H, Sundler F. The ghrelin cell: a novel developmentally regulated islet cell in the human pancreas. *Regulatory peptides*. 2002;107(1-3):63-9.
67. Dezaki K, Hosoda H, Kakei M, Hashiguchi S, Watanabe M, Kangawa K, et al. Endogenous ghrelin in pancreatic islets restricts insulin release by attenuating  $Ca^{2+}$  signaling in beta-cells: implication in the glycemic control in rodents. *Diabetes*. 2004;53(12):3142-51.
68. DiGrucchio MR, Mawla AM, Donaldson CJ, Noguchi GM, Vaughan J, Cowing-Zitron C, et al. Comprehensive alpha, beta and delta cell transcriptomes reveal that ghrelin selectively activates

- delta cells and promotes somatostatin release from pancreatic islets. *Mol Metab.* 2016;5(7):449-58.
69. Dezaki K, Kakei M, Yada T. Ghrelin uses Galphai2 and activates voltage-dependent K<sup>+</sup> channels to attenuate glucose-induced Ca<sup>2+</sup> signaling and insulin release in islet beta-cells: novel signal transduction of ghrelin. *Diabetes.* 2007;56(9):2319-27.
70. Granata R, Settanni F, Biancone L, Trovato L, Nano R, Bertuzzi F, et al. Acylated and unacylated ghrelin promote proliferation and inhibit apoptosis of pancreatic beta-cells and human islets: involvement of 3',5'-cyclic adenosine monophosphate/protein kinase A, extracellular signal-regulated kinase 1/2, and phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt signaling. *Endocrinology.* 2007;148(2):512-29.
71. Skelin Klemen M, Dolensek J, Slak Rupnik M, Stozer A. The triggering pathway to insulin secretion: Functional similarities and differences between the human and the mouse beta cells and their translational relevance. *Islets.* 2017;9(6):109-39.
72. Rorsman P, Ashcroft FM. Pancreatic beta-Cell Electrical Activity and Insulin Secretion: Of Mice and Men. *Physiological reviews.* 2018;98(1):117-214.
73. Nittala A, Ghosh S, Wang X. Investigating the role of islet cytoarchitecture in its oscillation using a new beta-cell cluster model. *PLoS one.* 2007;2(10):e983-e.
74. Haumaitre C, Lenoir O, Scharfmann R. Directing cell differentiation with small-molecule histone deacetylase inhibitors: The example of promoting pancreatic endocrine cells. *Cell Cycle.* 2009;8(4):536-44.
75. MacDonald PE, De Marinis YZ, Ramracheya R, Salehi A, Ma X, Johnson PR, et al. A K ATP channel-dependent pathway within alpha cells regulates glucagon release from both rodent and human islets of Langerhans. *PLoS biology.* 2007;5(6):e143.
76. Lai BK, Chae H, Gomez-Ruiz A, Cheng P, Gallo P, Antoine N, et al. Somatostatin Is Only Partly Required for the Glucagonostatic Effect of Glucose but Is Necessary for the Glucagonostatic Effect of KATP Channel Blockers. *Diabetes.* 2018;67(11):2239-53.
77. Zhang Q, Bengtsson M, Partridge C, Salehi A, Braun M, Cox R, et al. R-type Ca<sup>2+</sup>-channel-evoked CICR regulates glucose-induced somatostatin secretion. *Nature cell biology.* 2007;9(4):453-60.
78. Rehfeld JF. The Origin and Understanding of the Incretin Concept. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2018;9:387-.
79. Inagaki N, Seino Y, Takeda J, Yano H, Yamada Y, Bell GI, et al. Gastric inhibitory polypeptide: structure and chromosomal localization of the human gene. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md).* 1989;3(6):1014-21.
80. Wheeler MB, Gelling RW, McIntosh CH, Georgiou J, Brown JC, Pederson RA. Functional expression of the rat pancreatic islet glucose-dependent insulinotropic polypeptide receptor: ligand binding and intracellular signaling properties. *Endocrinology.* 1995;136(10):4629-39.
81. Schmidt WE, Siegel EG, Creutzfeldt W. Glucagon-like peptide-1 but not glucagon-like peptide-2 stimulates insulin release from isolated rat pancreatic islets. *Diabetologia.* 1985;28(9):704-7.
