

Université de Bourgogne
Centre de recherche INSERM U866 Lipides-Nutrition-Cancer
Equipe NUTox
AgroSup Dijon

THÈSE

En vue d'obtenir le grade de Docteur de l'Université de Bourgogne

Discipline : Sciences de la Vie

Spécialité : Physiologie de la Nutrition

Détection orosensorielle des lipides alimentaires chez la souris : Mécanismes impliqués et altérations au cours de l'obésité

par

Déborah Ancel

Soutenue publiquement le 21 décembre 2015

Devant le jury composé de :

Philippe Besnard	Professeur, AgroSup, Dijon NUTox, INSERM UMR866, Université de Bourgogne, AgroSup Dijon	<i>Directeur de thèse</i>
Patricia Passilly-Degrace	Maître de Conférences, IUT, Université de Bourgogne, Dijon NUTox, INSERM UMR866, Université de Bourgogne, AgroSup Dijon	<i>Co-encadrant de thèse</i>
Xavier Collet	Directeur de Recherche, INSERM UMR1048, Toulouse Institut des maladies métaboliques et cardiovasculaires, CHU Rangueil	<i>Rapporteur</i>
Christophe Magnan	Professeur, Université Paris Diderot, Paris CNRS UMR8251, Unité de Biologie Fonctionnelle et Adaptative	<i>Rapporteur</i>

"C'est le Gras qui donne du goût aux choses !
Et c'est pour ça que dans sa grande et infinie sagesse, Dieu a créé le Gras !"

Reese (Malcolm, saison 6, épisode 4)

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier le Pr. Philippe Besnard de m'avoir accueillie au sein de son Laboratoire NUTox. Merci pour votre encadrement et vos conseils, ainsi que votre soutien. Vos connaissances et votre rigueur scientifique m'ont fait avancer tout au long de cette thèse. Je vous remercie également de m'avoir permis de participer à de nombreux congrès nationaux et internationaux. Je suis honorée d'être votre « dernière thèse » !

Je remercie ensuite le Dr. Patricia Passilly-Degrace pour son aide tout au long de ce travail, sa disponibilité lors des manips et pour la relecture de ce manuscrit.

Je remercie sincèrement le Pr. Christophe Magnan et le Dr. Xavier Collet d'avoir accepté de rapporter cette thèse, malgré un calendrier difficile. Merci pour vos commentaires concernant ce travail et le temps que vous y avez accordé.

Je remercie chaleureusement Isabelle Dugail et Gérard Coureaud, membres de mon comité de suivi. Merci pour vos conseils et vos encouragements.

Je voudrais maintenant remercier tous les membres du laboratoire, présents ou passés, avec qui j'ai eu l'occasion de travailler ou de discuter autour d'un café.

Tout d'abord, l'ancienne « équipe de choc » des étudiants.

Véro, ma poulette, ma louloute, tu nous manque depuis que tu es partie du labo pour voler de tes propres ailes ! Les choses sont rangées à leur place, la vaisselle est faite, on est perdu quoi. Sans rire, merci d'être toi, je sais que je peux compter sur toi (au fait, t'as gardé la carte ?) ! J'espère que tu continues ton action en faveur des afterworks avec tes collègues ! Merci à toi Jé de nous avoir confié ta Véro pendant ces quelques années !

Mika, Maïkoooooooooool, c'est pareil, le labo n'est plus le même depuis que tu es parti. Personne ne sait aussi bien que toi me chanter des chansons débiles dès le matin (et toute la journée). En fin d' compte, toi et moi on a bien capahuté dans les trous depuis 10 ans qu'on se connaît, tu rends compte ma bonne dame ! Tout le poulet est en nous !

Marjo, notre fou rire devant l'ascenseur à Bordeaux restera l'un des plus marquants de ma vie. Ton côté psycho-rigide (mais pas psycho-frigide) fait ton charme ainsi que tes RRR caractéristiques. Merci pour ta gentillesse et ta disponibilité !

Emilie, Axelle, Kévin, vous êtes les prochains, ça va bien se passer !

Emilie, ma Christina, ouech c'est hardcore meuf j'te kiff grave. Un millier de merci pour nos virées shopping intensif, nos séances coiffeur, nos apéros, ton soutien sans faille et pour tout le reste, sont

gentils. La bise à massawiss, et aussi à Houmout s'il existe. Sache que je serai toujours là pour te sauver la vie, surtout si y'a le feu dans la pièce, faut qu'tu sortes de chez oât ou si tu décides de passer un week-end coincée dans le labo.

Kevin, je ne comprendrai jamais comment on peut être aussi sympa et aussi lunatique à la fois. Aussi drôle et pas drôle (la PS3 bordel !). Aussi bo goss et porter des caleçons écossais pour dormir. Grâce à toi, j'ai acquis une certaine expérience en matière de collage d'autocollants, de blagues de répétition entre collègues, et de commérage intensif. Alors merci pour tout ça et pour ton soutien ! Big-up à Cindy et une caresse pour Diego, il est tellement majestueux...

Axelle, j'admire ton courage : lever tôt, train, tram, boulot, repas bio, boulot, tram, train, rentrer tard... Merci pour ton aide même si on ne s'est connues qu'à la fin de cette thèse,!

Lydie, merci pour les bons moments passés au labo, à l'apéro, à l'aïkido. Je te souhaite de finir vite, on se sent vraiment mieux après.

Arnaud, aaahhh, bon, euh, merci pour tout en fait ! Tu as été là du début à la fin, même quand tu n'étais pas là. Sans toi, ça aurait été beaucoup plus compliqué pour moi, j'aurais pas survit avec tout ce qu'ils nous envoient dans la lune ! Donc merci pour tout, pour ton encadrement, pour toutes les manips, pour tous les congrès auxquels on a participé (New Orleans, quand même !), pour notre colocation de bureau, pour nos repas, nos apéros à l'eau déminéralisée d'Evian et autres kebabs qui rendent malade.

Candice, grâce à toi j'ai appris que non, tous les jus d'orange ne se ressemblent pas. Je sais également comment m'occuper d'une tortue, gérer mes comptes, faire des pignons de pain, et plein d'autres choses que toi seule connais. Merci pour toutes nos escapades, au lac, à l'accrobranche, chez Ikéa le samedi, au loto le dimanche, et pour ta bonne humeur au quotidien.

Yasmine, merci pour ta gentillesse, pour toutes les soirées et pour la leçon de ski que tu nous as donnée à tous ! Une grosse bise à Seb !

Abd huladhi, on ne s'est connus qu'à la fin de ma thèse, mais merci pour tes conseils et ton humour !

Christophe, ta douce voix mélodieuse me saluant chaque matin va me manquer. Merci de t'être occupé de mes petites souris, et de m'avoir aidée chaque fois que j'en avais besoin, pour les manips, pour les régimes, pour tout ce qui fait que tu es indispensable !

Marie-Claude, merci pour ta gentillesse et ton soutien, pour nos petites discussions de tout et de rien, pour toutes les anecdotes sur le laboratoire. Tu as toujours été disponible pour m'aider, que ce soit pour les manips ou pour les parties plus administratives que tu adores !

Isabelle, merci pour ton oreille attentive et tes nombreux conseils. Merci également pour ton soutien, pendant ces 4 ans et surtout vers la fin. Un gros bisou à Papillote !

Hélène, merci pour ta disponibilité, ta bonne humeur et ton humour. Merci également pour tes tenues de sport qui m'ont parfois remonté le moral !

Jeff, je te remercie pour ton aide et tes conseils. Je n'oublie pas tous les bons moments passés au labo avec toi, et aussi en dehors du labo, avec les diners presque parfait, fêtes de la musique et autres barbecue. Une grosse pensée pour Céline et Niels.

Merci à Guillaume et Aurélie pour leur aide précieuse lors des manip avec les souris, pour les sacrifices, les double-choix, la mise au point des gusto et autres réjouissances !

Un grand merci à l'équipe « Tox », même si maintenant nous ne faisons plus qu'un : Marie-Christine, Catherine, Isabelle et Laurence, merci pour les discussions-café. Ludo, merci pour ta gentillesse et ta disponibilité. Bon, il faudrait que tu parles un peu moins fort STP, c'est plus possible on s'entend plus !

Merci également à notre ex-secrétaire, Fabienne, pour l'ensemble de ton œuvre, ta folie nous manque !

Christelle, on ne s'est pas côtoyées longtemps, mais un grand merci pour ton aide précieuse et ton efficacité dans l'organisation de la soutenance !

Merci à Jacques Grobert, qu'on ne voit pas souvent mais quand il est là, on l'entend !

Merci enfin à toutes les stagiaires passées par le labo : Alexie, Anaïs, Elodie, Marlène, Tatiana, Mathilde, Marie-Angela, Anette, vous êtes toutes au top !

Je remercie également tous ceux que j'ai croisés au cours de cette thèse, que ce soit pour le boulot, pour les congrès ou pour manger au RU : Lorène, Momo, Cédric, Mel, Mag, Myriem.

Merci aux participants de l'Expérimentarium, et aux organisateurs : Elise, Lionel et maintenant Coralie. Ce programme est vraiment au top, surtout pour les goûters avec les enfants et les restos (sans les enfants).

Olivia, je t'admire pour ta capacité à supporter M. grognon tous les jours ! Merci pour les diners presque parfaits et les super jeux « collaboratifs » que j'adore... Bisous à Onyx, qui est très gentils mais quand même pas autant que mon Chilou.

Les Jackys, les copains, pièces rapportées, chiens, chats et bébé compris, merci pour les mariages, les EVJF, les galas et autres week-end à thème (anniversaires et compagnie) qui nous permettent de nous retrouver de temps en temps. On a vieilli depuis l'Ensbana, mais ça reste à chaque fois mémorable ! La relève est assurée avec les bébés les plus beaux du monde, vivement qu'ils soient en âge de taper dans un ballon pour monter notre équipe de foot !

Claire, Alex, Minet, Charlie, merci pour tous nos afterworks au Mac, pour les réunions EDIFICE, pour toutes les autres soirées où il se passe parfois des choses bizarres... et pour votre soutien en cas de

crise. Claire, merci d'avoir été là sur la fin et j'espère qu'on continuera à manger ensemble de temps en temps, à Dijon et à Lyon !

Je remercie tous mes amis de Saulieu : Steph, Dom, Nico, Sophie, Elo, Quentin, Léa, Fred, Dédé, Gwen... avec qui j'ai des souvenirs mémorables de chevaux merveilleux, de chiens magnifiques, d'entraînements sportifs, de courses incroyables, de barbecs sous la pluie etc.

Merci à mes partenaires de l'Aïkido, pour leur soutien avant la soutenance et leur patience quand je suis « Dorothee » à l'entraînement, ainsi que pour toutes les occasions de fêter au lieu de pratiquer !

Merci également aux cavaliers et cavalières, et bien sûr aux chevaux des Allées cavalières de Quetigny, qui me permettent de m'obliger à rester calme au moins une heure par semaine !

Merci aux copains de « Lyon » : Julie, Dams, Roro, Gaultier, Lucile, Jack, Perrine. Vive la guitare, vive les débats jusqu'à 6h du mat', vive la coinche, vive les week-ends à Lons !

Je remercie tout particulièrement toute ma famille, mes parents, mon frère. Merci de m'avoir toujours laissée faire mes propres choix et d'être là quand j'en ai besoin.

Merci beau-papa Christian, belle-maman Chantal, Rémy, Anne-Val, Léa, la mamie et le dernier arrivé, Léo !

Un grand merci à mon petit chat, Chili Pepper. Tes ronrons sont la chose la plus déstressante au Monde.

Et le meilleur pour la fin, mon Bobo, c'est à toi que revient le plus grand mérite, celui de me supporter avec une patience infinie tous les jours depuis 6 ans. Merci également pour ton oreille plus ou moins attentive pendant les milliards de répétitions pour la soutenance, tout ça sans râler ! Surtout, merci pour ton soutien et pour tous les gestes quotidiens qui m'ont aidée à aller jusqu'au bout : préparation de thés, ajustement de coussin et de plaids sur le canapé, approvisionnement de cookies/chocolat, tout ce que tu as fait et continue de faire pour me mettre « bien ».

Liste des abréviations

[Ca ²⁺] _i	Concentration de calcium intracellulaire
2-AG	2-arachydonylglycerol
2-OG	2-oleoylglycerol
3-AFC	<i>3-alternative forced choice</i>
5-HT	Sérotonine
AA	Acide arachidonique
AG	Acide gras
AGCC	Acide gras à chaîne courte
AGL	Acide gras libre (ou acide gras non-estérifié)
AGLC	Acide gras à longue chaîne
AGMC	Acide gras à chaîne moyenne
AGMI	Acide gras monoinsaturé
AGPI	Acide gras polyinsaturé
AMPc	Adénosine monophosphate cyclique
AgRP	<i>Agouti-gene related peptide</i>
AGS	Acide gras saturé
ALA	Acide alpha-linolénique
CALHM1	<i>Calcium homeostasis modulator 1</i>
CB1R	<i>Cannabinoid receptor type 1</i>
CCK	Cholécystokinine
CD14	Cluster de différenciation 14
CD36	Cluster de différenciation 36
CPP	<i>Conditioned place preference</i>
CS	<i>Conditioned stimulus</i>
CTA	<i>Conditioned taste aversion</i>
DAG	Diacylglycerol
DHA	Acide docosahexaénoïque
DIO	<i>Diet-induced obesity</i>
DRK (canaux)	<i>Delayed-rectifying potassium channels</i>
ENac	Canal sodique épithélial sensible à l'amiloride
EPA	Acide eicosapentaénoïque
GABA	Acide gamma-aminobutyrique
GIP	<i>Gastric inhibitory polypeptide</i>
GLAST	Glutamate-aspartate transporteur
GLP-1	<i>Glucagon-like peptide-1</i>
GLP-1R	<i>Glucagon-like peptide-1 receptor</i>
GPCR	<i>G-protein coupled receptor (GPR40/41/43/119/120)</i>
HF	<i>High-fat</i>
HFHS	<i>High-fat high-sucrose</i>
IFN	Interféron
IL-10, IL-1 β , IL-6	Interleukines
IMC	Indice de masse corporelle
IP ₃	Inositol-triphosphate

IP ₃ R3	Récepteur à l'inositol triphosphate de type 3
KO	<i>Knock-out</i>
LA	Acide linoléique
LBP	<i>LPS binding protein</i>
LDL	<i>Low density lipoprotein</i>
m.c.	Masse corporelle
MCP-1	<i>Chemokine monocyte chemoattractant protein-1</i>
NAC	Noyau Accumbens
NCAM	<i>Neural Cell Adhesion Molecule</i>
NF-κB	Nuclear factor-kappa B
NPY	Neuropeptide Y
NTPDase2	Nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 2
NTS	Noyau du tractus solitaire
OEA	Oleoyléthanolamide
OLA	Acide oléique
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
OP	<i>Obese-prone</i>
OR	<i>Obese-resistant</i>
P ₂ X ₂ /P ₂ X ₃	Récepteurs purinergiques
PKA, PKC	Protéines kinases A/C
PKD2L1	<i>Polycystic-kidney-disease 2-like 1 ion channel</i>
PL	Phospholipide
PLCβ2	Phospholipase C β2
POMC	Pro-opiomélanocortine
PPAR	<i>Peroxisome Proliferator Activated Receptor</i>
PVN	Noyau paraventriculaire
RE	Réticulum endoplasmique
SD	Sprague-Dawley (rat)
SHH	<i>Sonic Hedgehog</i>
siRNA	<i>Small interfering RNA</i>
SNAP25	<i>Synaptosome associated protein 25</i>
SNMP	<i>Sensory neuron membrane protein</i>
SOC	<i>Store-operated calcium channels</i>
Src-PTK	Protéines tyrosine kinases de la famille Src
STD	Standard (régime)
STIM1	<i>Stromal interaction molecule 1</i>
T1R	<i>Taste receptor type 1 (TAS1R)</i>
T2R	<i>Taste receptor type 1 (TAS2R)</i>
TG	Triglycéride
TLR (2, 4)	<i>Toll-like receptor</i> de type 2 ou 4
TNF-α	<i>Tumor necrosis factor α</i>
TRPM5	<i>Melastatin-related transient receptor potential cation channel type 5</i>
UCS	<i>Unconditioned stimulus</i>
VLDL	<i>Very low density lipoprotein</i>
VMH	Noyau ventromédian de l'hypothalamus
VTA	Aire ventrale tegmentale
WT	<i>Wild-type</i>
XG	Gomme de xanthane

Glossaire

Arôme :

Sensation perçue par rétro-olfaction lors de la consommation d'un aliment.

Flaveur :

Ensemble des sensations orosensorielles (gustation + rétro-olfaction) perçues lors de la consommation d'un aliment.

Saveur :

Ce terme englobe ici les 5 saveurs primaires communément admises (salé, sucré, acide, amer, umami). Une saveur est générée par le contact d'un composé de l'aliment sur la langue, qui produit une information transmise au cerveau *via* les nerfs gustatifs.

Rassasiement :

Etat physiologique qui conduit à l'arrêt de la prise alimentaire sans que les aliments n'aient été absorbés.

Rassasiement sensoriel spécifique :

Diminution progressive au cours du repas, jusqu'au rassasiement, du plaisir tiré de la consommation d'un aliment déterminé alors que le plaisir lié à d'autres aliments présentant des caractéristiques sensorielles différentes n'est pas affecté.

Satiété :

Etat de non faim qui détermine l'intervalle entre deux repas.

Palatabilité :

Evaluation hédonique des caractéristiques orosensorielles des aliments. Un aliment qui est palatable, est agréable à manger et procure du plaisir de par ses propriétés gustatives, olfactives et/ou texturales. Il s'agit souvent des aliments à la fois gras et sucrés.

Avidité :

Se dit d'un individu/animal ayant une volonté immodérée de consommer un aliment. Par exemple chez la souris, plus une solution est riche en lipides, plus elle sera attractive, et plus l'animal sera avide de la consommer.

Préférence et aversion :

On parle ici de préférence entre plusieurs solutions. Par exemple, lors d'un test de comportement alimentaire où la souris a le choix entre deux stimuli, un test et un contrôle, si elle consomme majoritairement la solution test, on dit qu'elle préfère cette solution. Si en revanche elle consomme majoritairement la solution contrôle, on dit qu'elle a une aversion pour la solution test.

Seuil de détection orosensoriel et sensibilité :

Le seuil de détection correspond à la limite au-dessus de laquelle un individu/animal détecte un stimulus gustatif. Par exemple, la plus petite concentration d'acide linoléique détectée par une souris. Plus le seuil de détection augmente, plus la sensibilité est faible.