82. Dimitriadis G, Mitrou P, Lambadiari V, Maratou E, Raptis SA. Insulin effects in muscle and adipose tissue. *Diabetes Research and Clinical Practice.* 2011;93:S52-S9.
83. Nicholson JK, Holmes E, Kinross J, Burcelin R, Gibson G, Jia W, et al. Host-Gut Microbiota Metabolic Interactions. *Science.* 2012;336(6086):1262-7.

84. Kimura I, Ichimura A, Ohue-Kitano R, Igarashi M. Free Fatty Acid Receptors in Health and Disease. *Physiological reviews*. 2019;100(1):171-210.
85. Hara T, Kimura I, Inoue D, Ichimura A, Hirasawa A. Free fatty acid receptors and their role in regulation of energy metabolism. *Reviews of physiology, biochemistry and pharmacology*. 2013;164:77-116.
86. Itoh Y, Kawamata Y, Harada M, Kobayashi M, Fujii R, Fukusumi S, et al. Free fatty acids regulate insulin secretion from pancreatic beta cells through GPR40. *Nature*. 2003;422(6928):173-6.
87. Ferdaoussi M, Bergeron V, Zarrouki B, Kolic J, Cantley J, Fielitz J, et al. G protein-coupled receptor (GPR)40-dependent potentiation of insulin secretion in mouse islets is mediated by protein kinase D1. *Diabetologia*. 2012;55(10):2682-92.
88. Shapiro H, Shachar S, Sekler I, Hershfinkel M, Walker MD. Role of GPR40 in fatty acid action on the beta cell line INS-1E. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005;335(1):97-104.
89. Usui R, Yabe D, Fauzi M, Goto H, Botagarova A, Tokumoto S, et al. GPR40 activation initiates store-operated Ca<sup>2+</sup> entry and potentiates insulin secretion via the IP3R1/STIM1/Orai1 pathway in pancreatic  $\beta$ -cells. *Scientific Reports*. 2019;9(1):15562.
90. Mancini AD, Bertrand G, Vivot K, Carpentier E, Tremblay C, Ghislain J, et al. beta-Arrestin Recruitment and Biased Agonism at Free Fatty Acid Receptor 1. *The Journal of biological chemistry*. 2015;290(34):21131-40.
91. Fujiwara K, Maekawa F, Yada T. Oleic acid interacts with GPR40 to induce Ca<sup>2+</sup> signaling in rat islet beta-cells: mediation by PLC and L-type Ca<sup>2+</sup> channel and link to insulin release. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2005;289(4):E670-7.
92. Edfalk S, Steneberg P, Edlund H. Gpr40 is expressed in enteroendocrine cells and mediates free fatty acid stimulation of incretin secretion. *Diabetes*. 2008;57(9):2280-7.
93. Cartoni C, Yasumatsu K, Ohkuri T, Shigemura N, Yoshida R, Godinot N, et al. Taste preference for fatty acids is mediated by GPR40 and GPR120. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2010;30(25):8376-82.
94. Mancini AD, Poirout V. The fatty acid receptor FFA1/GPR40 a decade later: how much do we know? *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*. 2013;24(8):398-407.
95. Hirasawa A, Tsumaya K, Awaji T, Katsuma S, Adachi T, Yamada M, et al. Free fatty acids regulate gut incretin glucagon-like peptide-1 secretion through GPR120. *Nat Med*. 2005;11(1):90-4.
96. Gotoh C, Hong YH, Iga T, Hishikawa D, Suzuki Y, Song SH, et al. The regulation of adipogenesis through GPR120. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007;354(2):591-7.
97. Oh DY, Talukdar S, Bae EJ, Imamura T, Morinaga H, Fan W, et al. GPR120 Is an Omega-3 Fatty Acid Receptor Mediating Potent Anti-inflammatory and Insulin-Sensitizing Effects. *Cell*. 2010;142(5):687-98.
98. Stone VM, Dhayal S, Brocklehurst KJ, Lenaghan C, Sorhede Winzell M, Hammar M, et al. GPR120 (FFAR4) is preferentially expressed in pancreatic delta cells and regulates somatostatin secretion from murine islets of Langerhans. *Diabetologia*. 2014;57(6):1182-91.
99. Burns RN, Moniri NH. Agonism with the omega-3 fatty acids  $\alpha$ -linolenic acid and docosahexaenoic acid mediates phosphorylation of both the short and long isoforms of the human GPR120 receptor. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2010;396(4):1030-5.

100. Tsukahara T, Watanabe K, Watanabe T, Yamagami H, Sogawa M, Tanigawa T, et al. Tumor Necrosis Factor  $\alpha$  Decreases Glucagon-Like Peptide-2 Expression by Up-Regulating G-Protein–Coupled Receptor 120 in Crohn Disease. *The American Journal of Pathology*. 2015;185(1):185-96.
101. Hilgendorf KI, Johnson CT, Mezger A, Rice SL, Norris AM, Demeter J, et al. Omega-3 Fatty Acids Activate Ciliary FFAR4 to Control Adipogenesis. *Cell*. 2019;179(6):1289-305.e21.
102. Engelstoft MS, Park W-m, Sakata I, Kristensen LV, Husted AS, Osborne-Lawrence S, et al. Seven transmembrane G protein-coupled receptor repertoire of gastric ghrelin cells. *Mol Metab*. 2013;2(4):376-92.
103. Tanaka T, Katsuma S, Adachi T, Koshimizu TA, Hirasawa A, Tsujimoto G. Free fatty acids induce cholecystinin secretion through GPR120. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 2008;377(4-6):523-7.
104. Watson SJ, Brown AJ, Holliday ND. Differential signaling by splice variants of the human free fatty acid receptor GPR120. *Molecular pharmacology*. 2012;81(5):631-42.
105. Mo X-L, Wei H-K, Peng J, Tao Y-X. Chapter Seven - Free Fatty Acid Receptor GPR120 and Pathogenesis of Obesity and Type 2 Diabetes Mellitus. In: Tao Y-X, editor. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*. 114: Academic Press; 2013. p. 251-76.
106. MacDonald PE, El-Kholy W, Riedel MJ, Salapatek AM, Light PE, Wheeler MB. The multiple actions of GLP-1 on the process of glucose-stimulated insulin secretion. *Diabetes*. 2002;51 Suppl 3:S434-42.
107. Sundstrom L, Myhre S, Sundqvist M, Ahnmark A, McCoull W, Raubo P, et al. The acute glucose lowering effect of specific GPR120 activation in mice is mainly driven by glucagon-like peptide 1. *PloS one*. 2017;12(12):e0189060.
108. Suckow AT, Polidori D, Yan W, Chon S, Ma JY, Leonard J, et al. Alteration of the glucagon axis in GPR120 (FFAR4) knockout mice: a role for GPR120 in glucagon secretion. *The Journal of biological chemistry*. 2014;289(22):15751-63.
109. Zhang X, Cai C, Sui Z, Macielag M, Wang Y, Yan W, et al. Discovery of an Isothiazole-Based Phenylpropanoic Acid GPR120 Agonist as a Development Candidate for Type 2 Diabetes. *ACS Med Chem Lett*. 2017;8(9):947-52.
110. Moran BM, Abdel-Wahab YHA, Flatt PR, McKillop AM. Evaluation of the insulin-releasing and glucose-lowering effects of GPR120 activation in pancreatic  $\beta$ -cells. 2014;16(11):1128-39.
111. Worldwide trends in diabetes since 1980: a pooled analysis of 751 population-based studies with 4.4 million participants. *Lancet (London, England)*. 2016;387(10027):1513-30.
112. Punthakee Z, Goldenberg R, Katz P. Definition, Classification and Diagnosis of Diabetes, Prediabetes and Metabolic Syndrome. *Canadian journal of diabetes*. 2018;42 Suppl 1:S10-s5.
113. Paschou SA, Petsiou A, Chatzigianni K, Tsatsoulis A, Papadopoulos GK. Type 1 diabetes as an autoimmune disease: the evidence. *Diabetologia*. 2014;57(7):1500-1.
114. Ziegler AG, Rewers M, Simell O, Simell T, Lempainen J, Steck A, et al. Seroconversion to multiple islet autoantibodies and risk of progression to diabetes in children. *JAMA*. 2013;309(23):2473-9.