Table des matières

AVANT-PROPOS	23
ETAT DES CONNAISSANCES.....	25
INTRODUCTION : L'OBESITE, CAUSES ET CONSEQUENCES	26
L'OBESITE DANS LE MONDE ET SES CONSEQUENCES.....	26
LES CAUSES DE L'OBESITE : INTERACTIONS ENTRE LA GENETIQUE ET L'ENVIRONNEMENT	29
Les facteurs génétiques.....	29
Les facteurs environnementaux.....	30
QUELLES SONT LES QUESTIONS POSEES ?.....	33
PARTIE I : QUELLE EST L'ORGANISATION DU SYSTEME GUSTATIF ET COMMENT SONT DETECTEES LES SAVEURS ?.....	34
I.1. PAPILLES GUSTATIVES	34
I.2. BOURGEONS DU GOUT.....	35
I.3. CELLULES CONSTITUANT LES BOURGEONS DU GOUT	36
I.3.1. Cellules de type I	36
I.3.2. Cellules de type II	37
I.3.3. Cellules de type III	38
I.3.4. Cellules basales	39
I.3.5. Cellules progénitrices	39
I.4. TRANSDUCTION DES SAVEURS PRIMAIRES	40
I.4.1. De nombreux récepteurs impliqués.....	40
I.4.2. Signalisation intracellulaire	41
I.4.3. Communication intercellulaire dans les bourgeons du goût	42
I.5. SYSTEME NERVEUX IMPLIQUE DANS LA TRANSMISSION DU SIGNAL GUSTATIF	43
I.6. FACTEURS INFLUENÇANT L'INFORMATION GUSTATIVE.....	44
PARTIE II : DE LA BOUCHE AU CERVEAU : COMMENT EST REGULE LE COMPORTEMENT ALIMENTAIRE ?.....	46
II.1. ELEMENTS DE DEFINITION DU COMPORTEMENT ALIMENTAIRE.....	46
II.2. REGULATION PHYSIOLOGIQUE DU COMPORTEMENT ALIMENTAIRE	46
II.2.1. Intégration des signaux gustatifs	47
II.2.2. Intégration des signaux post-ingestifs	48
PARTIE III : COMMENT LE SENSING DES LIPIDES REGULE-T-IL LE COMPORTEMENT ALIMENTAIRE ?	51
III.1. DEFINITIONS ET FONCTIONS CELLULAIRES DES LIPIDES.....	51
III.1.1. Structure et nomenclature des lipides.....	51
III.1.2. Fonctions des lipides au niveau cellulaire.....	52

a. Rôle énergétique	52
b. Rôle structural	52
c. Rôle de précurseurs de molécules bioactives.....	53
d. Rôle de régulateur des activités cellulaires	54
e. Rôle de régulation de l'expression génique	54
III.2. <i>SENSING</i> DES LIPIDES ET EFFETS SUR LE COMPORTEMENT ALIMENTAIRE.....	55
III.2.1. Effets satiétogènes des lipides	55
a. Sensing intestinal des lipides et effets satiétogènes.....	55
b. Sensing hypothalamique des lipides et effets anorexigènes	56
III.2.2. Attraction pour les lipides et effets gratifiants	56
a. Effets d'apprentissage, de récompense et de renforcement des lipides.....	57
b. Mécanismes impliqués dans les effets gratifiants des lipides.....	58
III.3. LA DETECTION DES LIPIDES AU NIVEAU OROSENSORIEL	59
III.3.1. Texture.....	59
III.3.2. Odeur.....	60
PARTIE IV : EXISTE-T-IL UNE DETECTION GUSTATIVE DES LIPIDES ?	61
IV.1. DETECTION DES LIPIDES AU NIVEAU ORAL	61
IV.1.1. Types de lipides détectés	61
IV.1.2. Existe-t-il une lipase salivaire ?	63
IV.2. TRANSMISSION DU SIGNAL LIPIDIQUE JUSQU'AU CERVEAU	65
IV.3. REPONSE PHYSIOLOGIQUE INDUITE PAR LA STIMULATION ORALE AVEC DES LIPIDES	65
IV.4. RECEPTEURS CANDIDATS A LA DETECTION ORALE DES LIPIDES.....	67
IV.4.1. Canaux DRK	67
IV.4.2. CD36	68
a. Structure	68
b. Propriétés de liaison, fonctions et localisations.....	69
c. Rôle du CD36 dans la détection orale des lipides.....	70
d. Signalisation via CD36 dans les bourgeons du goût	71
e. Régulation du CD36 dans les bourgeons du goût.....	72
IV.4.3. GPR40.....	73
IV.4.4. GPR120.....	74
a. Structure	74
b. Propriétés de liaison, fonctions et localisations.....	75
c. Rôle du GPR120 dans la détection orale des lipides.....	77
IV.5. REGULATION PAR LES HORMONES.....	78
PARTIE V : LA DETECTION GUSTATIVE DES LIPIDES EST-ELLE PERTURBEE LORS DE L'OBESITE ?	79
V.1. ETUDES CHEZ LE RONGEUR	80

V.2. ETUDES CHEZ L'HOMME	81
<u>PROBLEMATIQUE</u>	85
<u>MATERIELS & METHODES : INTRODUCTION AUX TESTS DE COMPORTEMENT ALIMENTAIRE.....</u>	87
PARTIE I : ANIMAUX, CONDITIONS DE VIE ET REGIMES.....	88
PARTIE II : PRESENTATION DES METHODES UTILISEES POUR L'ETUDE DU COMPORTEMENT ALIMENTAIRE.....	90
II.1. TESTS DE DOUBLE-CHOIX LONG TERME	90
II.2. LICKING TESTS COURT TERME	92
II.2.1. Lickomètres en simple choix	92
II.2.2. Gustomètres.....	95
II.3. TESTS D'AVERSION GUSTATIVE CONDITIONNEE	96
II.4. CHOIX DES LIPIDES ET VEHICULES UTILISES POUR LES TESTS	98
II.5. ANALYSES STATISTIQUES.....	100
<u>RESULTATS.....</u>	101
PARTIE I : LE RECEPTEUR GPR120 JOUE-T-IL UN ROLE DANS LA DETECTION OROSENSORIELLE DES LIPIDES ?	102
I.1. INTRODUCTION.....	102
I.2. LE GPR120 EST-IL INDISPENSABLE POUR LA DETECTION OROSENSORIELLE DES LIPIDES ALIMENTAIRES CHEZ LA SOURIS ?	107
ARTICLE N°1 : THE ORAL LIPID SENSOR GPR120 IS NOT INDISPENSABLE FOR THE OROSENSORY DETECTION OF DIETARY LIPIDS IN MICE	108
I.3. RESULTATS COMPLEMENTAIRES.....	119
I.3.1. Le comportement des souris GPR120 ^{-/-} vis-à-vis des lipides est-il sexe-dépendant ?	119
I.3.2. Le GPR120 joue-t-il un rôle dans la détection orosensorielle des lipides lors d'un régime obésogène ?	120
a. Phénotypage des souris GPR120 ^{-/-} en régime high-fat.....	121
b. Tests de préférence en double-choix long terme	123
I.4. DISCUSSION	124
PARTIE II : LA DETECTION OROSENSORIELLE DES LIPIDES EST-ELLE PERTURBEE LORS DE L'OBESITE INDUITE PAR UN REGIME HYPERLIPIDIQUE ?	128
II.1. INTRODUCTION.....	128
ARTICLE N°2 : OBESITY ALTERS THE GUSTATORY PERCEPTION OF LIPIDS IN THE MOUSE: PLAUSIBLE INVOLVEMENT OF LINGUAL CD36	130
II.2. DISCUSSION	141

II.2.1. L'obésité altère la détection orosensorielle des lipides	141
II.2.2. Quels sont les mécanismes impliqués ?	142
PARTIE III : L'ORIGINE DE L'ALTERATION DE LA DETECTION OROSENSORIELLE DES LIPIDES LORS DE L'OBESITE EST-ELLE LIEE A L'ENDOTOXEMIE METABOLIQUE ?.....	146
III.1. MECANISMES DE L'ENDOTOXEMIE METABOLIQUE	146
III.2. LIEN ENTRE INFLAMMATION ET DETECTION DES SAVEURS	149
PROJET D'ARTICLE N°3 : DOES THE INFLAMMATION OF GUSTATORY PAPILLAE EXPLAIN THE IMPAIRMENT OF ORAL FAT DETECTION IN OBESE MICE?	152
III.3. RESULTATS COMPLEMENTAIRES : EFFETS DES PREBIOTIQUES SUR LA DETECTION GUSTATIVE DES LIPIDES ET DU SACCHAROSE.	171
III.3.1. Effet des prébiotiques sur le phénotype des souris	172
III.4. DISCUSSION	178
III.4.1. Le LPS est-il responsable de l'altération de la détection orosensorielle des lipides au cours de l'obésité ?	178
III.4.2. L'utilisation de prébiotiques améliore-t-elle la détection orosensorielle des lipides ?	179
<u>DISCUSSION GENERALE</u>	<u>183</u>
COMMENT RECONCILIER LES ROLES DU CD36 ET DU GPR120 DANS LES PAPILLES GUSTATIVES ?	184
LE CD36, UN ACTEUR CLE DE LA DETECTION OROSENSORIELLE DES LIPIDES	187
APPROCHE GLOBALE DU LIEN ENTRE L'ALTERATION DE LA DETECTION ORALE DES LIPIDES ET L'OBESITE	189
<u>CONCLUSION</u>	<u>193</u>
<u>PERSPECTIVES</u>	<u>195</u>
<u>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</u>	<u>197</u>
<u>PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS.....</u>	<u>213</u>

Liste des Tableaux et Figures

Tableaux

Tableau 1 : Interprétation des valeurs de l'IMC selon l'OMS.	26
Tableau 2 : Localisation des hormones et de leurs récepteurs dans les bourgeons du goût.	45
Tableau 3 : Composition des principaux régimes utilisés.	89
Tableau 4 : Exemple d'enchaînement des sessions et d'ordre des biberons pour deux souris en lickomètres.....	94
Tableau 5 : Avantages et inconvénients des tests comportementaux utilisés.	100
Tableau 6 : Comparaison des phénotypes des souris en régime hyperlipidique (acides gras saturés) de différentes équipes.....	122

Figures

Figure 1 : Prévalence de l'obésité dans le monde.	27
Figure 2 : Répartition de la population française en fonction du niveau d'IMC (A) et évolution de la prévalence de l'obésité de 1997 à 2012 (B).	28
Figure 3 : Evolution de la structure des apports énergétiques en France depuis 1961.	31
Figure 4 : Interconnexion des mécanismes du comportement alimentaire reliés à l'obésité.....	33
Figure 5 : Structure et localisation des papilles gustatives sur la langue.	34
Figure 6 : Structure de la papille caliciforme et des bourgeons du goût, et coupe transversale d'une papille caliciforme de souris.....	35
Figure 7 : Structure schématique d'un bourgeon du goût.	36
Figure 8 : Principaux marqueurs et fonctions des cellules gustatives des bourgeons du goût.	37
Figure 9 : Processus de renouvellement des cellules des bourgeons du goût.	40
Figure 10 : Voie de signalisation dans les cellules de type II.....	42
Figure 11 : Rôle de l'ATP dans la communication intercellulaire.....	43
Figure 12 : Circuit gustatif, de la molécule sapide au NTS.	44
Figure 13 : Circuit d'intégration du signal gustatif au niveau du cerveau émotionnel.	47
Figure 14 : Principales aires cérébrales impliquées dans la régulation du comportement alimentaire.	48
Figure 15 : Système mélanocortine central.	49
Figure 16 : Circuit d'intégration, du signal gustatif aux cerveaux émotionnel et métabolique.	50

Figure 17 : Exemple d'analyses granulométriques d'émulsions utilisées pour l'étude des seuils de détection de l'acide linoléique chez l'Homme.....	63
Figure 18 : Effets moyens de la stimulation orale par du LA sur la triglycéridémie chez des sujets sains.	66
Figure 19 : Rôle possible de modulateurs des saveurs des canaux DRK dans les cellules gustatives : exemple du sucré.	68
Figure 20 : Structure prédictive du CD36 chez l'Homme.....	69
Figure 21 : Hypothèse de travail sur la signalisation induite par les AGLC <i>via</i> CD36 dans les gustatives.	72
Figure 22 : Structure prédictive de GPR120 chez l'Homme.....	74
Figure 23 : Principales fonctions physiologiques de GPR120.	75
Figure 24 : Cascade de signalisation impliquée dans les effets anti-inflammatoires de GPR120.....	76
Figure 25 : Conséquences de l'altération du fonctionnement des cerveaux émotionnel et métabolique.	80
Figure 26 : Seuils de détection de l'acide linoléique (LA) chez les sujets minces et obèses.	81
Figure 27 : Analyse des carnets de consommation sur 24h.	82
Figure 28 : Inactivation du gène GPR120 chez les souris.....	88
Figure 29 : Circuit conduisant au comportement alimentaire lors de tests de double-choix long-terme.	91
Figure 30 : Photo et schéma d'une cage de lickomètre.....	92
Figure 31 : Procédure utilisée pour un test en lickomètre.	93
Figure 32 : Circuit conduisant au comportement alimentaire lors de tests de licking court terme.	95
Figure 33 : Circuit conduisant à la détection des saveurs lors de tests de gustomètres.....	96
Figure 34 : Procédure utilisée pour le test d'aversion gustative conditionnée (CTA).	97
Figure 35 : Scénarios pouvant expliquer la présence concomitante de CD36 et GPR120 dans les bourgeons du goût.....	103
Figure 36 : Coupe de papille caliciforme observée au microscope confocal.	104
Figure 37 : Contours des bourgeons du goût effectué sur le logiciel Visilog.	105
Figure 38 : Volumes de fluorescence de chaque protéine et volume de co-marquage.....	105
Figure 39 : Pourcentages de volumes de fluorescence de chaque protéine seule, et pourcentages de volume de fluorescence de chaque protéine co-marquée avec l'autre.....	106
Figure 40 : Comparaison des tests de double-choix 12h réalisés sur des souris GPR120 ^{+/+} et GPR120 ^{-/-} mâles (A) et femelles (B).....	119
Figure 41 : Test de double-choix 12h réalisé sur des souris GPR120 ^{+/+} et GPR120 ^{-/-} femelles.	120
Figure 42 : Evolution de la composition corporelle des souris GPR120 ^{+/+} et GPR120 ^{-/-} en régime HF..	121
Figure 43 : Prise alimentaire des souris GPR120 ^{+/+} et GPR120 ^{-/-} à la 9 ^{ème} semaine de régime HF.	121
Figure 44 : Test de tolérance à l'insuline réalisé sur les souris GPR120 ^{-/-} et GPR120 ^{+/+} en régime HF.	123

Figure 45 : Test de double-choix (12h) sur des souris GPR120 ^{-/-} et GPR120 ^{+/+} avant et après régime <i>high-fat</i> .	123
Figure 46 : Tests en lickomètres (1 min) sur des souris GPR120 ^{+/+} et GPR120 ^{-/-} .	126
Figure 47 : Activation du TLR4 par le LPS.	147
Figure 48 : Voies de signalisation de TNF- α et IL-10 au sein des bourgeons du goût des papilles caliciformes et foliées.	150
Figure 49 : Noms et codes couleur des groupes de souris pour l'étude de l'effet des prébiotiques sur la détection des lipides et du sucré.	172
Figure 50 : Evolution de la masse corporelle (A) et de la masse grasse (B) des souris en régime standard ou <i>high-fat</i> , avec ou sans prébiotiques.	172
Figure 51 : Prise alimentaire et hydrique des souris en régime standard ou <i>high-fat</i> , avec ou sans prébiotiques.	173
Figure 52 : Double-choix (12h) sur les souris en régime standard ou <i>high-fat</i> , avec ou sans prébiotiques.	174
Figure 53 : Tests de <i>licking</i> en gustomètres, avec différentes concentrations de saccharose (A) ou d'acide linoléique (B) sur les souris en régime standard ou <i>high-fat</i> , avec ou sans prébiotiques.	175
Figure 54 : Corrélations entre les résultats des gustomètres pour les différentes concentrations de saccharose (A) ou d'acide linoléique (B) et le pourcentage de masse grasse chez les souris en régime standard ou <i>high-fat</i> , avec ou sans prébiotiques.	176
Figure 55 : Masses des organes prélevés lors du sacrifice des souris en régime standard ou <i>high-fat</i> , avec ou sans prébiotiques.	177
Figure 56 : Hypothèses concernant les rôles respectifs de CD36 et GPR120 dans la détection des lipides.	185
Figure 57 : Représentation schématique des mécanismes impliqués dans la diminution de la sensibilité gustative pour les lipides au cours de l'obésité.	190

Avant-propos

De plus en plus de données convergentes indiquent qu'il existe un système spécifique de détection des lipides, et en particulier des acides gras à longue chaîne (AGLC), au niveau de certaines cellules des papilles gustatives. Jusqu'alors, on considérait que les lipides étaient détectés uniquement grâce à leurs propriétés texturales et olfactives. Or, l'existence d'un système de détection gustatif constitue un paramètre important à considérer dans le cadre de la régulation du comportement alimentaire car il implique la possibilité d'un choix de consommer plus ou moins certains types d'aliments, en l'occurrence des aliments contenant des lipides. Ces aliments, dense en énergie, ont été utiles au cours de l'évolution dans les périodes de disette alimentaire. Cependant, devant l'abondance de nourriture au sein de nos sociétés actuelles, la surconsommation de lipides peut s'avérer délétère en entraînant notamment des risques d'obésité.

L'engouement suscité par le concept émergent d'une détection gustative des lipides alimentaires – certains parlent d'une «6^{ème} saveur» – est à l'origine de nombreux résultats et de nouveaux questionnements allant des mécanismes cellulaires mis en jeu, aux possibles conséquences physiologiques, voire pathologiques.

L'objet des travaux décrits dans cette thèse s'inscrit dans cette approche systémique en tentant de répondre à des interrogations fonctionnellement distantes mais pourtant complémentaires :

A quoi servent les différents récepteurs aux AGLC (CD36 et GPR120) trouvés au niveau des bourgeons du goût ?

Existe-t-il un lien entre l'efficacité de la détection orosensorielle des lipides et l'obésité ?

Quels sont les mécanismes impliqués ?