115. Beyan H, Riese H, Hawa MI, Beretta G, Davidson HW, Hutton JC, et al. Glycotoxin and autoantibodies are additive environmentally determined predictors of type 1 diabetes: a twin and population study. *Diabetes*. 2012;61(5):1192-8.



116. Redondo MJ, Jeffrey J, Fain PR, Eisenbarth GS, Orban T. Concordance for islet autoimmunity among monozygotic twins. *The New England journal of medicine*. 2008;359(26):2849-50.
117. Yoon JW, Austin M, Onodera T, Notkins AL. Isolation of a virus from the pancreas of a child with diabetic ketoacidosis. *The New England journal of medicine*. 1979;300(21):1173-9.
118. Menser MA, Forrest JM, Bransby RD. Rubella infection and diabetes mellitus. *Lancet (London, England)*. 1978;1(8055):57-60.
119. Melendez-Ramirez LY, Richards RJ, Cefalu WT. Complications of type 1 diabetes. *Endocrinology and metabolism clinics of North America*. 2010;39(3):625-40.
120. Lind M, Svensson AM, Rosengren A. Glycemic control and excess mortality in type 1 diabetes. *The New England journal of medicine*. 2015;372(9):880-1.
121. Catalano PM, Tyzbir ED, Roman NM, Amini SB, Sims EA. Longitudinal changes in insulin release and insulin resistance in nonobese pregnant women. *American journal of obstetrics and gynecology*. 1991;165(6 Pt 1):1667-72.
122. Parsons JA, Brelje TC, Sorenson RL. Adaptation of islets of Langerhans to pregnancy: increased islet cell proliferation and insulin secretion correlates with the onset of placental lactogen secretion. *Endocrinology*. 1992;130(3):1459-66.
123. Metzger BE, Coustan DR. Summary and recommendations of the Fourth International Workshop-Conference on Gestational Diabetes Mellitus. The Organizing Committee. *Diabetes care*. 1998;21 Suppl 2:B161-7.
124. Clausen TD, Mathiesen ER, Hansen T, Pedersen O, Jensen DM, Lauenborg J, et al. Overweight and the metabolic syndrome in adult offspring of women with diet-treated gestational diabetes mellitus or type 1 diabetes. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2009;94(7):2464-70.
125. Clausen TD, Mathiesen ER, Hansen T, Pedersen O, Jensen DM, Lauenborg J, et al. High prevalence of type 2 diabetes and pre-diabetes in adult offspring of women with gestational diabetes mellitus or type 1 diabetes: the role of intrauterine hyperglycemia. *Diabetes care*. 2008;31(2):340-6.
126. Daly B, Toulis KA, Thomas N, Gokhale K, Martin J, Webber J, et al. Increased risk of ischemic heart disease, hypertension, and type 2 diabetes in women with previous gestational diabetes mellitus, a target group in general practice for preventive interventions: A population-based cohort study. *PLoS Med*. 2018;15(1):e1002488-e.
127. Zhu Y, Zhang C. Prevalence of Gestational Diabetes and Risk of Progression to Type 2 Diabetes: a Global Perspective. *Current Diabetes Reports*. 2016;16(1):7.
128. Ellard S, Bellanné-Chantelot C, Hattersley AT. Best practice guidelines for the molecular genetic diagnosis of maturity-onset diabetes of the young. *Diabetologia*. 2008;51(4):546-53.
129. Osbak KK, Colclough K, Saint-Martin C, Beer NL, Bellanné-Chantelot C, Ellard S, et al. Update on mutations in glucokinase (GCK), which cause maturity-onset diabetes of the young, permanent neonatal diabetes, and hyperinsulinemic hypoglycemia. *Human mutation*. 2009;30(11):1512-26.
130. Owen KR, Roland J, Smith K, Hattersley AT. Adolescent onset Type 2 diabetes in a non-obese Caucasian patient with an unbalanced translocation. *Diabetic medicine : a journal of the British Diabetic Association*. 2003;20(6):483-5.

131. Shields BM, Hicks S, Shepherd MH, Colclough K, Hattersley AT, Ellard S. Maturity-onset diabetes of the young (MODY): how many cases are we missing? *Diabetologia*. 2010;53(12):2504-8.