Etat des connaissances

Introduction : L'obésité, causes et conséquences

L'Obésité dans le Monde et ses conséquences

La prévalence de l'obésité dans le Monde a doublé depuis 1980. Selon l'OMS, en 2014, plus de 1.9 milliard d'adultes étaient en surpoids ($25 \leq \text{IMC} < 30$, voir encart n°1), dont plus de 600 millions d'obèses ($\text{IMC} \geq 30$, figure 1). Le pays le plus emblématique de cette épidémie d'obésité est les Etats-Unis, avec plus d'un tiers d'adultes obèses (Ogden et al., 2014).

Encart n°1 : Définition de l'IMC ; intérêts et limites

Selon l'Organisation Mondiale de la Santé, « Le surpoids et l'obésité se définissent comme une accumulation anormale ou excessive de graisse corporelle qui peut nuire à la santé ». Le moyen le plus communément utilisé pour estimer le surpoids et l'obésité chez l'adulte est l'Indice de Masse Corporelle (IMC en kg.m^{-2}). C'est l'OMS qui, en qualifiant l'obésité de première épidémie mondiale non virale, a imposé internationalement l'usage de l'IMC comme instrument de diagnostic et de prévention. Il est facile à calculer et permet une classification simple de la population car l'échelle est la même, quels que soient le sexe ou l'âge de l'individu : un individu qui a une valeur d'IMC supérieure à 25 est considéré en surpoids ; au-dessus de 30, c'est l'obésité (tableau 1). Cependant, même s'il est corrélé à la masse grasse, l'IMC ne donne qu'une indication très approximative à l'échelle individuelle : il ne reflète ni le degré d'adiposité, ni la localisation du tissu adipeux (gynoïde ou androïde), qui conditionne en partie le risque de complications associées à l'obésité. L'IMC permet donc de comparer de manière simple et rapide des populations, mais lorsqu'il s'agit d'études à l'échelle de l'individu, il est nécessaire d'utiliser des méthodes complémentaires, telles que la mesure du tour de taille, l'épaisseur des plis cutanés, l'impédancemétrie, l'hydrodensitométrie etc.

Tableau 1 : Interprétation des valeurs de l'IMC selon l'OMS.

Insuffisance pondérale	< 18.5	} $\text{IMC} = \frac{\text{Poids (kg)}}{\text{Taille}^2 (\text{m}^2)}$
Eventail normal	18.5 – 24.9	
Surpoids	≥ 25.0	
Préobésité	25.0 – 29.9	
Obésité	≥ 30.0	
Obésité, classe I (modérée)	30.0 – 34.9	
Obésité, classe II (sévère)	35.0 – 39.9	
Obésité, classe III (massive)	≥ 40.0	

IMC : indice de masse corporelle ; OMS : Organisation Mondiale de la Santé.

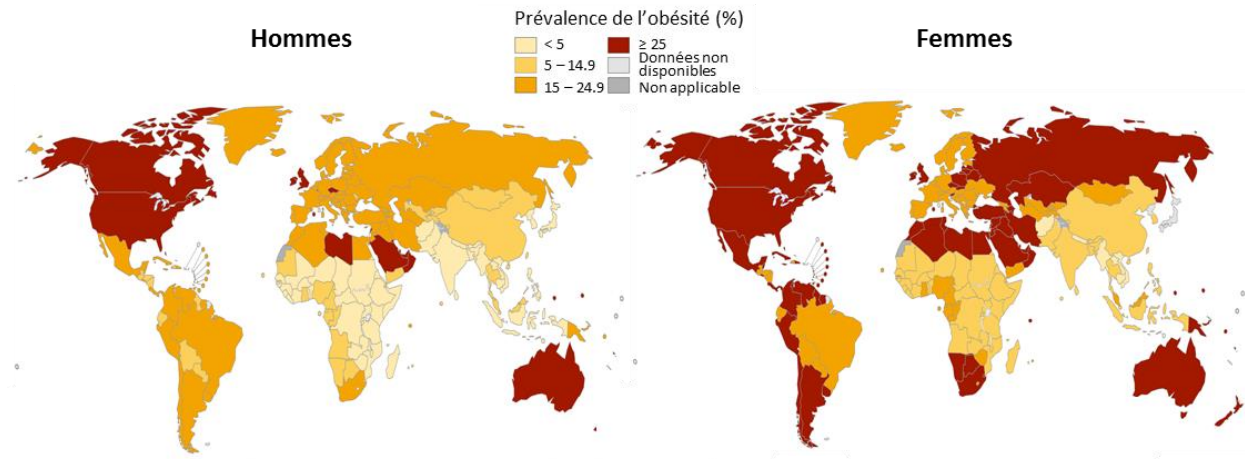


Figure 1 : Prévalence de l'obésité dans le monde.

D'après (WHO, 2014).

Individus âgés de 18 ans et plus en 2014. IMC (indice de masse corporelle) > 30kg/m²

Concernant la France, l'étude ObEpi analyse tous les 3 ans la prévalence du surpoids et de l'obésité, selon la même méthodologie depuis 1997, utilisant un questionnaire auto-administré. La dernière étude indique qu'en 2012, 32.3% des Français étaient en surpoids et 15% présentaient une obésité (figure 2-A) alors qu'en 1997, seuls 8.5% des français étaient obèses. L'IMC moyen est passé de 24.3 kg/m² en 1997 à 25.4kg/m² en 2012. Il est notable qu'entre 2009 et 2012, l'augmentation de la prévalence de l'obésité se poursuit mais avec une tendance à la décélération (figure 2-B) (ObEpi, 2012).

Les problèmes de surpoids et d'obésité étaient autrefois considérés comme propres aux pays à haut revenu. Or, sur les 42 millions d'enfants en surpoids ou obèses, près de 35 millions vivent dans des pays en développement, ceci alors même que les problèmes de malnutrition ne sont pas résolus. Ainsi, à l'échelle mondiale, le surpoids et l'obésité sont liés à davantage de décès que l'insuffisance pondérale (www.who.int). Chaque année, au moins 2.8 millions de personnes décèdent dans le Monde du fait de leur surpoids ou de leur obésité et des comorbidités associées. L'obésité est en effet associée à de nombreux facteurs de risques, notamment cardio-vasculaires. En France, selon l'étude ObEpi, en cas d'obésité, il y a 3.6 fois plus de traitements de l'hypertension artérielle, 2.7 fois plus de traitements pour une dyslipidémie et 7 fois plus de traitements pour un diabète (types I et II) par rapport aux sujets dont l'IMC est considéré comme normal (ObEpi, 2012). L'obésité peut également entraîner des troubles musculo-squelettiques comme l'arthrose, ainsi que certains cancers (endomètre, sein, côlon...) – en 2012, 3.6% des nouveaux cas de cancer chez l'adulte seraient attribués à un IMC élevé (Arnold et al., 2015).

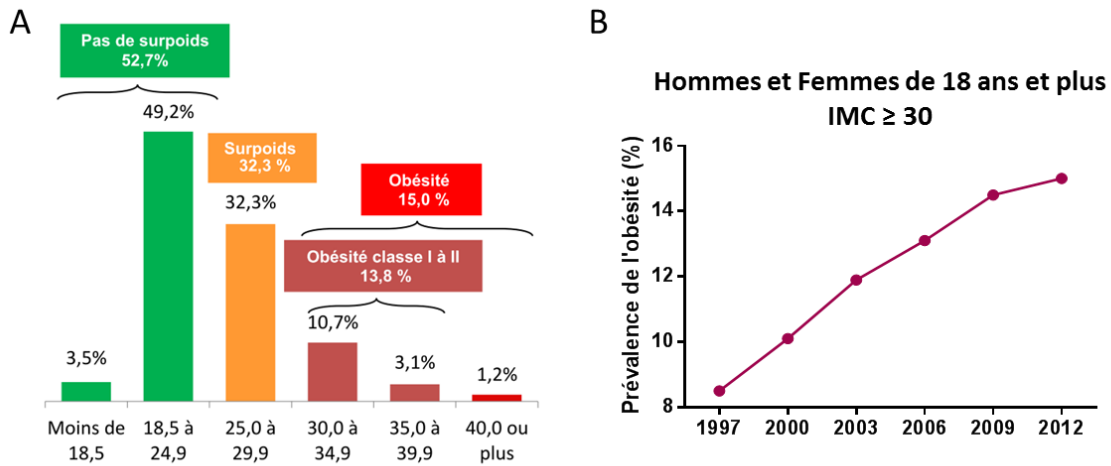


Figure 2 : Répartition de la population française en fonction du niveau d'IMC (A) et évolution de la prévalence de l'obésité de 1997 à 2012 (B).

Source : (ObEpi, 2012).

IMC : indice de masse corporelle

Bien sûr, la prise en charge de ces complications a un coût : en France, pour l'année 2002, la consommation totale de soins et de biens médicaux pour un individu obèse avait été évaluée à 2500€, soit deux fois plus que pour un individu de poids normal (1263€) (Emery et al., 2007). Du point de vue de l'Assurance maladie, le coût total de l'obésité et des facteurs de risques associés, en incluant les indemnités journalières dues aux arrêts de travail, était estimé à 3.3 milliards d'euros, soit 2.5% de la dépense courante de santé en 2002. A cela vient s'ajouter le coût des différents programmes de prévention qui ont pour but de promouvoir une alimentation équilibrée tout en valorisant l'activité physique. En France, on peut citer par exemple le Programme National Nutrition Santé (PNNS), initié en 2001 et prolongé en 2006, il en est déjà à son 3^{ème} volet (2011-2015). Il est complété par le Plan Obésité (PO 2010-2013) ; ils représentent à eux deux un budget total de 210 millions d'euros. N'oublions pas également que l'obésité est un handicap social, culturel et psychologique. La personne obèse est souvent victime de discrimination aux niveaux scolaire, sportif, professionnel. De plus, elle peut développer une mésestime de soi, voire un sentiment de culpabilité, ce qui contribue à aggraver le problème social. Ainsi, l'obésité et les troubles associés engendrent un coût économique et humain très important pour la société. Il apparait donc primordial de trouver des solutions pour enrayer cette « épidémie », que ce soit au niveau de la prévention ou des traitements.

Les causes de l'obésité : interactions entre la génétique et l'environnement

Les causes de l'obésité sont multiparamétriques et très complexes : elles résultent d'une combinaison de facteurs génétiques et environnementaux. Si le déséquilibre de la balance énergétique (apports caloriques vs. dépenses) peut expliquer en grande partie la prévalence actuelle de l'obésité, des variations génétiques interindividuelles définissent les susceptibilités de chacun face à ce phénomène. Au cours de l'évolution, la principale menace pour l'espèce humaine a été le manque de nourriture. Les gènes d'« épargne » (Neel, 1962) favorisant le stockage de l'énergie ont donc été sélectionnés. Seulement, dans le contexte de notre mode de vie actuel dit « occidental », défini par une abondance de nourriture dense en énergie et facilement accessible, accompagnée d'une sédentarité croissante, ces gènes d'épargne pourraient favoriser le développement de l'obésité.

Les facteurs génétiques

De nombreuses études familiales montrent que 40 à 70% des variations d'IMC sont dues à des facteurs génétiques (Paquot et al., 2012). Par exemple, des jumeaux monozygotes soumis à un régime hypercalorique présentent une grande concordance dans la prise de poids (Bouchard et al., 1990). Il existe des formes d'obésité rares où un seul gène est mis en cause. L'exemple le plus connu est celui de la leptine, qui permet la régulation de la prise alimentaire chez le rongeur. Les souris ob/ob ne produisent pas de leptine à cause d'une mutation sur le gène codant pour cette hormone (Zhang et al., 1994) et développent une obésité extrême. Chez l'Homme, les cas de mutations du gène de la leptine ou de son récepteur aboutissant à une obésité sont exceptionnels (Montague et al., 1997). L'obésité d'origine génétique est le plus souvent polygénique. Depuis 2005, les études d'association pangénomiques permettent d'analyser le génome complet de populations et de trouver des liens entre des polymorphismes et des phénotypes particuliers. Une méta-analyse portant sur 249 796 individus a identifié 32 régions géniques associées avec l'IMC (Speliotes et al., 2010). Par exemple, un variant commun du gène *FTO* (*fat mass and obesity associated*) a été identifié : les porteurs homozygotes pèsent environ 3kg de plus et ont 1.7 fois plus de chance de devenir obèses que les individus qui ne portent pas le variant (Frayling et al., 2007). De manière intéressante, une activité physique régulière permettrait de diminuer de 30% l'effet du variant *FTO* sur le poids corporel (Paquot et al., 2012), démontrant l'importance des facteurs environnementaux.

Un concept assez récent qui mérite d'être approfondi de par sa nature réversible est l'épigénétique, qui étudie les modifications de l'expression des gènes qui ne découlent pas de changements de la séquence de l'ADN. Ce sont les différents niveaux d'acétylation et de méthylation de certains nucléotides, et/ou des histones qui entraînent un changement de la condensation de la chromatine à l'origine d'une modulation de l'expression de gènes. Ces modifications sont influencées par des facteurs environnementaux, notamment nutritionnels (comme par exemple des donneurs de méthyles tels que la choline, la bêtaïne ou la vitamine B9) ou chimiques. Ainsi, par exemple, un déficit ou

un excès de nutriments chez le fœtus ou le nouveau-né peut entraîner des altérations de l'homéostasie énergétique à long terme (Scheen and Junien, 2012). Ces modifications peuvent être transmises à la descendance (c'est l'empreinte métabolique) mais sont à priori réversibles puisqu'elles n'entraînent pas d'altérations dans la séquence de l'ADN.

Les facteurs environnementaux

Comme nous l'avons évoqué, même si des prédispositions génétiques existent, leur interaction avec l'environnement ou le mode de vie est déterminant dans le développement de l'obésité. Par exemple, une grande variété de molécules chimiques de l'environnement, incluant des contaminants alimentaires, ont une activité obésogène (Baillie-Hamilton, 2002). Elles seraient à l'origine de modifications pouvant influencer le métabolisme et l'adiposité (Grun and Blumberg, 2009). La plupart de ces molécules sont des perturbateurs endocriniens (Grun and Blumberg, 2009), dont un exemple connu est celui du bisphénol A (BPA) qui entre dans la composition de nombreux emballages alimentaires en plastique ou encore des revêtements intérieurs des boîtes de conserve ; il est capable de migrer dans les aliments, sous l'effet de la chaleur notamment. De nombreuses études chez le rongeur ont identifié un effet du BPA sur l'homéostasie énergétique, ce qui résulte en une augmentation de la masse corporelle, particulièrement lors d'une exposition péri-natale (Le Corre et al., 2015). Chez l'Homme, peu d'études épidémiologiques ont examiné le rôle du BPA dans l'épidémie d'obésité. Malgré l'absence de consensus par rapport à la dangerosité du BPA chez l'Homme, ce composé a été interdit en France dans les biberons dès 2010, et depuis le 1^{er} janvier 2015 dans tous les emballages alimentaires par principe de précaution.

Un autre facteur qui peut être impliqué dans le développement de l'obésité est le microbiote intestinal. L'intestin humain forme un environnement complexe (le microbiome) qui contient une population de 10^{14} bactéries (le microbiote). Le microbiote intestinal est mis en place dès la naissance et joue un rôle fondamental dans le bien-être et la santé de l'hôte, en étant impliqué dans diverses fonctions biologiques, telles que la défense contre les pathogènes, le renforcement des fonctions immunitaires, le développement des villosités intestinales et la dégradation des polysaccharides non digestibles (fibres) (Everard and Cani, 2013). Ces dernières années de nombreuses études ont mis en avant un lien très fort entre la composition du microbiote et le contrôle de la prise de poids. La première étude montrant un effet direct du microbiote sur le développement de la masse grasse et sur l'altération de l'homéostasie énergétique date de 2004 (Backhed et al., 2004). Les auteurs révèlent que les souris axéniques (dépourvues de microbiote) sont plus minces que les souris conventionnelles, malgré une prise alimentaire plus importante. Le transfert d'un microbiote chez ces souris se traduit par une augmentation de la masse grasse. Les mécanismes impliqués sont multiples et encore mal connus. Ils incluent une capacité du microbiote à augmenter la proportion d'énergie extraite de la nourriture, et à moduler les voies de signalisation impliquées dans l'homéostasie énergétique et le métabolisme de l'hôte, sans oublier son rôle dans l'inflammation bas-bruit caractéristique de l'obésité (Everard and Cani, 2013).

Le statut social est déterminant dans le risque d'obésité. Le poste alimentation est l'un des plus importants dans le budget des ménages français : ceux qui ont un revenu supérieur à 3500€ nets mensuels dépensent 539€ par mois pour l'alimentation, alors que ceux qui ont un revenu de moins de 1000€ dépensent 222€ en moyenne (Laisney, 2013). Ces différences sociales se traduisent dans le type d'aliments choisis et sont visibles dès l'enfance et l'adolescence : pour les catégories sociales les plus élevées, « bien nourrir son enfant » revient à lui proposer des aliments jugés sains, alors que pour les catégories les plus basses, cela revient à lui offrir une abondance d'aliments nourrissants. Les données collectées dans l'enquête NutriNet-Santé confirment que le pourcentage de sujets suivant les recommandations nutritionnelles du PNNS est plus faible chez les ouvriers que chez les cadres (Nutrinet-Santé, 2011). Tout ceci se traduit par une prévalence de l'obésité inversement proportionnelle au niveau de revenu du foyer (ObEpi, 2012).

Ceci nous amène à la composante principale du développement de l'obésité : le déséquilibre entre les apports énergétiques et les dépenses. L'évolution du monde occidental tend vers un mode de vie plus urbain et sédentaire qui contribue à diminuer les dépenses énergétiques. Cette tendance est également présente dans des pays à revenu faible ou intermédiaire, où les populations sont davantage exposées à une alimentation inadaptée, dense en énergie mais dont la qualité nutritionnelle (présence de vitamines et minéraux) est médiocre, associée à une sédentarisation liée à l'évolution des modes de vie et de transport. Au niveau des activités sportives, selon un rapport de la Commission Européenne (Spécial Eurobarometer 412, 2014) 42% des français déclarent ne jamais faire de sport. D'autre part, depuis la révolution industrielle du XIX^e siècle, contemporaine des progrès du monde agricole, une « transition nutritionnelle » s'est amorcée, se traduisant par une diminution de la consommation de glucides au profit des lipides (figure 3), qui s'accélère vers 1960, au moment du développement des grandes surfaces et des industries agroalimentaires.