132. Groop LC, Bonadonna RC, DelPrato S, Ratheiser K, Zyck K, Ferrannini E, et al. Glucose and free fatty acid metabolism in non-insulin-dependent diabetes mellitus. Evidence for multiple sites of insulin resistance. *The Journal of clinical investigation*. 1989;84(1):205-13.
133. Pendergrass M, Bertoldo A, Bonadonna R, Nucci G, Mandarino L, Cobelli C, et al. Muscle glucose transport and phosphorylation in type 2 diabetic, obese nondiabetic, and genetically predisposed individuals. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2007;292(1):E92-100.
134. Gastaldelli A, Gaggini M, DeFronzo RA. Role of Adipose Tissue Insulin Resistance in the Natural History of Type 2 Diabetes: Results From the San Antonio Metabolism Study. *Diabetes*. 2017;66(4):815-22.
135. Diamond MP, Thornton K, Connolly-Diamond M, Sherwin RS, DeFronzo RA. Reciprocal variations in insulin-stimulated glucose uptake and pancreatic insulin secretion in women with normal glucose tolerance. *Journal of the Society for Gynecologic Investigation*. 1995;2(5):708-15.
136. Lillioja S, Mott DM, Spraul M, Ferraro R, Foley JE, Ravussin E, et al. Insulin resistance and insulin secretory dysfunction as precursors of non-insulin-dependent diabetes mellitus. Prospective studies of Pima Indians. *The New England journal of medicine*. 1993;329(27):1988-92.
137. Bergman RN, Finegood DT, Kahn SE. The evolution of beta-cell dysfunction and insulin resistance in type 2 diabetes. *European journal of clinical investigation*. 2002;32 Suppl 3:35-45.
138. Chen C, Cohrs CM, Stertmann J, Bozsak R, Speier S. Human beta cell mass and function in diabetes: Recent advances in knowledge and technologies to understand disease pathogenesis. *Mol Metab*. 2017;6(9):943-57.
139. Brown MS, Goldstein JL. Selective versus total insulin resistance: a pathogenic paradox. *Cell Metab*. 2008;7(2):95-6.
140. Rytka JM, Wueest S, Schoenle EJ, Konrad D. The portal theory supported by venous drainage-selective fat transplantation. *Diabetes*. 2011;60(1):56-63.
141. Hirosumi J, Tuncman G, Chang L, Gorgun CZ, Uysal KT, Maeda K, et al. A central role for JNK in obesity and insulin resistance. *Nature*. 2002;420(6913):333-6.
142. Sharma RB, Alonso LC. Lipotoxicity in the pancreatic beta cell: not just survival and function, but proliferation as well? *Curr Diab Rep*. 2014;14(6):492.
143. Richieri GV, Kleinfeld AM. Unbound free fatty acid levels in human serum. *Journal of lipid research*. 1995;36(2):229-40.
144. Steil GM, Trivedi N, Jonas JC, Hasenkamp WM, Sharma A, Bonner-Weir S, et al. Adaptation of beta-cell mass to substrate oversupply: enhanced function with normal gene expression. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2001;280(5):E788-96.
145. Giacca A, Xiao C, Oprescu AI, Carpentier AC, Lewis GF. Lipid-induced pancreatic  $\beta$ -cell dysfunction: focus on in vivo studies. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2011;300(2):E255-62.
146. Prentki M, Corkey BE. Are the  $\beta$ -Cell Signaling Molecules Malonyl-CoA and Cystolic Long-Chain Acyl-CoA Implicated in Multiple Tissue Defects of Obesity and NIDDM? *Diabetes*. 1996;45(3):273-83.

147. Fontés G, Zarrouki B, Hagman DK, Latour MG, Semache M, Roskens V, et al. Glucolipotoxicity age-dependently impairs beta cell function in rats despite a marked increase in beta cell mass. *Diabetologia*. 2010;53(11):2369-79.
148. Leung N, Sakaue T, Carpentier A, Uffelman K, Giacca A, Lewis GF. Prolonged increase of plasma non-esterified fatty acids fully abolishes the stimulatory effect of 24 hours of moderate hyperglycaemia on insulin sensitivity and pancreatic beta-cell function in obese men. *Diabetologia*. 2004;47(2):204-13.
149. Carpentier A, Giacca A, Lewis GF. Effect of increased plasma non-esterified fatty acids (NEFAs) on arginine-stimulated insulin secretion in obese humans. *Diabetologia*. 2001;44(11):1989-97.