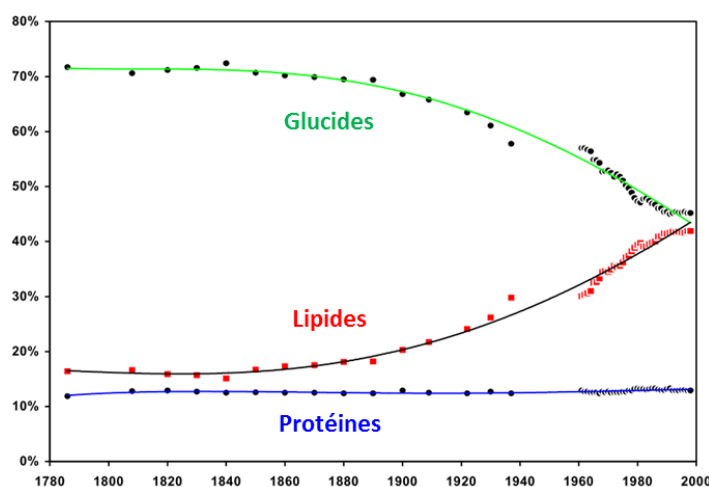


Figure 3 : Evolution de la structure des apports énergétiques en France depuis 1961.

Source : (Combris 2011) d'après FAO Stat.

Aujourd'hui, l'apport calorique total demeure stable dans la population adulte (environ 2500kcal/j chez les hommes et 1900kcal/j chez les femmes en moyenne) et proche des ANC (apports nutritionnels conseillés). Il faut donc s'intéresser à la qualité des apports pour expliquer en partie l'épidémie d'obésité. Pour les glucides, ils apportent environ 45% de l'apport énergétique sans alcool alors que les recommandations de l'Anses sont d'atteindre 50 à 55%, en privilégiant les glucides complexes, en diminuant les glucides simples et en augmentant la quantité de fibres consommées.

Pour les lipides, la part recommandée dans l'apport énergétique est de 35 à 40% selon l'Anses. La limite haute de la fourchette proposée par l'Anses est dépassée en France par environ 43% des adultes et 34% des enfants. De manière intéressante, l'augmentation de la part de lipides au cours de la transition nutritionnelle en France correspond à l'apparition de l'épidémie d'obésité. Du point de vue qualitatif, la proportion d'acides gras saturés (AGS) est trop importante (17% contre 12% recommandés par l'Anses). Quant aux acides gras essentiels, dans le régime occidental, le rapport oméga 6 / oméga 3 est de 17, alors que l'Anses recommande un rapport de 4 (Simopoulos, 2008). Or, il est connu qu'un rapport élevé favorise les processus inflammatoires, les risques de maladies cardiovasculaires et l'obésité (Guesnet, 2005).

Quelles sont les questions posées ?

Le lien existant entre l'alimentation et la santé est indéniable. L'épidémie d'obésité au niveau mondial associée au déséquilibre de la balance énergétique entraîne de nombreuses questions concernant les comportements vis-à-vis de la consommation d'aliments palatables. Les comportements à l'origine de la régulation de la prise alimentaire sont complexes et intègrent des mécanismes centraux associés à l'homéostasie énergétique mais également à la notion de plaisir retiré de la consommation des aliments, impliquant un circuit cérébral de « récompense ». Chez les sujets et animaux obèses, ces mécanismes semblent perturbés, aboutissant à une préférence pour les aliments palatables (Drewnowski et al., 1985; Mela and Sacchetti, 1991), qui eux-mêmes entraînent une dérégulation des phénomènes de satiété (Besnard et al., 2016 (in press); Erlanson-Albertsson, 2005). De plus, une piste émergente laisse penser que les mécanismes périphériques de détection des saveurs pourraient également être modifiés lors de l'obésité. On s'aperçoit alors de la complexité des interactions entre tous les phénomènes qui coexistent (figure 4) pour aboutir à l'idée que les obèses vivent dans un « monde sensoriel et or-hédonique différent » (Bartoshuk et al., 2006).

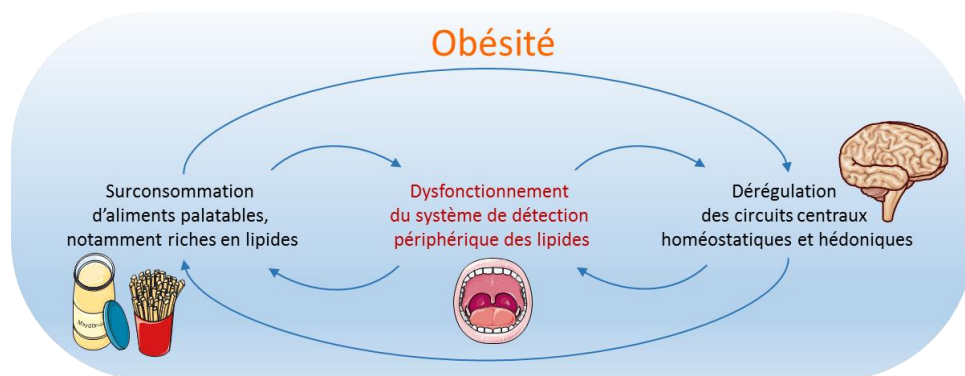


Figure 4 : Interconnexion des mécanismes du comportement alimentaire liés à l'obésité.

Le fonctionnement du système gustatif de détection des saveurs est bien décrypté, même s'il reste des zones d'ombre, notamment concernant les communications intercellulaires. La détection gustative des saveurs, ainsi que l'action des nutriments au niveau gastro-intestinal, permettent d'ajuster le comportement alimentaire grâce à l'intégration de l'ensemble des signaux au niveau central. Dans ce cadre, les lipides jouent un rôle très important dans la régulation de la prise alimentaire. Un système de *sensing* des lipides existe en effet, notamment au niveau de l'axe intestin-cerveau, et permet de médier leurs effets satiétogènes d'une part, et hédoniques ou gratifiants d'autre part. Mais ce *sensing* des lipides existe aussi au niveau oral : de plus en plus de preuves sont en faveur d'une détection gustative des lipides, grâce à des lipido-récepteurs candidats présents dans les bourgeons du goût : CD36 et GPR120. Cependant, la présence de deux récepteurs pose la question de leurs rôles respectifs dans la détection des lipides. Une autre interrogation concerne l'efficacité de ce système de détection lors de l'obésité et les mécanismes mis en jeu. La compréhension de l'ensemble de ces phénomènes apparaît comme primordiale pour envisager des moyens de lutte contre l'obésité.

Partie I : Quelle est l'organisation du système gustatif et comment sont détectées les saveurs ?

Le sens du goût permet d'évaluer les caractéristiques hédoniques mais aussi le contenu nutritionnel des aliments et de prévenir l'ingestion de composés toxiques. De manière très basique, le sucré permet d'identifier des aliments riches en énergie, l'umami reflète les acides aminés, le salé assure un équilibre électrolytique, l'acide peut prévenir l'ingestion d'aliments avariés ou pas assez mûrs et l'amer peut avertir sur la présence potentielle de composés nocifs. Les molécules sapides des aliments sont détectées par les cellules gustatives regroupées dans des bourgeons du goût, eux-mêmes organisés dans des structures appelées papilles gustatives.

I.1. Papilles gustatives

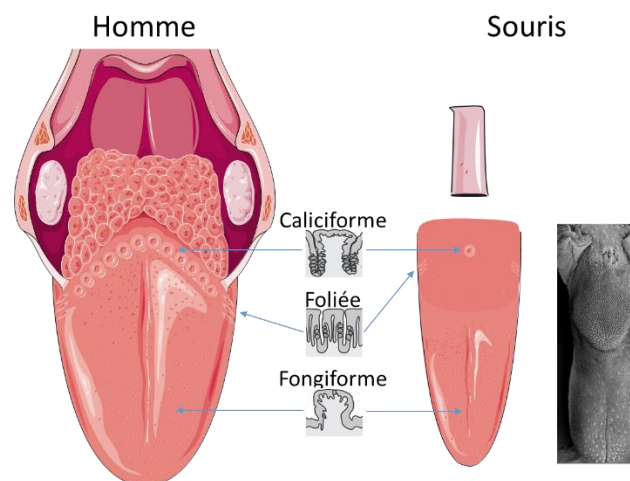


Figure 5 : Structure et localisation des papilles gustatives sur la langue.

Les images des papilles sont tirées de (Galindo et al., 2012a). La photo de langue de souris a été réalisée au microscope électronique à balayage (Liu et al., 2013).

Il existe 3 types de papilles gustatives, chez le rongeur comme chez l'Homme, localisées sur l'épithélium lingual (figure 5). Les papilles caliciformes, environ une dizaine chez l'Homme et une seule chez la souris, sont situées à l'arrière de la langue. Elles contiennent un grand nombre de bourgeons du goût (plusieurs centaines chez la souris). Les papilles foliées se trouvent sur les bords latéraux postérieurs et contiennent d'une douzaine à une centaine de bourgeons du goût. Les fongiformes, qui contiennent un à quelques bourgeons du goût, sont localisées sur les 2/3 antérieurs et sont au nombre de quelques centaines (Chandrashekar et al., 2006; Galindo et al., 2012a). Les trois types de papilles proviennent d'origines embryonnaires différentes : les papilles caliciformes et les papilles foliées sont dérivées de

l'endoderme alors que les fongiformes sont dérivées de l'ectoderme (Kist et al., 2014). Notons également la présence de papilles filiformes, responsables de la texture « rugueuse » de la langue, qui ne contiennent pas de bourgeons du goût. Elles participent à la perception des sensations trigéminales (texture, température, nociception etc.).

I.2. Bourgeons du goût

Les bourgeons du goût sont composés de 50 à 100 cellules de formes allongées et polarisées, connectées par des jonctions serrées (protéines claudine et ZO-1 par exemple). Ils sont principalement localisés dans les papilles gustatives, mais certains sont également trouvés sur le voile du palais et l'épithélium pharyngien et laryngien (Galindo et al., 2012a). La partie basale des bourgeons du goût est connectée aux afférences nerveuses. La partie apicale, constituée du pore gustatif où débouchent les villosités des cellules, est en contact avec la salive (figure 6). Les bourgeons du goût sont irrigués par de nombreux capillaires.

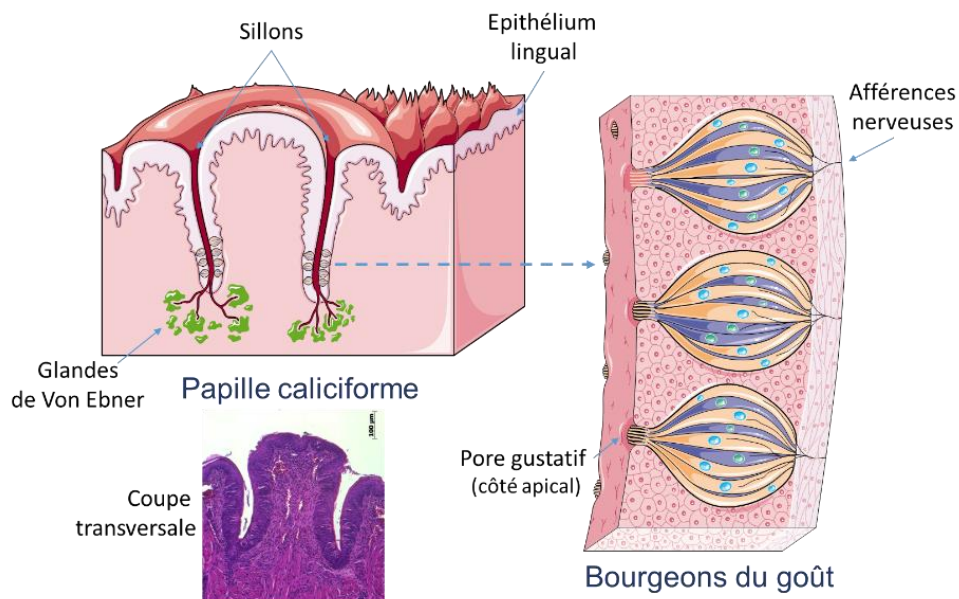


Figure 6 : Structure de la papille caliciforme et des bourgeons du goût, et coupe transversale d'une papille caliciforme de souris.

Coloration à l'hématoxyline et éosine - données non publiées.

I.3. Cellules constituant les bourgeons du goût

Les cellules des bourgeons du goût ont à la fois les caractéristiques de cellules épithéliales qui se renouvellent continuellement, et également les caractéristiques de récepteurs sensoriels excitables qui communiquent avec les nerfs gustatifs. Elles se distinguent par leurs morphologies et leurs fonctions, très spécialisées. Il existe 3 types de cellules sensorielles dans les bourgeons du goût, et des cellules basales (figure 7). D'autres cellules, dites progénitrices, sont localisées à l'extérieur des bourgeons du goût.

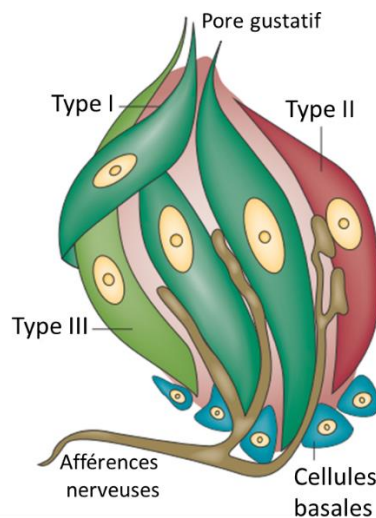


Figure 7 : Structure schématique d'un bourgeon du goût.
Adapté de (Calvo and Egan, 2015).

I.3.1. Cellules de type I

Les plus nombreuses au sein des bourgeons du goût, les cellules de type I sont situées à la périphérie et servent de cellules de maintien. Elles sont nommées « cellules sombres » car elles présentent des granules denses caractéristiques. Elles possèdent de longues villosités apicales. Elles sont qualifiées de *glial-like cells* car leurs fonctions sont similaires à celles des cellules gliales du système nerveux central. En effet, elles expriment le transporteur du glutamate GLAST (*glutamate-aspartate transporteur*) (Lawton et al., 2000) ainsi que la NTPDase2 (nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 2) (Bartel et al., 2006) qui hydrolyse l'ATP provenant des cellules voisines (figure 8). Or, l'ATP et le glutamate peuvent être considérés comme des neurotransmetteurs dans les bourgeons du goût (Finger et al., 2005; Vandenbeuch et al., 2010). Ainsi, comme les cellules gliales, le rôle des cellules de type I serait de moduler la transmission synaptique et de limiter la propagation des neurotransmetteurs dans les bourgeons du goût (Chaudhari and Roper, 2010). De plus, ces cellules expriment ROMK (*renal outer medullary K*) au niveau de la membrane apicale (Dvoryanchikov et al., 2009), suggérant qu'elles pourraient contribuer à l'élimination des ions potassium en excès dans les bourgeons du goût en les excréant au

niveau apical, et ainsi permettre aux cellules de type II et III de maintenir un état hyperpolarisé (de repos). Enfin, les cellules de type I semblent exprimer l' α -ENaC (canal sodique épithélial sensible à l'amiloride, sous-unité α), qui permet la perception du salé, au moins aux concentrations les plus basses (Chandrashekar et al., 2010; Vandenbeuch et al., 2008). D'autres études sont nécessaires pour confirmer le rôle des cellules de type I dans la perception du salé.

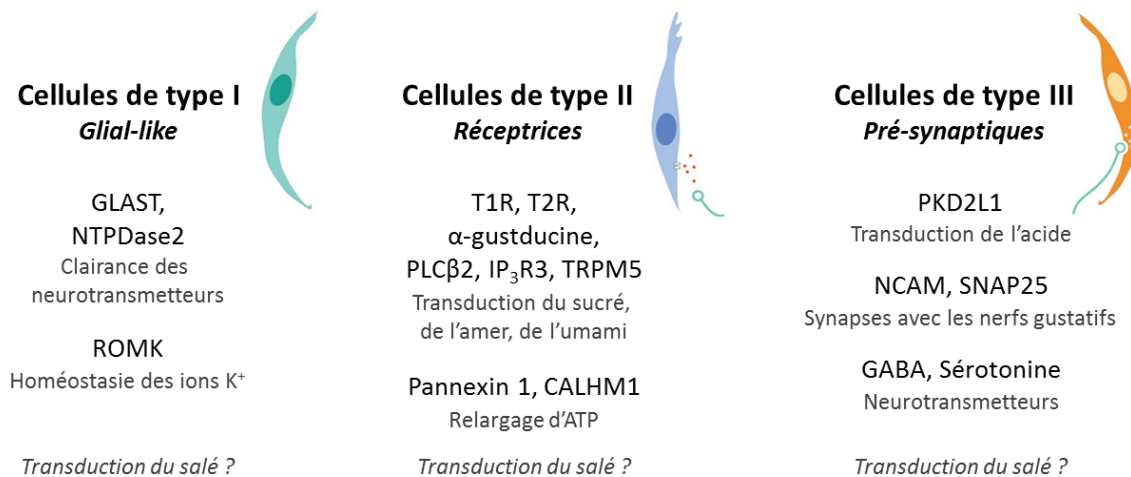


Figure 8 : Principaux marqueurs et fonctions des cellules gustatives des bourgeons du goût.

Adapté de (Chaudhari and Roper, 2010), schéma des cellules tiré de www.knowingneurons.com.

ATP : adénosine triphosphate ; CALHM1 : *calcium homeostasis modulator 1* ; GABA : acide γ -aminobutyrique ; GLAST : glutamate-aspartate transporteur ; IP $_3$ R3 : récepteur à l'inositol-triphosphate de type 3 ; NCAM : *neural cell adhesion molecule* ; NTPDase2 : nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 2 ; PKD2L1 : *polycystic-kidney-disease 2-like 1 ion channel* ; PLC β 2 : phospholipase C β 2 ; ROMK : *renal outer medullary K* ; SNAP25 : *synaptosome associated protein 25* ; TRPM5 : *melastatin-related transient receptor potential cation channel type 5* ; T1R/T2R : *taste receptor type 1/2*.