150. Marchetti P, Del Guerra S, Marselli L, Lupi R, Masini M, Pollera M, et al. Pancreatic Islets from Type 2 Diabetic Patients Have Functional Defects and Increased Apoptosis That Are Ameliorated by Metformin. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2004;89(11):5535-41.
151. Tanaka Y, Gleason CE, Tran PO, Harmon JS, Robertson RP. Prevention of glucose toxicity in HIT-T15 cells and Zucker diabetic fatty rats by antioxidants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1999;96(19):10857-62.
152. Westermark P, Wilander E. The influence of amyloid deposits on the islet volume in maturity onset diabetes mellitus. *Diabetologia*. 1978;15(5):417-21.
153. Lang DA, Matthews DR, Burnett M, Turner RC. Brief, Irregular Oscillations of Basal Plasma Insulin and Glucose Concentrations in Diabetic Man. 1981;30(5):435-9.
154. BRUNZELL JD, ROBERTSON RP, LERNER RL, HAZZARD WR, ENSINCK JW, BIERMAN EL, et al. Relationships Between Fasting Plasma Glucose Levels and Insulin Secretion During Intravenous Glucose Tolerance Tests. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 1976;42(2):222-9.
155. Accili D, Talchai SC, Kim-Muller JY, Cinti F, Ishida E, Ordelheide AM, et al. When beta-cells fail: lessons from dedifferentiation. *Diabetes, obesity & metabolism*. 2016;18 Suppl 1:117-22.
156. Segerstolpe Å, Palasantza A, Eliasson P, Andersson E-M, Andréasson A-C, Sun X, et al. Single-Cell Transcriptome Profiling of Human Pancreatic Islets in Health and Type 2 Diabetes. *Cell metabolism*. 2016;24(4):593-607.
157. Talchai C, Xuan S, Lin HV, Sussel L, Accili D. Pancreatic beta cell dedifferentiation as a mechanism of diabetic beta cell failure. *Cell*. 2012;150(6):1223-34.
158. Larsson H, Ahren B. Islet dysfunction in insulin resistance involves impaired insulin secretion and increased glucagon secretion in postmenopausal women with impaired glucose tolerance. *Diabetes care*. 2000;23(5):650-7.
159. Baron AD, Schaeffer L, Shragg P, Kolterman OG. Role of hyperglucagonemia in maintenance of increased rates of hepatic glucose output in type II diabetics. *Diabetes*. 1987;36(3):274-83.
160. Henquin J-C, Ibrahim MM, Rahier J. Insulin, glucagon and somatostatin stores in the pancreas of subjects with type-2 diabetes and their lean and obese non-diabetic controls. *Scientific Reports*. 2017;7(1):11015.
161. Guardado Mendoza R, Perego C, Finzi G, La Rosa S, Capella C, Jimenez-Ceja LM, et al. Delta cell death in the islet of Langerhans and the progression from normal glucose tolerance to type 2 diabetes in non-human primates (baboon, *Papio hamadryas*). *Diabetologia*. 2015;58(8):1814-26.

162. Folli F, La Rosa S, Finzi G, Davalli AM, Galli A, Dick EJ, Jr., et al. Pancreatic islet of Langerhans' cytoarchitecture and ultrastructure in normal glucose tolerance and in type 2 diabetes mellitus. *Diabetes, obesity & metabolism*. 2018;20 Suppl 2:137-44.
163. Schusdziarra V, Dobbs RE, Harris V, Unger RH. Immunoreactive somatostatin levels in plasma of normal and alloxan diabetic dogs. *FEBS Lett*. 1977;81(1):69-72.
164. Sriram K, Insel PA. G Protein-Coupled Receptors as Targets for Approved Drugs: How Many Targets and How Many Drugs? *Molecular pharmacology*. 2018;93(4):251-8.
165. Marcinak JF, Munsaka MS, Watkins PB, Ohira T, Smith N. Liver Safety of Fasiglifam (TAK-875) in Patients with Type 2 Diabetes: Review of the Global Clinical Trial Experience. *Drug Saf*. 2018;41(6):625-40.