1.3.2. Cellules de type II

Les cellules de type II sont dites « claires » et possèdent de petites villosités. Souvent appelées « cellules réceptrices », elles expriment les récepteurs au sucré, à l'amer et à l'umami qui sont des GPCR (*G-protein coupled receptor*). Ceux-ci possèdent 7 domaines transmembranaires et, comme leur nom l'indique, sont couplées à des protéines G. Dans les cellules de type II, ils appartiennent à 2 familles : TAS1R ou T1R (*taste receptor type 1*) pour le sucré et l'umami (Nelson et al., 2002; Nelson et al., 2001) et TAS2R ou T2R (*taste receptor type 2*) pour l'amer (Adler et al., 2000). Une cellule de type II donnée exprime les GPCR spécifiques d'une seule saveur (umami, sucré ou amer) (Chandrashekar et al., 2006). Il est à noter que les cellules sensibles à l'amer pourraient également répondre à de grandes concentrations de NaCl par des mécanismes indépendants des canaux ENaC (Oka et al., 2013). Les cellules de type II expriment par ailleurs des protéines impliquées dans la signalisation en aval des récepteurs T1R et T2R telles que l' α -gustducine, la PLC β 2 (phospholipase C β 2), l'IP $_3$ R3 (récepteur à l'inositol-triphosphate de type 3) et le TRPM5 (*melastatin-related transient receptor potential cation channel type 5*) (figure 8) (Galindo et al., 2012a).

Les cellules de type II forment des synapses non-conventionnelles avec les fibres nerveuses : des citernes issues du réticulum endoplasmique (RE) lisse sont trouvées très proches des membranes vers les fibres nerveuses, suggérant un lien fonctionnel qui pourrait être à l'origine d'une transmission d'un signal gustatif (Clapp et al., 2004). De plus, elles expriment des canaux sodiques et potassiques voltage-dépendants, essentiels pour produire des potentiels d'action, ainsi que les héli-canaux *pannexin-1* qui étaient à l'origine considérés comme étant impliqués dans la sécrétion d'ATP (Chaudhari and Roper, 2010; Huang et al., 2007). Cependant, plus récemment, les canaux CALHM1 (*calcium homeostasis modulator 1*) ont été identifiés : il semblerait que ceux-ci soient directement responsables du relargage d'ATP, neurotransmetteur clé liant les bourgeons du goût au système nerveux (Taruno et al., 2013).

Enfin, notons que les cellules de type II expriment les lipido-récepteurs CD36, et GPR120, capables de lier les acides gras à longue chaîne (AGLC) (Laugerette et al., 2005; Matsumura et al., 2009; Ozdener et al., 2014). Leurs fonctions seront détaillées dans la partie IV de cet Etat de connaissances.

1.3.3. Cellules de type III

Les cellules de type III sont des cellules présynaptiques. Elles possèdent une grande villosité et un cytoplasme de couleur intermédiaire entre les cellules de type I et les cellules de type II (Miura et al., 2006). Ce sont les seules qui forment des jonctions synaptiques conventionnelles avec les terminaisons nerveuses (Calvo and Egan, 2015). Comme les neurones, elles contiennent des canaux calciques voltage-dépendant (DeFazio et al., 2006) et sécrètent des neuromédiateurs tels que la sérotonine (5-HT), la norépinephrine, l'acétylcholine et l'acide γ -aminobutyrique (GABA) lorsqu'elles sont dépolarisées (Calvo and Egan, 2015). Elles sécrètent également la molécule d'adhérence neurale NCAM (*Neural Cell Adhesion Molecule*) (Iwasaki et al., 2012) et SNAP25 (*Synaptosome Associated Protein of 25kD*) (Kimura et al., 2014), impliquée dans les processus vésiculaires présynaptiques (figure 8). Enfin, les cellules de type III expriment des canaux sodiques et potassiques voltage-dépendants (comme les cellules de type II), à l'origine de potentiels d'action (Chaudhari and Roper, 2010).

Concernant les saveurs, les cellules de type III répondent directement à l'acide, au moins partiellement grâce à PKD2L1 (*polycystic-kidney-disease 2-like 1 ion channel*), mais d'autres systèmes sont probablement impliqués (Horio et al., 2011; Huang et al., 2006; Roper, 2013). Ces cellules semblent également répondre directement à la saveur salée (Roper, 2015; Tomchik et al., 2007), notamment pour les grandes concentrations par l'intermédiaire d'un mécanisme autre que celui des canaux ENaC (Oka et al., 2013) mais là encore, plus d'études sont nécessaires pour comprendre les mécanismes de perception du salé. D'autre part, une caractéristique clé des cellules présynaptiques est qu'elles intègrent des signaux générés par les cellules réceptrices de type II. Elles sont donc capables de répondre indirectement à l'amer, au sucré, et à l'umami (Tomchik et al., 2007).

1.3.4. Cellules basales

Un petit nombre de cellules de forme ovoïde, qui n'ont pas d'activité sensorielle, est situé au niveau basal des bourgeons du goût. Elles expriment la Sonic hedgehog (SHH) (Miura et al., 2001), protéine qui contrôle la division cellulaire notamment, et sont parfois appelées cellules de type IV. Il a précédemment été proposé que ces cellules fonctionnent comme des cellules souches ou progénitrices (Sullivan et al., 2010). Cependant, plus récemment, il a été montré que les cellules basales semblent être majoritairement des précurseurs post-mitotiques, provenant de cellules extérieures aux bourgeons du goût (voir paragraphe suivant), pour les 3 types de cellules gustatives différenciées (Feng et al., 2014b; Miura et al., 2014). Le programme de différenciation des bourgeons du goût s'effectue sous le contrôle de la SHH (Castillo et al., 2014) et de la β -caténine (Gaillard et al., 2015). Une petite partie de ces cellules comprend néanmoins des cellules immatures indifférenciées prolifératives (<10%), nées à l'intérieur des bourgeons du goût (Perea-Martinez et al., 2013). L'ensemble forme une population hétérogène et peu définie, contrairement aux autres types cellulaires des bourgeons du goût, c'est pourquoi le terme de « type IV » ne semble pas approprié.

1.3.5. Cellules progénitrices

Les bourgeons du goût subissent un renouvellement, une différenciation et une dégénérescence constants (figure 9). En moyenne, 11% des cellules gustatives sont remplacées chaque jour (Zeng et al., 2000). La période de survie des cellules peut être estimée grâce à des analogues de nucléosides tels que le BrdU (5-bromo-2'-deoxyuridine) ou plus récemment l'EdU (5-éthynil-2'-deoxyuridine) qui s'incorporent dans l'ADN des cellules en prolifération. Grâce à ces méthodes, la durée de vie moyenne des cellules gustatives a été estimée à 8-12 jours, mais les cellules de type III semblent avoir une demi-vie plus longue (22 jours en moyenne) (Feng et al., 2014b; Perea-Martinez et al., 2013). Les analyses au BrdU montrent que la plupart des cellules marquées réside dans la région basale, à l'extérieur des bourgeons du goût (Hamamichi et al., 2006). Ainsi, la majorité des cellules progénitrices se trouve dans l'épithélium en dehors des bourgeons du goût, ce qui est confirmé par des études immuno-histochimiques utilisant des marqueurs de prolifération cellulaire tels que le Ki67 (Cohn et al., 2010; Hamamichi et al., 2006). Ces cellules génèrent des cellules transitoires qui entrent dans les bourgeons du goût en tant que précurseurs post-mitotiques, devenant alors des cellules basales exprimant la SHH, qui vont ensuite se différencier en cellules gustatives (Feng et al., 2014b; Miura et al., 2014). Ces mécanismes de renouvellement et de différenciation semblent s'effectuer sous le contrôle de la voie Wnt/ β -caténine (Gaillard et al., 2015).

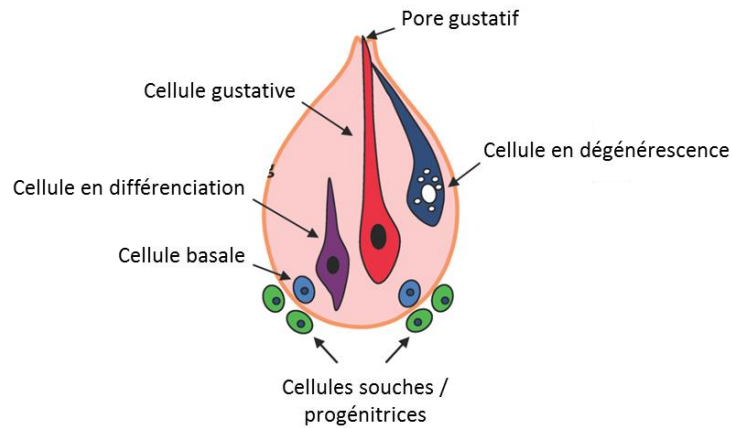


Figure 9 : Processus de renouvellement des cellules des bourgeons du goût.
Adapté de (Feng et al., 2014b).

I.4. Transduction des saveurs primaires

La transduction des saveurs primaires s'effectue par l'intermédiaire de récepteurs situés à la membrane apicale des cellules gustatives. Un signal est ensuite produit dans la cellule, qui aboutit soit à une réponse directe de la cellule vers les nerfs gustatifs, soit à une communication vers d'autres cellules du bourgeon du goût.

I.4.1. De nombreux récepteurs impliqués

La détection du salé fait intervenir les canaux ioniques ENaC, qui sont exprimées par les cellules de type I (Vandenbeuch et al., 2008), principalement dans les papilles fongiformes. Les canaux ioniques permettent le passage des ions (ici Na^+) directement dans la cellule. Cependant, les mécanismes de signalisation impliqués sont encore peu connus. La détection de l'acide pose également de nombreuses questions. Les canaux ioniques PKD2L1 semblent impliqués. Ils permettraient de faire entrer les protons dans la cellule de type III, entraînant la fermeture des canaux potassiques et donc une dépolarisation puis le relargage de neurotransmetteurs (Chang et al., 2010). De manière surprenante, cette protéine ne semble pas être impliquée dans la détection de la saveur acide au niveau de la papille caliciforme, mais uniquement au niveau des papilles fongiformes. De plus, les souris dont le gène codant pour PKD2L1 a été invalidé montrent une simple diminution de la réponse au niveau des papilles fongiformes, suggérant l'implication d'autres récepteurs dans la détection de l'acide (Horio et al., 2011; Roper, 2013).

Les saveurs umami, sucré et amer peuvent être détectées par des récepteurs métabotropiques. Ce sont généralement des protéines de la famille des GPCR, qui vont entraîner la production d'un 2nd messager intracellulaire. L'hétérodimère T1R2/T1R3 est capable de reconnaître les molécules sucrées : saccharose, glucose, fructose, mais aussi les édulcorants synthétiques : aspartame, cyclamate, etc. ou encore des protéines qui ont un goût sucré telles que la monelline (Treesukosol et al., 2011). D'autres

récepteurs au sucré ne sont cependant pas à exclure puisque les souris T1R3 KO sont sensibles à certains sucres (Damak et al., 2003). L'hétérodimère T1R1/T1R3 est quant à lui responsable de la détection de l'umami, induite par certains acides-aminés (comme le glutamate) et nucléotides. Cependant, les souris T1R3 KO sont capables de détecter l'umami (Damak et al., 2003). Cette saveur est complexe et pourrait en fait nécessiter plusieurs récepteurs exprimés dans différentes cellules gustatives, notamment les récepteurs métabotropiques au glutamate mGluR4 et mGluR1 (*metabotropic glutamate receptor*), trouvés dans les cellules de type II (Chaudhari et al., 2009). Enfin, les membres de la famille T2R, également des GPCR, détectent l'amer. Ils sont codés par 20 à 35 gènes et permettent de discriminer les différents composés amers, très nombreux et potentiellement toxiques (Chaudhari and Roper, 2010).

1.4.2. Signalisation intracellulaire

Le sucré, l'amer et l'umami sont médiés par une voie de signalisation commune et bien connue (figure 10) contrairement aux saveurs salée et acide. Cette cascade est initiée entre autres par une protéine G, qui est un hétérodimère composé de sous-unités α , β et γ . L'activation du récepteur par une molécule sapide va entraîner la liaison de GTP (Guanosine triphosphate) sur la sous-unité α , ainsi que la dissociation des sous-unités β et γ . Des études *in vitro* suggèrent que l' α -gustducine entraînerait une diminution de l'AMPc (AMP cyclique) intracellulaire, ce qui limiterait l'inhibition de l'IP₃R3 (récepteur à l'IP₃) – situé au niveau du RE – par la PKA (protéine kinase A, dépendante de l'AMPc). Ce phénomène permettrait un relargage efficace de Ca²⁺ du RE, augmentant ainsi la sensibilité de la cellule au stimulus sapide (Galindo et al., 2012a). Mais la principale voie de transduction implique la sous-unité G $\beta\gamma$ qui interagit avec la PLC β 2. Celle-ci transforme des phospholipides membranaires en DAG (diacylglycérol) et IP₃ (inositol-triphosphate). L'IP₃ va ensuite permettre l'ouverture des canaux calciques IP₃R3 du RE, ce qui entraîne la libération de Ca²⁺ dans le cytosol. L'ouverture des canaux TRPM5, dépendante du Ca²⁺ intracellulaire ([Ca²⁺]_i), crée une dépolarisation qui aboutit à un potentiel d'action dans la cellule. Finalement, le potentiel d'action permet la sécrétion d'ATP, probablement via CALHM1 (Calvo and Egan, 2015; Taruno et al., 2013). L'augmentation du [Ca²⁺]_i constitue donc un événement clé de la signalisation déclenchée par la liaison d'une molécule sapide avec son récepteur spécifique.

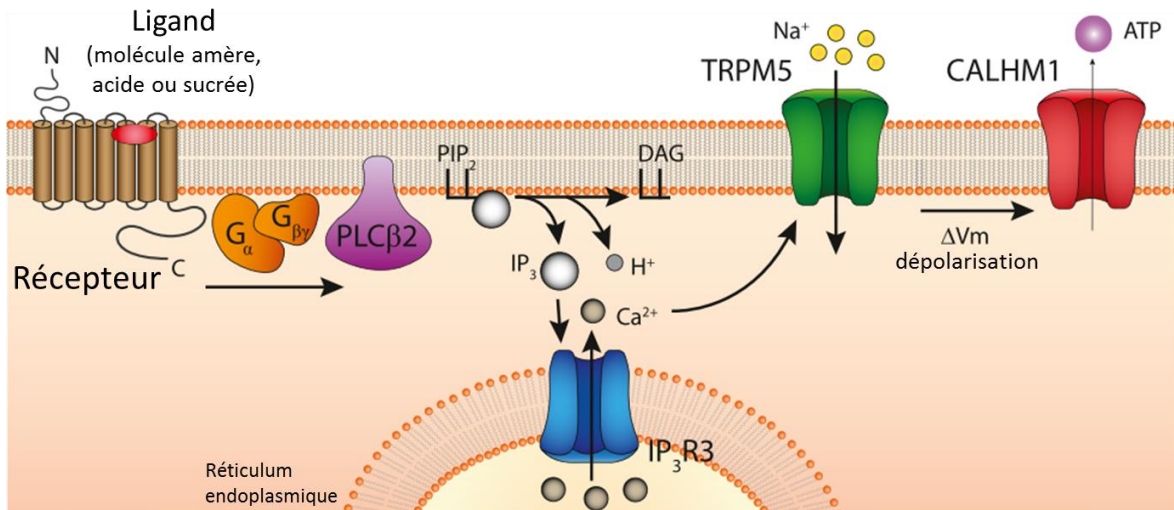


Figure 10 : Voie de signalisation dans les cellules de type II.

Adapté de (Liman et al., 2014).

ATP : adénosine triphosphate ; CALHM1 : *calcium homeostasis modulator 1* ; DAG : diacylglycerol ; G α et G $\beta\gamma$: protéines G, sous-unités α (notamment α -gustducine), β et γ ; IP $_3$: inositol-triphosphate ; IP $_3$ R3 : récepteur à l'inositol-triphosphate de type 3 ; PIP $_2$: phosphoinositol-4,5 diphosphate ; PLC β 2 : phospholipase C β 2 ; TRPM5 : *melastatin-related transient receptor potential cation channel type 5*.

1.4.3. Communication intercellulaire dans les bourgeons du goût

Les cellules de type II et III communiquent entre elles au moyen de neurotransmetteurs. Parmi ceux-ci, l'ATP semble jouer un rôle prépondérant (figure 11) : la délétion des récepteurs ionotropiques purinergiques à l'ATP (P $_2$ X $_2$ /P $_2$ X $_3$) élimine la réponse des nerfs gustatifs aux molécules sapides (Finger et al., 2005). Comme nous venons de le voir, l'ATP est sécrété par les cellules de type II en réponse à une molécule sapide, vraisemblablement par l'intermédiaire de CALHM1 (Taruno et al., 2013). L'ATP active ensuite les récepteurs purinergiques (P $_2$ X $_2$ /P $_2$ X $_3$) localisés sur les cellules de type II elles-mêmes, mais également sur les cellules de type III adjacentes et sur les fibres nerveuses afférentes. Ainsi, les cellules de type III sont activées indirectement par les molécules amères, sucrées et umami, même si elles ne sont pas absolument nécessaires pour la détection des saveurs. La délétion génétique des cellules de type III entraîne en effet la perte de détection de l'acide mais pas des autres saveurs (Huang et al., 2006), contrairement à la délétion des cellules de type II (Matsumoto et al., 2011). Les cellules présynaptiques sécrètent ensuite de la 5-HT. Le rôle de ce neurotransmetteur n'est pas tout à fait établi (Roper, 2013). Il est possible qu'il active directement les nerfs gustatifs, mais aussi qu'il agisse sur son récepteur (5-HT $_{A1}$) situé sur certaines cellules de type II afin de prolonger la transmission du signal en inhibant la sécrétion d'ATP, ce qui permettrait de prévenir la désensibilisation des récepteurs purinergiques (Besnard et al., 2016 (in press)). Enfin, l'ATP en excès est dégradé par la NTPDase2 localisée à la surface des cellules de type I (Bartel et al., 2006), permettant là-aussi de prévenir la désensibilisation des récepteurs P $_2$ X $_2$ /P $_2$ X $_3$ (Vandenbeuch et al., 2013). D'autres neurotransmetteurs (noradrénaline, GABA, acétylcholine) jouent également un rôle dans la communication intercellulaire, mais les mécanismes restent peu connus (Besnard et al., 2016 (in press); Roper, 2013).

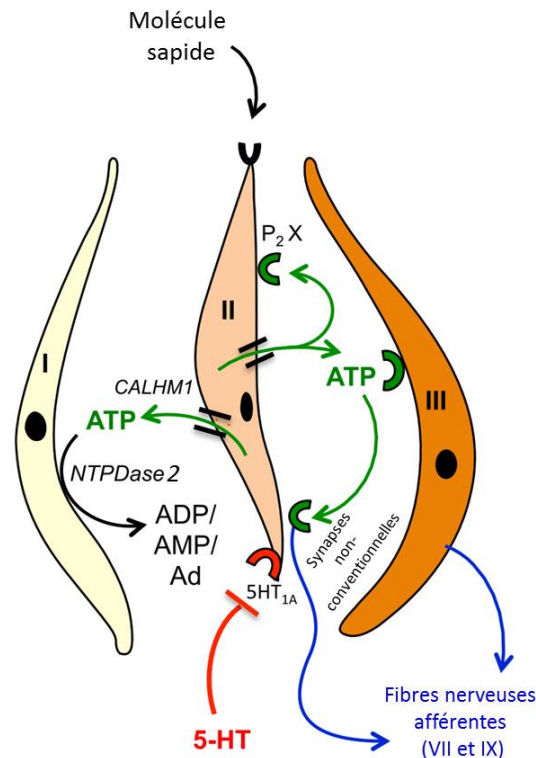


Figure 11 : Rôle de l'ATP dans la communication intercellulaire.

Adapté de (Besnard et al., 2016 (in press)).

Ad : adénosine ; ADP : adénosine diphosphate ; AMP : adénosine monophosphate ; ATP : adénosine triphosphate ; CALHM1 : *calcium homeostasis modulator 1* ; NTPDase2 : nucléoside triphosphate diphosphohydrolase 2 ; P₂X : récepteurs purinergiques à l'ATP ; 5HT : sérotonine ; 5HT_{A1} : récepteur à la sérotonine ; VII : corde du tympan ; IX : nerf glosso-pharyngien.

I.5. Système nerveux impliqué dans la transmission du signal gustatif

Les nerfs gustatifs (VII et IX) permettent de relayer l'information induite par une molécule sapide jusqu'au 1^{er} relais central gustatif : le NTS (Noyau du Tractus Solitaire). Les 2/3 antérieurs de la langue – où sont situées les papilles fongiformes et une partie des papilles foliées – ainsi que le palais sont innervés par la corde du tympan, ou nerf crânien VII. Le nerf glossopharyngien ou nerf crânien IX innerve le tiers postérieur, et donc les papilles caliciformes et la partie postérieure des papilles foliées. Le nerf vague (nerf crânien X) relaie quant à lui une partie des informations gustatives grâce aux quelques bourgeons du goût situés au niveau de l'œsophage supérieur. Il permet également d'informer le tractus digestif de l'arrivée de nutriments : c'est le phénomène d'anticipation digestive (figure 12). Notons que le nerf vague est mixte : à la fois afférent et efférent, il transmet également les signaux de satiété du tractus digestif vers le cerveau. Cet ensemble de nerfs est complété par le nerf trijumeau (nerfs crâniens V), dont les terminaisons sont responsables des informations somesthésiques : sensations thermiques, mécanoréception et nociception, qui participent indirectement à l'élaboration du goût.

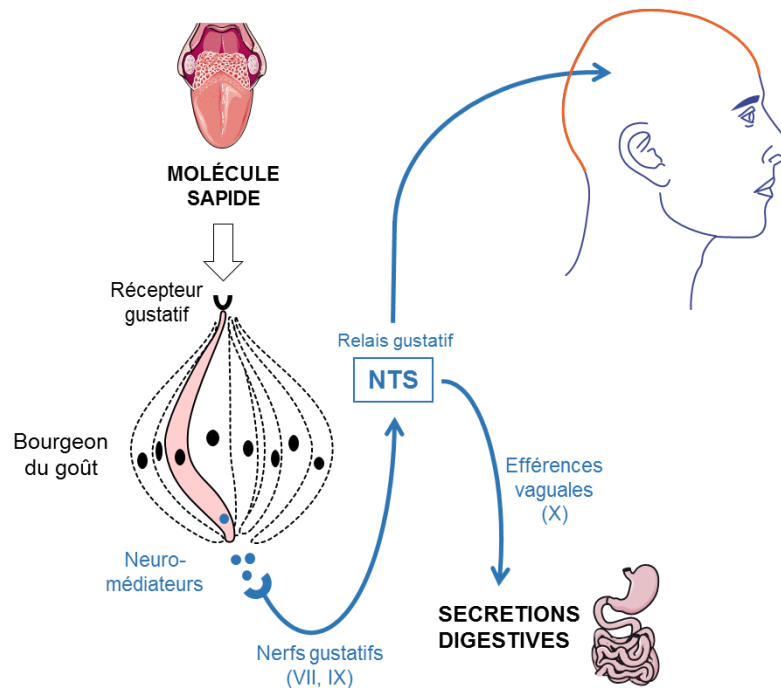


Figure 12 : Circuit gustatif, de la molécule sapide au NTS.

D'après (Besnard, 2015).

NTS : noyau du tractus solitaire.

Le système de codage périphérique du goût n'est pas encore consensuel (Besnard et al., 2016 (in press); Chandrashekar et al., 2006; Chaudhari and Roper, 2010). Deux théories sont majoritairement proposées : le système de « ligne identifiée » (*labeled-line*) ou le système combinatoire. Dans le premier, un type de récepteur est spécifique d'un type de cellule gustative, et des fibres nerveuses dédiées transmettent chaque saveur séparément. Dans le second, chaque fibre pourrait transmettre l'information de plusieurs modalités gustatives. L'ensemble des nerfs transmet l'information au NTS, qui projette des axones vers différentes aires cérébrales.

1.6. Facteurs influençant l'information gustative

Les bourgeons du goût expriment des hormones gastro-intestinales ainsi que certains de leurs récepteurs, qui peuvent être également trouvés sur les fibres nerveuses afférentes, suggérant un effet local de ces hormones (tableau 2). Certaines d'entre elles ont des effets sur la perception des saveurs (pour une revue voir (Shin and Egan, 2010) et (Calvo and Egan, 2015)). Le GLP-1 (*Glucagon-like peptide-1*) par exemple, dont le récepteur GLP-1R est exprimé notamment par les fibres nerveuses afférentes, est connu pour jouer un rôle dans la perception de la saveur sucré : les souris GLP-1R KO montrent une diminution de la perception du saccharose et du sucralose (un édulcorant artificiel) lors de tests de comportement court terme (Martin et al., 2012; Shin et al., 2008). De manière générale, la perception de toutes les saveurs semble être influencée par les hormones locales, mais également par les hormones

circulantes : la leptine, qui n'est pas exprimée par les cellules gustatives, joue par exemple un rôle de suppresseur de la réponse au sucré chez la souris *via* son récepteur, qui lui est exprimé par les cellules de type II (Kawai et al., 2000). Il en va de même chez l'Homme, chez qui les seuils de détection du sucré sont corrélés aux variations circadiennes des taux de leptine (Nakamura et al., 2008).

D'autres types de molécules, les endocannabinoïdes, peuvent également influencer les saveurs *via* leur récepteur, exprimé par certaines cellules gustatives (Yoshida et al., 2010). L'anandamide (N-arachidonoyléthanolamine) et le 2-arachidonyleglycerol (2-AG), qui sont des facteurs orexigènes, jouent un rôle opposé à la leptine en augmentant la réponse au sucré (Niki et al., 2015; Yoshida et al., 2010). De manière intéressante, chez des souris placées en régime obésogène, les cellules gustatives sensibles au sucré deviennent résistantes à la leptine, et parallèlement à ce phénomène, l'activité des endocannabinoïdes serait augmentée par une élévation du taux de 2-AG. Ainsi, le système endocannabinoïde deviendrait dominant dans la modulation de la réponse au sucré dans des conditions où la signalisation de la leptine est perturbée (Niki et al., 2015).

Tableau 2 : Localisation des hormones et de leurs récepteurs dans les bourgeons du goût.
D'après (Passilly-Degrace et al., 2013).

	Type I	Type II	Type III	Type IV	Fibres nerveuses	Références
GLP-1		X	X			(Shin et al., 2008)
GLP-1R			X		X	(Shin et al., 2008)
CCK-R		X				(Shen et al., 2005)
Récepteur CCK		X				(Herness et al., 2005)
NPY		X				(Zhao et al., 2005)
Récepteur NPY		X	X	X	X	(Hurtado et al., 2012)
VIP		X				(Shen et al., 2005)
Récepteur VIP		X				(Martin et al., 2010)
Ghréline	X	X	X	X		(Shin et al., 2010)
Récepteur ghréline	X	X	X	X		(Shin et al., 2010)
LEP-R		X				(Kawai et al., 2000)

CCK : cholécystokinine ; GLP-1 : *glucagon-like peptide-1* ; GLP-1R : récepteur au GLP-1 ; NPY : neuropeptide Y ; VIP : *vasoactive intestinal peptide* ; LEP-R : récepteur à la leptine.

Les informations transmises par l'intermédiaire du système gustatif convergent vers le cerveau pour y être intégrées à différents niveaux, permettant une réponse physiologique et une régulation du comportement alimentaire. D'autres signaux provenant de l'ingestion des aliments et de leurs effets dans le tractus gastro-intestinal vont également contribuer à contrôler la prise alimentaire.

Partie II : De la bouche au cerveau : comment est régulé le comportement alimentaire ?

Le comportement en général peut être défini en partie comme une réponse à un ou plusieurs stimuli, externes ou internes à l'organisme. Il est médié par le système nerveux central. Des stimuli répétés et de même nature vont souvent aboutir à un changement de comportement, autrement appelé apprentissage.

II.1. Eléments de définition du comportement alimentaire

Le comportement alimentaire est l'une des deux composantes de la balance énergétique. Il répond au principe d'homéostasie (point d'équilibre entre les apports et les dépenses) et regroupe l'ensemble des comportements d'un individu vis-à-vis de la consommation d'aliments. Lorsque le milieu interne est perturbé, l'individu va faire en sorte d'atteindre à nouveau son homéostasie, par un comportement qui va tenter de répondre à un besoin et qui aboutit à un « acte de consommation ». Cependant, le comportement alimentaire n'est pas uniquement déterminé par les besoins homéostatiques, comme le montrent des expériences chez le rongeur. Des souris ayant à leur disposition soit une solution d'huile de maïs soit une solution de saccharose en plus de leur nourriture habituelle vont consommer ces deux solutions jusqu'à dépasser leurs besoins caloriques et augmenter leur masse corporelle (Takeda et al., 2001a), particulièrement dans le cas de l'huile de maïs. D'autre part, des souris consomment généralement de manière préférentielle des solutions contenant des édulcorants par rapport à de l'eau, alors que les édulcorants n'apportent pas de calories (Bachmanov et al., 2001). La compréhension du comportement alimentaire doit ainsi intégrer les paramètres intrinsèques des aliments : aspect visuel, odeur, texture, saveurs, arômes. La finalité du comportement alimentaire est donc d'assurer d'une part l'approvisionnement en énergie et en nutriments nécessaires aux fonctions cellulaires et physiologiques de l'organisme, et d'autre part de satisfaire au plaisir lié à la consommation de nourriture agréable.

II.2. Régulation physiologique du comportement alimentaire

D'un point de vue physiologique, les aliments sont perçus par l'intermédiaire de signaux précoces orosensoriels à la fois somesthésiques (texture, température, piment...), olfactifs (ortho et rétro-olfaction) et gustatifs, et également par l'intermédiaire de signaux plus tardifs : post-ingestifs puis post-absorptifs. L'ensemble de ces informations est intégré au niveau central et conditionne le choix des aliments et les déterminants de la prise alimentaire.

II.2.1. Intégration des signaux gustatifs

Le NTS est localisé au niveau du bulbe rachidien (figure 14) et constitue le 1^{er} relais central gustatif : il est innervé par les nerfs gustatifs, vague et trijumeaux. Il projette des fibres nerveuses dans différentes parties du cerveau : notamment l'hypothalamus et le système cortico-limbique. Les informations gustatives, après avoir transité par le NTS, sont donc traitées par différentes aires cérébrales, notamment l'axe cortico-limbique à l'origine de la dimension émotionnelle non-homéostatique du comportement alimentaire. Ce système de récompense (« *reward* ») ou renforcement évalue la palatabilité des aliments, autrement dit leur valeur hédonique, grâce à trois composantes (Berridge et al., 2009) :

- La composante affective (*liking*), qui correspond au plaisir immédiat retiré de la consommation d'un aliment,
- La composante motivationnelle (*wanting*), qui reflète la détermination à obtenir la récompense alimentaire attendue,
- La composante cognitive (*learning*), permettant la mémorisation des expériences alimentaires antérieures, entraînant une hiérarchisation de la valeur hédonique des aliments.

L'intégration de ces paramètres détermine en partie les choix alimentaires (figure 13).

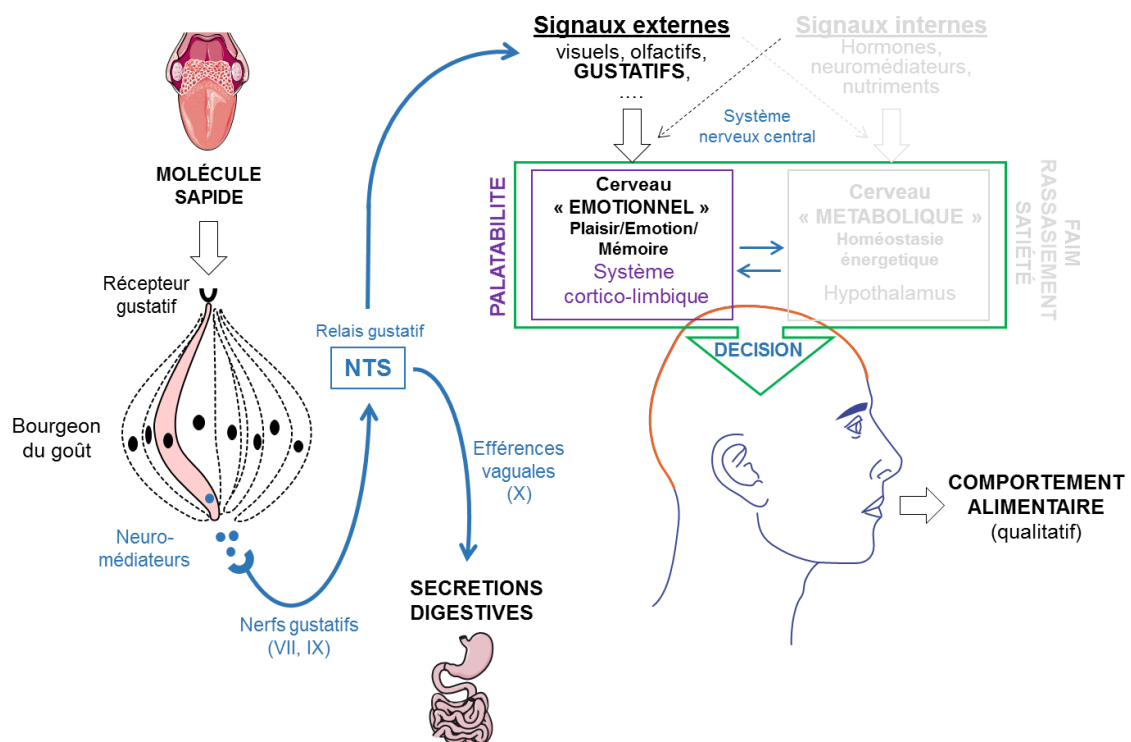


Figure 13 : Circuit d'intégration du signal gustatif au niveau du cerveau émotionnel.

D'après (Besnard, 2015).

NTS : noyau du tractus solitaire.

Le système cortico-limbique comprend différentes zones impliquées dans la régulation du comportement alimentaire : le cortex orbito-frontal, l'insula, l'aire tegmentale ventrale (VTA), le noyau accumbens (Nac) pour la motivation et la récompense (figure 14) ; l'amygdale et l'hippocampe pour l'émotion et la mémoire ; le cortex orbito-frontal pour le contrôle cognitif et l'attention (Besnard, 2015; Hussain and Bloom, 2013).

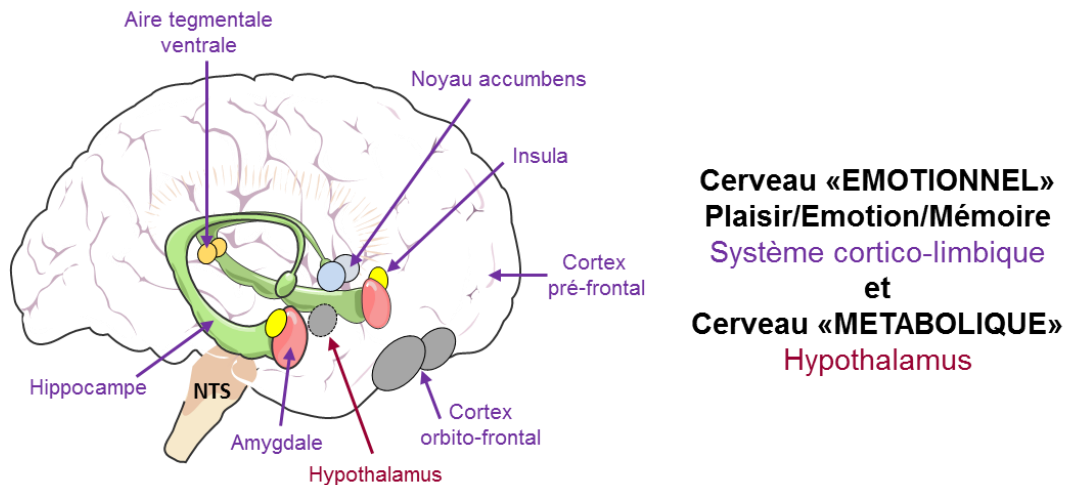


Figure 14 : Principales aires cérébrales impliquées dans la régulation du comportement alimentaire.

D'après (Besnard, 2015).
NTS : noyau du tractus solitaire.

II.2.2. Intégration des signaux post-ingestifs

Les signaux digestifs au niveau de l'estomac ou de l'intestin peuvent être transmis au système nerveux central soit par voie humorale, soit par voie vagale qui aboutit au NTS. Certains signaux sont mécaniques, comme par exemple la distension gastrique qui informe le cerveau de l'arrivée de nutriments. La présence de nutriments dans l'intestin est également détectée et contribue à la satiété postprandiale. D'autres signaux sont de nature hormonale dont la plupart ont pour effet la réduction de la prise alimentaire (Maljaars et al., 2007). Parmi les hormones gastro-intestinales sécrétées en réponse à l'arrivée de nutriments, on peut citer par exemple la cholécystokinine (CCK), le GLP-1 ou encore le peptide YY (PYY). Ces hormones agissent soit *via* le nerf vague, soit directement sur leurs récepteurs au niveau de l'hypothalamus. Il est à noter que la seule hormone gastro-intestinale connue qui stimule la prise alimentaire est la ghréline : sa concentration plasmatique augmente avant un repas pour initier la sensation de faim. L'insuline est quant à elle sécrétée par le pancréas en réponse à une augmentation de la glycémie, et la leptine est produite principalement par les adipocytes. Ces deux hormones ont une action satiétogène à court terme suite à un repas, mais également à long terme : leurs taux plasmatiques sont en effet proportionnels à la masse grasse (Benoit et al., 2004).