166. Li T, Jiao W, Li W, Li H. Sex effect on insulin secretion and mitochondrial function in pancreatic beta cells of elderly Wistar rats. *Endocrine research*. 2016;41(3):167-79.
167. Lopes Da Costa C, Sampaio De Freitas M, Sanchez Moura A. Insulin secretion and GLUT-2 expression in undernourished neonate rats. *The Journal of nutritional biochemistry*. 2004;15(4):236-41.
168. Gotoh M, Maki T, Satomi S, Porter J, Bonner-Weir S, O'Hara CJ, et al. Reproducible high yield of rat islets by stationary in vitro digestion following pancreatic ductal or portal venous collagenase injection. *Transplantation*. 1987;43(5):725-30.
169. Moullé VS, Vivot K, Tremblay C, Zarrouki B, Ghislain J, Poitout V. Glucose and fatty acids synergistically and reversibly promote beta cell proliferation in rats. *Diabetologia*. 2017;60(5):879-88.
170. Keane DC, Takahashi HK, Dhayal S, Morgan NG, Curi R, Newsholme P. Arachidonic acid actions on functional integrity and attenuation of the negative effects of palmitic acid in a clonal pancreatic  $\beta$ -cell line. *Clin Sci (Lond)*. 2011;120(5):195-206.
171. Xu G, Stoffers DA, Habener JF, Bonner-Weir S. Exendin-4 stimulates both beta-cell replication and neogenesis, resulting in increased beta-cell mass and improved glucose tolerance in diabetic rats. *Diabetes*. 1999;48(12):2270-6.
172. Yoshitomi H, Fujii Y, Miyazaki M, Nakajima N, Inagaki N, Seino S. Involvement of MAP kinase and c-fos signaling in the inhibition of cell growth by somatostatin. *Am J Physiol*. 1997;272(5 Pt 1):E769-74.
173. Vivot K, Moullé VS, Zarrouki B, Tremblay C, Mancini AD, Maachi H, et al. The regulator of G-protein signaling RGS16 promotes insulin secretion and  $\beta$ -cell proliferation in rodent and human islets. *Mol Metab*. 2016;5(10):988-96.
174. Berger M, Scheel DW, Macias H, Miyatsuka T, Kim H, Hoang P, et al. Gai/o-coupled receptor signaling restricts pancreatic  $\beta$ -cell expansion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2015;112(9):2888-93.
175. Pettersson US, Waldén TB, Carlsson P-O, Jansson L, Phillipson M. Female mice are protected against high-fat diet induced metabolic syndrome and increase the regulatory T cell population in adipose tissue. *PloS one*. 2012;7(9):e46057-e.
176. Oh DY, Walenta E, Akiyama TE, Lagakos WS, Lackey D, Pessenheiner AR, et al. A Gpr120-selective agonist improves insulin resistance and chronic inflammation in obese mice. *Nature medicine*. 2014;20(8):942-7.

177. Satapati S, Qian Y, Wu MS, Petrov A, Dai G, Wang S-P, et al. GPR120 suppresses adipose tissue lipolysis and synergizes with GPR40 in antidiabetic efficacy. *Journal of lipid research*. 2017;58(8):1561-78.
178. Ramracheya R, Chapman C, Chibalina M, Dou H, Miranda C, González A, et al. GLP-1 suppresses glucagon secretion in human pancreatic alpha-cells by inhibition of P/Q-type Ca(2+) channels. *Physiol Rep*. 2018;6(17):e13852-e.
179. Ning SL, Zheng WS, Su J, Liang N, Li H, Zhang DL, et al. Different downstream signalling of CCK1 receptors regulates distinct functions of CCK in pancreatic beta cells. *British journal of pharmacology*. 2015;172(21):5050-67.
180. Atanes P, Ruz-Maldonado I, Hawkes R, Liu B, Zhao M, Huang GC, et al. Defining G protein-coupled receptor peptide ligand expressomes and signalomes in human and mouse islets. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 2018;75(16):3039-50.
181. Böttcher G, Ahrén B, Lundquist I, Sundler F. Peptide YY: intrapancreatic localization and effects on insulin and glucagon secretion in the mouse. *Pancreas*. 1989;4(3):282-8.