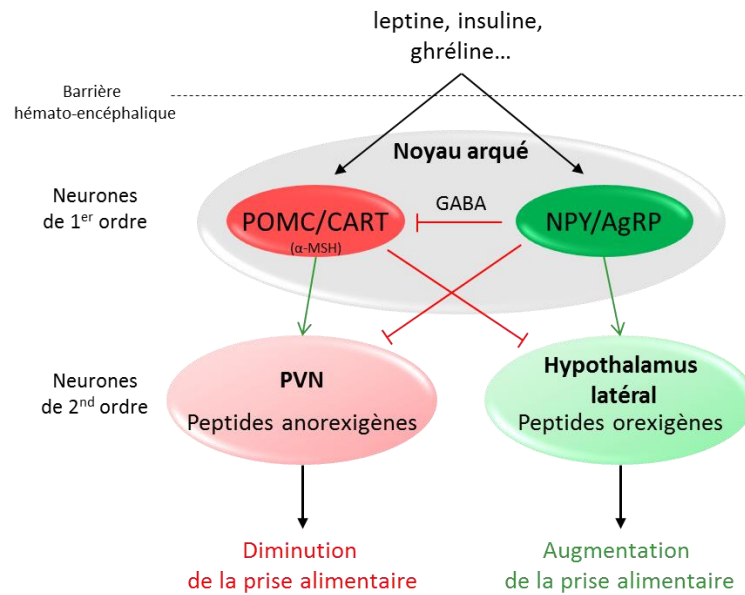


Figure 15 : Système mélanocortine central.

Adapté de P. Besnard.

AgRP : *agouti-gene related peptide* ; α-MSH : *alpha-melanocyte-stimulating hormone* ; CART : *cocaine and amphetamine related transcript* ; GABA : acide γ-aminobutyrique ; NPY : neuropeptide Y ; POMC : pro-opiomélanocortine ; PVN : noyau paraventriculaire.

L'hypothalamus joue un rôle fondamental dans la régulation de la prise alimentaire et le métabolisme énergétique en général, en intégrant les signaux périphériques internes de faim ou de satiété. Ce système de régulation est homéostatique : il s'agit du « cerveau métabolique » (figure 14). Il est constitué de différentes aires, dont le noyau arqué qui est pourvu d'une barrière hémato-encéphalique perméable lui permettant d'accéder aux hormones circulantes (leptine, insuline, ghréline par exemple). Les populations neuronales du noyau arqué communiquent avec d'autres aires de l'hypothalamus également impliquées dans le contrôle de la prise alimentaire, comme l'hypothalamus latéral, le noyau paraventriculaire (PVN) ou le noyau ventromédian (VMH). Les neurones du noyau arqué expriment des neuropeptides dont certains ont des effets orexigènes (stimulant la prise alimentaire) et d'autres des effets anorexigènes (inhibant la prise alimentaire). Le système orexigène est constitué du NPY et de l'*Agouti-gene Related Peptide* (AgRP), d'où le nom de neurones NPY/AgRP. Le système anorexigène exprime la pro-opiomélanocortine (POMC), précurseur de l'*alpha-Melanocyte-Stimulating hormone* (α-MSH) ou mélanocortine et le *Cocaine and Amphetamine Related Transcript* (CART). Ces neurones sont appelés POMC/CART. Ces 2 systèmes sont antagonistes et s'inhibent entre eux, ce qui permet une régulation fine de la prise alimentaire. Ils constituent le système mélanocortine central (figure 15). L'insuline et la leptine activent les neurones POMC/CART et inhibent les neurones NPY/AgRP, alors que la ghréline a une action inverse. Enfin, notons que les nutriments eux-mêmes, notamment les AGLC et le glucose, peuvent agir directement au niveau de l'hypothalamus pour réguler la prise alimentaire (Carey et al., 2013; Obici et al., 2002).

En bref, le comportement alimentaire résulte de l'intégration de signaux externes (notamment gustatifs) par le système cortico-limbique, permettant d'évaluer la palatabilité des aliments, et de signaux internes (de satiété, de rassasiement et de faim) par l'hypothalamus, permettant d'adapter la prise alimentaire aux besoins énergétiques de l'organisme. De plus, les signaux externes gustatifs peuvent également être intégrés par l'hypothalamus, et les signaux internes (comme les hormones) par le système cortico-limbique, entraînant un dialogue entre le système homéostatique et le système non-homéostatique. L'ensemble permet ainsi de relier la satisfaction hédonique au bien-être métabolique procuré par un aliment et de réguler les choix alimentaires (figure 16). Les propriétés sensorielles et nutritionnelles des aliments ont donc des effets différents sur la régulation du comportement alimentaire.

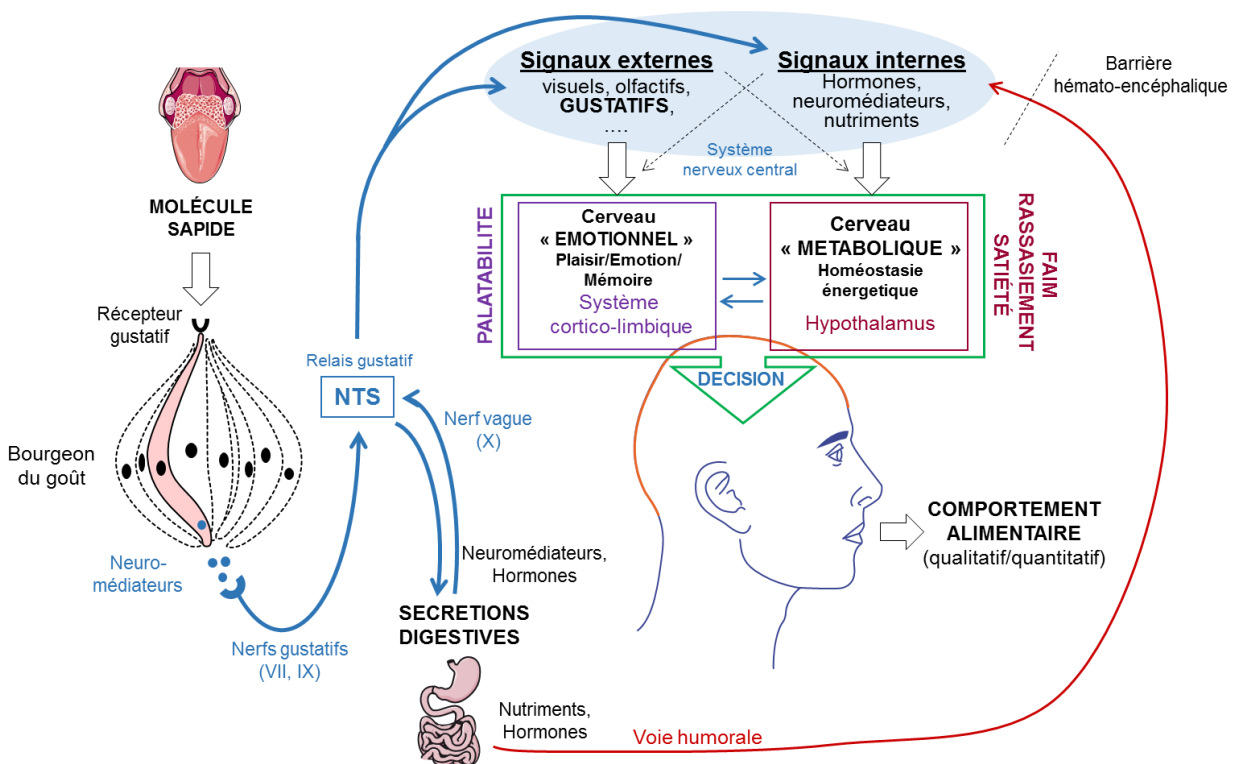


Figure 16 : Circuit d'intégration, du signal gustatif aux cerveaux émotionnel et métabolique.

D'après (Besnard, 2015).

NTS : noyau du tractus solitaire.

Partie III : Comment le *sensing* des lipides régule-t-il le comportement alimentaire ?

Afin d'aborder les effets physiologiques des lipides sur le comportement alimentaire, nous allons dans un premier temps définir les différentes classes de lipides et résumer leurs fonctions au niveau cellulaire.

III.1. Définitions et fonctions cellulaires des lipides

Communément appelés « graisses », les lipides appartiennent à la famille des macronutriments avec les glucides et les protides. Ce sont les plus énergétiques, en apportant 9kcal/g, contre 4kcal/g pour les glucides ou protides. D'ailleurs, ils souffrent d'une mauvaise image car ils sont associés au surpoids, à l'obésité et aux maladies cardio-vasculaires. Pourtant, ils sont indispensables à de nombreuses fonctions dans l'organisme.

III.1.1. Structure et nomenclature des lipides

Dans les aliments, les lipides sont représentés à plus de 95% par les triglycérides (TG), les 5% restant étant constitués de phospholipides (PL) et de stérols. On retrouve également dans l'alimentation des traces d'acides gras libres (AGL). Les TG sont des esters de trois acides gras (AG) associés à un glycérol. Ils constituent la principale forme de stockage de l'énergie dans l'organisme, dans le tissu adipeux. Les PL sont majoritairement des phosphoglycérides, molécules amphiphiles constituées d'une tête polaire hydrophile et de deux queues aliphatiques hydrophobes. Cette caractéristique leur confère la possibilité de s'organiser en milieu aqueux en micelles, liposomes ou bicouches. Ils sont ainsi à la base des membranes des cellules. Les stérols sont, quant à eux, des lipides contenant un noyau de stérane dont le carbone 3 est porteur d'un groupe hydroxyle qui peut être estérifié par un AG. Le cholestérol, d'origine animal, est le stérol le plus répandu.

Les AG sont des unités de structure qui peuvent être classées selon plusieurs critères. Le plus simple est la longueur de la chaîne carbonée : on distingue les AG à chaîne courte (AGCC < 8 C), les AG à chaîne moyenne (AGMC – 8 à 14 C) et enfin les AG à longue chaîne (AGLC ≥ 16 C). Un deuxième critère est défini par le degré d'insaturation, c'est-à-dire le nombre de double-liaisons de la chaîne carbonée. Les AGS ne contiennent aucune double-liaison, les acides gras mono-insaturés (AGMI) contiennent une seule double-liaison et les acides gras polyinsaturés (AGPI) en possèdent plusieurs.

Les AGPI peuvent être classés en fonction de la position de la 1^{ère} insaturation par rapport au groupement méthyle de la chaîne carbonée. Ainsi, on distingue majoritairement les omégas 3 (ω 3 ou n-3) et les omégas 6 (ω 6 ou n-6). Les précurseurs métaboliques des familles ω 3 et ω 6 sont respectivement

l'acide α -linoléique (ALA ; 18:3 n-3) et l'acide linoléique (LA ; 18:2 n-6) qui sont dits « indispensables » car l'organisme des mammifères ne peut pas les synthétiser. En effet, les animaux ne possèdent pas les $\Delta 12$ et $\Delta 15$ désaturases qui permettraient la synthèse du LA et de l'ALA à partir de l'acide oléique (OLA ; 18:1 n-9). Ces AG doivent donc être apportés par l'alimentation. L'organisme est ensuite capable, par une succession d'élongations et de désaturations, de transformer ces AG indispensables en dérivés supérieurs, principalement l'acide eicosapentaénoïque (EPA ; C20:5 n-3), l'acide docosahexaénoïque (DHA ; C22:6 n-3) et l'acide arachidonique (AA ; C20:4 n-6). L'ensemble des AG $\omega 3$ et $\omega 6$ sont qualifiés d'AG « essentiels ».

Enfin, les AG insaturés peuvent avoir deux configurations spatiales différentes, donc deux isomères : *cis* et *trans*. La plupart des AG de l'alimentation sont de configuration *cis*, c'est-à-dire que les deux parties de la chaîne carbonée séparées par une double-liaison sont du même côté d'un plan horizontal (les atomes d'hydrogène sont du même côté). Les isomères *trans*, dont les atomes d'hydrogènes sont situés de part et d'autre de la double-liaison, sont beaucoup plus rares. Ils peuvent être d'origine naturelle (l'acide *trans*-vaccénique et l'acide ruménique produits par l'estomac des ruminants) ou plus souvent d'origine technologique (synthétisés par exemple par les industries agroalimentaire lors de l'hydrogénation des huiles végétales).

III.1.2. Fonctions des lipides au niveau cellulaire

Tous les AG alimentaires fournissent de l'énergie par leur catabolisme, et la majorité présente une fonction de structure des membranes cellulaires. Les AGPI essentiels permettent en outre la synthèse de molécules bioactives et sont impliqués dans la signalisation cellulaire et la régulation de l'expression de gènes.

a. Rôle énergétique

Les AG sont stockés sous forme de TG dans les tissus adipeux. En cas de besoin (apport glucidique bas), les TG peuvent être hydrolysés et les AG sont dirigés *via* le sang vers autres tissus qui vont réaliser la β -oxydation des AG principalement dans les mitochondries. Ce processus permet une grande production d'ATP : les acides gras sont les nutriments les plus denses en énergie.

b. Rôle structural

Les membranes cellulaires sont constituées d'une bicouche lipidique, composée majoritairement de PL, dans laquelle sont ancrées des protéines et du cholestérol. Quelques glucides composent également la membrane : ils sont attachés aux lipides ou aux protéines. Les membranes sont des modèles hétérogènes composés de micro-domaines dynamiques. Cette fluidité joue un rôle important dans les fonctions cellulaires en régulant l'activité des protéines membranaires. La longueur et le degré d'insaturation des AG qui composent les PL modifient la structure de la membrane, et donc ses propriétés (fluidité, perméabilité etc.) (Ibarguren et al., 2014). Les AGS par exemple, en diminuant l'encombrement

stérique, vont augmenter les interactions entre les PL et donc rigidifier les membranes. Notons que la composition des AG est le reflet des apports alimentaires.

Un type de micro-domaine particulier reçoit beaucoup d'attention. Il s'agit des radeaux lipidiques (*lipid rafts*), riches en cholestérol et sphingolipides. Leur intérêt réside dans le fait qu'ils constituent des plateformes d'assemblage multi-protéiques. Ils sont nécessaires à l'activité d'enzymes, de transporteurs et de récepteurs, et sont en étroite association avec des protéines de signalisation telles que les protéines kinases de la famille Src (Src-PTK) (Ibarguren et al., 2014).

c. Rôle de précurseurs de molécules bioactives

Les AGPI, principalement l'AA mais également l'EPA, sont les précurseurs de molécules biologiquement actives. Les AG sont d'abord libérés des membranes grâce à la phospholipase A2, puis sous l'action soit des cyclooxygénases, soit des lipoxygénases, ils donnent naissance à des eicosanoïdes, molécules à 20 atomes de carbone. Les principaux sont les leucotriènes et les prostanoïdes (prostaglandines, prostacyclines et thromboxanes). Ces molécules régulent de nombreuses fonctions très variées ; elles sont d'ailleurs considérées comme des hormones impliquées dans la physiologie cardiaque, la coagulation sanguine, la régulation de l'inflammation, la contraction des muscles lisses, le fonctionnement des glandes endocrines etc. Leur mécanisme d'action mobilise des GPCR, conduisant à l'augmentation de la concentration intracellulaire d'AMPC puis à des cascades de signalisation cellulaire. Les 2 familles d'AGPI entrent en compétition pour la voie de désaturation-élongation, ce qui implique un effet de « balance métabolique » entre elles. Ainsi, un déséquilibre de l'apport de précurseurs par l'alimentation, c'est-à-dire un rapport $\omega 6/\omega 3$ trop élevé, comme c'est le cas pour le régime occidental, provoque un déséquilibre d'incorporation des AGLC dans les membranes. Or, les dérivés de l'AA (eicosanoïdes issus de la voie de la cyclooxygénase série 2) ont des propriétés aggrégantes et inflammatoires notamment, à l'opposé des eicosanoïdes dérivés de l'EPA (série 3). Ce déséquilibre favorise donc l'apparition de nombreuses pathologies (maladies cardio-vasculaires, auto-immunes, inflammatoires, neuropathologies etc.) (Guesnet, 2005).

D'autre part, 2 classes d'endocannabinoïdes ont récemment émergé comme importants régulateurs de la prise alimentaire, avec des mécanismes d'action très variés. Il s'agit d'esters d'AGPI avec du glycérol tels que le 2-AG et le 2-OG (2-oleoylglycerol), et d'amides d'AGPI avec de l'éthanolamine, tels que l'anandamide et l'oleoylethanolamide (OEA) (DiPatrizio and Piomelli, 2015).

Enfin, un autre type de lipide est précurseur de molécules bioactives : le cholestérol. Il permet notamment la synthèse de cholécalférol (vitamine D3), des hormones stéroïdes (cortisol, cortisone, aldostérone, progestérone, œstrogènes et testostérone), et des sels biliaires.

d. Rôle de régulateur des activités cellulaires

Les AG en eux-mêmes sont capables d'interagir avec les cellules, en tant que modulateurs, messagers primaires ou secondaires. Par exemple, les enzymes de la voie de l'AMPc ou celles impliquant la protéine kinase C (PKC) sont régulées par les AG (Sumida et al., 1993). On peut citer, par exemple, l'activation de phospholipases suite à la liaison d'un agoniste sur un récepteur membranaire qui peut entraîner la libération d'AA de la membrane, qui va agir en tant que messager secondaire dans la transduction du signal en activant les PKC (Naor, 1991). Les AGLC sont également capables de contrôler l'ouverture de canaux ioniques potassiques ou calciques (Sumida et al., 1993). Enfin, il existe de nombreux récepteurs membranaires aux acides gras (notamment des GPCR ou encore le CD36), qui induisent une signalisation cellulaire pour des fonctions très variées (métabolisme énergétique, sécrétion d'hormones, métabolisme des lipides, immunité et inflammation, etc.) dans de nombreux tissus de l'organisme.

e. Rôle de régulation de l'expression génique

Les AG sont des régulateurs de l'expression de gènes intervenant dans le métabolisme des nutriments, ainsi que dans la croissance et la différenciation cellulaire. Ils interviennent soit directement en liant les facteurs de transcription (par exemple les PPAR – *peroxysome proliferator activated receptors* et les LXRs – *liver X receptors*) soit indirectement en modulant le contenu nucléaire des facteurs de transcription (par exemple SREBP-1c pour *sterol regulatory element binding protein-1c*) (Guesnet, 2005; Jump, 2004). Le foie et le tissu adipeux sont particulièrement concernés par ces processus. Par exemple, les PPAR vont permettre de réguler des gènes impliqués de façon générale dans le métabolisme des lipides et notamment la β -oxydation. On peut citer également l'inactivation de SREBP-1c par les AGPI qui conduit à l'inhibition de la synthèse d'enzymes contrôlant la lipogenèse au niveau hépatique (Guesnet, 2005). Ces processus de régulation sont à l'origine des propriétés hypolipémiantes de certains AGPI.