182. Vivot K, Moullé VS, Zarrouki B, Tremblay C, Mancini AD, Maachi H, et al. The regulator of G-protein signaling RGS16 promotes insulin secretion and  $\beta$ -cell proliferation in rodent and human islets. *Mol Metab*. 2016;5(10):988-96.
183. Beith JL, Alejandro EU, Johnson JD. Insulin Stimulates Primary  $\beta$ -Cell Proliferation via Raf-1 Kinase. *Endocrinology*. 2008;149(5):2251-60.
184. Drucker DJ. Glucagon-Like Peptides: Regulators of Cell Proliferation, Differentiation, and Apoptosis. *Molecular Endocrinology*. 2003;17(2):161-71.
185. Tanaka T, Yano T, Adachi T, Koshimizu TA, Hirasawa A, Tsujimoto G. Cloning and characterization of the rat free fatty acid receptor GPR120: in vivo effect of the natural ligand on GLP-1 secretion and proliferation of pancreatic beta cells. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 2008;377(4-6):515-22.
186. Ichimura A, Hirasawa A, Poulain-Godefroy O, Bonnefond A, Hara T, Yengo L, et al. Dysfunction of lipid sensor GPR120 leads to obesity in both mouse and human. *Nature*. 2012;483(7389):350-4.
187. Nolan CJ, Leahy JL, Delghingaro-Augusto V, Moibi J, Soni K, Peyot ML, et al. Beta cell compensation for insulin resistance in Zucker fatty rats: increased lipolysis and fatty acid signalling. *Diabetologia*. 2006;49(9):2120-30.
188. Stein DT, Esser V, Stevenson BE, Lane KE, Whiteside JH, Daniels MB, et al. Essentiality of circulating fatty acids for glucose-stimulated insulin secretion in the fasted rat. *The Journal of clinical investigation*. 1996;97(12):2728-35.
189. Samuel VT, Liu ZX, Qu X, Elder BD, Bilz S, Befroy D, et al. Mechanism of hepatic insulin resistance in non-alcoholic fatty liver disease. *The Journal of biological chemistry*. 2004;279(31):32345-53.
190. Song T, Yang Y, Zhou Y, Wei H, Peng J. GPR120: a critical role in adipogenesis, inflammation, and energy metabolism in adipose tissue. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2017;74(15):2723-33.
191. Nagasumi K, Esaki R, Iwachidow K, Yasuhara Y, Ogi K, Tanaka H, et al. Overexpression of GPR40 in pancreatic beta-cells augments glucose-stimulated insulin secretion and improves glucose tolerance in normal and diabetic mice. *Diabetes*. 2009;58(5):1067-76.

192. Latour MG, Alquier T, Oseid E, Tremblay C, Jetton TL, Luo J, et al. GPR40 is necessary but not sufficient for fatty acid stimulation of insulin secretion in vivo. *Diabetes*. 2007;56(4):1087-94.
193. Lan H, Hoos LM, Liu L, Tetzloff G, Hu W, Abbondanzo SJ, et al. Lack of FFAR1/GPR40 does not protect mice from high-fat diet-induced metabolic disease. *Diabetes*. 2008;57(11):2999-3006.
194. Kebede M, Alquier T, Latour MG, Semache M, Tremblay C, Poitout V. The fatty acid receptor GPR40 plays a role in insulin secretion in vivo after high-fat feeding. *Diabetes*. 2008;57(9):2432-7.
195. Shi H, Clegg DJ. Sex differences in the regulation of body weight. *Physiology & behavior*. 2009;97(2):199-204.
196. Raptis DA, Limani P, Jang JH, Ungethüm U, Tschuor C, Graf R, et al. GPR120 on Kupffer cells mediates hepatoprotective effects of  $\omega$ 3-fatty acids. *Journal of Hepatology*. 2014;60(3):625-32.
197. Oh DY, Walenta E, Akiyama TE, Lagakos WS, Lackey D, Pessenheiner AR, et al. A Gpr120-selective agonist improves insulin resistance and chronic inflammation in obese mice. *Nat Med*. 2014;20(8):942-7.
198. Bjursell M, Xu X, Admyre T, Bottcher G, Lundin S, Nilsson R, et al. The beneficial effects of n-3 polyunsaturated fatty acids on diet induced obesity and impaired glucose control do not require Gpr120. *PloS one*. 2014;9(12):e114942.