Les lipides jouent donc de nombreux rôles au niveau cellulaire. Ils ont aussi des propriétés physiologiques qui les rendent attractifs et qui entraînent souvent leur surconsommation, pouvant mener à l'obésité. Pour que l'organisme puisse ajuster les apports en lipides, ceux-ci doivent pouvoir être détectés : on parle également de *sensing* des lipides.

III.2. *Sensing* des lipides et effets sur le comportement alimentaire

Dès la mise en bouche, les aliments vont induire une cascade de réponses physiologiques qui ont pour objectif de réguler le comportement alimentaire. Les lipides sont détectés à plusieurs niveaux : oral, intestinal et même central. Les conséquences de ce *sensing* et de la cascade de signalisation qui en découle sont d'ordre « énergétique » via la modulation du fonctionnement hypothalamique, et d'ordre « émotionnel » via l'activation du système cortico-limbique impliqué dans les circuits de récompense/renforcement.

III.2.1. *Effets satiétogènes des lipides*

a. *Sensing intestinal des lipides et effets satiétogènes*

Les lipides sont souvent considérés comme étant peu satiétogènes (Brennan et al., 2012; Hariri and Thibault, 2010). Cependant, une charge intestinale de lipides supprime la prise alimentaire chez les rongeurs et chez l'Homme (Ritter, 2004; Vozzo et al., 2003). En fait, leur effet satiétogène semble dépendre de plusieurs paramètres tels que l'association avec d'autres nutriments, la longueur de chaîne, l'oxydation etc. (Samra, 2010).

Au niveau intestinal, un système de *sensing* des lipides permet de stimuler la sécrétion de peptides satiétogènes par les cellules entéroendocrines. Les principales hormones sécrétées en réponse aux lipides sont la CCK (cellules I), le GIP (*Gastric inhibitory polypeptide*, cellules K), le PYY, le GLP-1 (cellules L) et la sécrétine (cellules S). Leurs effets sur les fonctions digestives et métaboliques sont variés en fonction du peptide. On peut citer l'inhibition de la vidange gastrique, la contraction de la vésicule biliaire, l'inhibition de la motilité du côlon, l'inhibition des sécrétions acides de l'estomac, la stimulation de la sécrétion d'insuline, etc. Tous ont pour finalité l'arrêt de la prise alimentaire. Par exemple, l'injection périphérique de CCK chez le rongeur conduit à une diminution de la taille du repas (Raybould, 2007). Cette régulation s'effectue par une action paracrine sur les afférences vagales qui expriment le récepteur à la CCK (CCK-R), tout comme ceux du GLP-1 (GLP-1R) et du PYY. De manière intéressante, une étude récente a montré que les AG peuvent activer le nerf vague de manière directe *via* l'expression d'un lipido-récepteur, le GPR40, sur les neurones de ce nerf (Darling et al., 2014). A l'origine de la sécrétion d'hormones satiétogènes, plusieurs récepteurs se partagent le *sensing* lipidique. Au niveau proximal on trouve le CD36, qui contribue à la sécrétion de CCK et de sécrétine (Sundaresan et al., 2013). GPR120 et GPR40 sont situés à un niveau plus distal, et stimulent quant à eux la sécrétion de CCK par les cellules I (Liou et al., 2011; Tanaka et al., 2008a) et de GLP-1 par les cellules L (Edfalk et al., 2008; Hirasawa et al., 2005). La FATP4 (*fatty acid transport protein 4*) semble également jouer un rôle dans la sécrétion de GLP-1 induite par l'OLA (Poreba et al., 2012). Le GIP est quant à lui sécrété par l'intermédiaire de GPR120 dans les cellules K (Iwasaki et al., 2015).

D'autre part, l'OEA, de la famille des endocannabinoïdes, est elle aussi synthétisée par l'intestin grêle en réponse à l'arrivée de lipides. La production d'OEA utilise l'OLA, lié par CD36, comme substrat (Schwartz et al., 2008). L'OEA active ensuite le PPAR α . Il a été montré que l'injection systémique d'OEA chez des rats entraîne une diminution de la prise alimentaire (Serrano et al., 2011). En revanche, chez des souris CD36 KO ou PPAR α KO, l'infusion de lipides n'entraîne pas d'effet de satiété (Duca and Yue, 2014; Schwartz et al., 2008). En plus de PPAR α , l'OEA active le GPR119 (*G-protein coupled receptor 119*) qui stimule la sécrétion de GLP-1 par les cellules entéroendocrines (Hansen et al., 2012). Le 2-OG, autre membre de la famille des endocannabinoïdes, semble avoir une action similaire à l'OEA, mais avec un effet moins marqué (DiPatrizio and Piomelli, 2015).

L'Apolipoprotéine A-IV (ApoA-IV), synthétisée par les cellules intestinales pendant l'assemblage des lipides dans les chylomicrons, donc après absorption des lipides, réduit également la prise alimentaire (Strader and Woods, 2005). L'action de l'ApoA-IV au niveau du NTS est dépendante de la CCK et s'effectue *via* le nerf vague (Lo et al., 2012). Il semblerait que la synthèse d'ApoA-IV soit régulée positivement par la leptine, et négativement par l'insuline, et serait donc impliquée également dans la régulation long terme de la prise alimentaire (Tso and Liu, 2004).

b. Sensing hypothalamique des lipides et effets anorexigènes

Les lipides peuvent agir directement au niveau central, particulièrement au niveau hypothalamique. Les mécanismes permettant aux AG de passer la barrière hémato-encéphalique ne sont cependant pas complètement élucidés (Duca and Yue, 2014). Le *sensing* des lipides (tout comme celui du glucose) au niveau du cerveau permet de réguler l'homéostasie du glucose, la production de glucose hépatique et la prise alimentaire (Duca and Yue, 2014). Par exemple, l'injection centrale d'OLA inhibe la prise alimentaire en régulant l'activité de neurones dans certaines zones de l'hypothalamus, ce qui est associé à une réduction du NPY hypothalamique chez le rat (Obici et al., 2002). CD36 semble jouer un rôle majeur dans le *sensing* des lipides par les neurones du VMH (Le Foll et al., 2013; Moulle et al., 2013) ; sa déplétion grâce à des shRNA (*small hairpin RNA*, ARN interférants) prévient la diminution de la prise alimentaire induite par une infusion d'Intralipide chez le rat (Moulle et al., 2013).

III.2.2. Attraction pour les lipides et effets gratifiants

Des souris à qui l'on propose une supplémentation optionnelle d'huile de maïs surconsomment ces lipides et deviennent obèses (Takeda et al., 2001a). Ce comportement pose la question de l'effet « gratifiant » des lipides. Les tests de double-choix consistent à proposer deux options en même temps à l'animal, afin d'observer sa préférence. Lors d'un test de double-choix de 30 min, les souris consomment de façon similaire de l'huile de maïs ou des esters d'acide gras et de sorbitol (qui sont des substituts lipidiques, palatables mais peu énergétiques). En revanche, sur des double-choix de plus de 30 min, qui intègrent les effets post-ingestifs, les souris délaissent ces lipides non nutritifs (Suzuki et al., 2003). Le

choix de consommer un aliment plutôt qu'un autre dépend donc à la fois de ses effets métaboliques et de ses qualités hédoniques. Les lipides entraînent des effets de renforcement/récompense, par l'intermédiaire des composantes *liking*, *learning*, *wanting*, ce qui peut aboutir à leur surconsommation.

a. Effets d'apprentissage, de récompense et de renforcement des lipides

Les effets de renforcement des lipides peuvent aller jusqu'à entraîner un comportement de type addictif chez la souris. En effet, les modèles comportementaux associés à une auto-administration intragastrique de lipides chez la souris montrent de grandes similarités avec les modèles comportementaux associés avec l'auto-administration de drogues psychostimulantes (cocaïne, morphine...) (Tellez et al., 2013). Par exemple, une diminution de la concentration en lipides résulte en un comportement de compensation qui a pour but de maintenir constante la prise calorique. Les mécanismes impliqués au niveau cérébral se rapprochent également de ceux observés lors de la prise de drogues en intraveineuse.

Les travaux de l'équipe d'Anthony Sclafani aux Etats-Unis montrent que le *sensing* des lipides au niveau intestinal permet de conditionner les préférences alimentaires. Le principe des expériences de conditionnement post-oral à des « saveurs » repose sur un apprentissage Pavlovien : une saveur (stimulus conditionné : CS+) est associée à un effet post-ingestif (stimulus inconditionné : US) (Sclafani and Ackroff, 2012). Ces expériences reposent donc sur l'apprentissage, ou *learning* : des rats acquièrent une préférence pour une saveur qui précède de 10 min l'ingestion d'une émulsion d'huile de maïs. Lorsque la saveur est suivie de l'ingestion d'huile minérale, la préférence n'est pas observée (Elizalde and Sclafani, 1990). Les résultats sont comparables lorsque le CS+ est couplé à une infusion d'huile de maïs directement dans l'estomac (Lucas and Sclafani, 1999). De plus, lors de tests de double-choix sur 10 min, les rats développent une préférence (il s'agit ici de la composante *liking*) pour une saveur mélangée à une émulsion d'huile de maïs, mais également – dans une moindre mesure – pour une saveur mélangée à de l'huile minérale (Elizalde and Sclafani, 1990). Ces résultats suggèrent qu'à la fois les propriétés orosensorielles et les effets nutritifs post-ingestifs des lipides renforcent la préférence pour des saveurs. Notons que les signaux de renforcement des lipides sont produits rapidement après l'ingestion (quelques minutes), surtout si les souris ont déjà été exposées aux effets des lipides auparavant (Zukerman et al., 2011).

Ce lien entre les propriétés orosensorielles et les effets post-ingestifs sur les préférences est montré également par les tests de préférence de place (CPP : *conditioned place preference*). La CPP est une méthode comportementale qui a été développée pour l'étude des effets gratifiants des drogues (morphine, héroïne etc.). Même s'il existe de nombreux types d'appareils, le plus basique associe un environnement particulier avec le traitement par la drogue, et un autre environnement avec le traitement par le véhicule (contrôle). Les deux environnements peuvent être par exemple une cage lumineuse, qui est stressante pour la souris, et une cage sombre, rassurante. Ainsi, si la souris passe plus de temps dans l'environnement hostile, associé à la drogue, l'effet de renforcement de la drogue est d'autant plus

marqué. Dans le cas des lipides, une préférence de place a été montrée dans le cas d'une consommation volontaire d'huile de maïs ou d'Intralipide dans un environnement « hostile » (Imaizumi et al., 2000; Sakamoto et al., 2015), ce qui montre que la souris est déterminée à consommer des lipides et à obtenir la récompense hédonique associée. Notons que pour l'établissement d'une préférence de place, il faut une stimulation orale et post-ingestive. En effet, les expériences de CPP ont montré que la préférence de place n'est pas acquise dans le cas de la consommation d'esters d'acides gras et de sorbitol ou dans le cas de l'administration de lipides directement dans l'estomac. En revanche, elle a lieu dans le cas de l'association des deux (Imaizumi et al., 2000; Suzuki et al., 2003).

Les approches opérantes permettent de mesurer encore plus efficacement les effets de « renforcement » et illustrent parfaitement le paramètre *wanting*. Plus particulièrement, les programmes de renforcement progressif permettent de mesurer la motivation à obtenir la récompense (habituellement une drogue, ou dans notre cas des lipides). Pour cela, la souris doit effectuer un nombre croissant de tâches (par exemple, appuyer sur un levier). Le point de rupture (*breakpoint*) est défini soit par le nombre de récompenses obtenues, soit par le nombre maximal de tâches effectuées pour obtenir la récompense. Ainsi, une diminution de la motivation est détectée par une diminution du point de rupture. Il a été montré que l'huile de maïs ainsi que l'Intralipide sont capables d'induire un renforcement d'une manière concentration-dépendante (Sakamoto et al., 2015; Yoneda et al., 2007b).

b. Mécanismes impliqués dans les effets gratifiants des lipides

Deux systèmes semblent être majoritairement impliqués dans les effets de récompense des lipides : le système dopaminergique au niveau du striatum (aire cérébrale située sous le cortex, comprenant une partie dorsale et une partie ventrale) et le système opioïdérique dans l'hypothalamus. Les niveaux de dopamine sont augmentés dans le NAc (striatum ventral) chez des rats qui consomment de l'huile de maïs directement éliminée de l'estomac par une fistule gastrique afin d'exclure les influences post-ingestives (Liang et al., 2006). De même, l'ingestion de faibles concentrations de LA (qui contiennent peu de calories) sont capables d'augmenter les niveaux de dopamine dans le NAc de la même façon que de l'huile de maïs pure (Adachi et al., 2013). Les récepteurs D(1) et surtout D(2) du système dopaminergique semblent impliqués dans les effets de renforcement de l'huile de maïs (Imaizumi et al., 2000; Yoneda et al., 2007b). Une étude plus récente (Tellez et al., 2013) montre une relation entre les effets post-ingestifs (et non pas oraux) des lipides et les niveaux de dopamine, cette fois-ci dans la partie dorsale du striatum. Il semblerait cependant que les 2 structures (ventrale et dorsale) évoquées coopèrent dans les circuits de récompense.

Chez des rats conditionnés à consommer quotidiennement une émulsion d'huile de maïs à heure fixe, on constate dans l'hypothalamus une augmentation anticipatoire de l'expression de POMC, un précurseur de la β -endorphine, ainsi que de l'orexine (qui stimule la prise alimentaire) à l'heure où les rats consomment habituellement l'huile de maïs (Mizushige et al., 2006). D'autres peptides opiacés

(β -encéphaline et dynorphine), connus pour stimuler la prise alimentaire, sont augmentés au niveau du PVN de l'hypothalamus par un régime hyperlipidique (Chang et al., 2007). Cet effet des lipides implique les taux circulants de TG, et constitue une boucle de régulation positive : la consommation de lipides entraîne la production de peptides qui eux-mêmes stimulent la consommation de lipides.

Les récepteurs aux opioïdes semblent jouer un rôle prépondérant dans les processus hédoniques associés à la consommation de lipides. Par exemple, l'injection d'agonistes du récepteur μ dans le NAC augmente la consommation d'aliments gras en les rendant plus palatables (Katsuura et al., 2011). De même, l'administration de naltrexone, un antagoniste non-sélectif des récepteurs aux opioïdes, réduit la consommation d'Intralipide (Sakamoto et al., 2015). Il est à noter que les effets de renforcement des lipides pourraient être divisés en deux phases : l'acquisition et la maintenance. Il semblerait que le système opioïde soit important pour l'acquisition des aspects de renforcement des lipides chez les souris « naïves », mais pas chez des souris habituées à l'ingestion répétée de lipides (Sakamoto et al., 2015).

En résumé, les senseurs lipidiques de l'intestin sont impliqués dans la production de signaux de régulation négative qui permettent de terminer la prise alimentaire, mais également de signaux de régulation positive qui stimulent l'ingestion et le conditionnement aux saveurs. Ce système de détection intestinale des lipides agit de concert avec un système plus précoce au niveau orosensoriel, qui permet la reconnaissance rapide du stimulus.

III.3. La détection des lipides au niveau orosensoriel

Le paradigme du repas fictif (*sham-feeding*) dans lequel les rats sont équipés d'une fistule gastrique qui élimine directement les solutions ingérées afin d'exclure les effets post-ingestifs, montre que la stimulation orosensorielle suffit à augmenter la consommation de lipides (Greenberg and Smith, 1996). De même, des tests comportementaux effectués sur des temps courts (quelques secondes à quelques minutes), permettant de limiter là-aussi les effets post-ingestifs, montrent que les rongeurs sont attirés par les solutions lipidiques (Tsuruta et al., 1999; Yoneda et al., 2009; Yoneda et al., 2007a). La dimension orosensorielle apparaît donc importante dans les mécanismes de détection des lipides. Trois composantes des aliments permettent leur détection et reconnaissance au niveau oral : la texture, l'odeur et le goût.

III.3.1. Texture

Le paramètre textural des lipides est très important pour leur perception et leur palatabilité. Par exemple, l'aspect « onctueux » d'un yaourt, qui est un paramètre essentiel à son acceptation par le consommateur, est apporté par les lipides. D'ailleurs, l'estimation du contenu en graisses de produits laitiers dépend en grande partie de leur texture (Mela, 1988). C'est le nerf trijumeau qui permet de

détecter les propriétés texturales des aliments au niveau de la langue. Chez le macaque, des enregistrements de neurones du cortex orbito-frontal, qui sont activés lors de la consommation de lipides, montrent que ces neurones sont stimulés également par des substances de texture similaire mais de composition différente, comme la paraffine par exemple (non-nutritive) (Rolls et al., 1999). Cependant, chez l'Homme comme chez le rongeur, la texture n'est pas la seule composante qui permet de détecter les lipides. En effet, les souris et les rats montrent une préférence significative pour des solutions contenant 1% d'huile végétale ou d'AGLC, suspendus dans une solution de 0.3% de gomme de xanthane (XG) qui permet de diminuer les influences texturales, en comparaison d'une solution contrôle composée de XG uniquement (Takeda et al., 2000; Tsuruta et al., 1999). De même, une aversion conditionnée pour un mélange saccharose/huile de maïs ne se généralise pas à un mélange saccharose/paraffine, indiquant que la texture de l'huile ne joue pas un rôle majeur dans sa perception (Smith et al., 2000).

III.3.2. Odeur

Les molécules odorantes sont perçues par le bulbe olfactif et l'information transite via le nerf crânien I. La détection peut se faire par voie ortho-nasale ou voie directe (odeur) ou par voie rétro-nasale ou voie indirecte, lorsque l'aliment est en bouche (arôme). Le gras sert souvent de révélateur d'arômes dans l'industrie alimentaire. Il est à noter que lorsque les lipides sont oxydés, ils prennent une odeur désagréable de « rance ». La part de la composante olfactive chez les souris a été étudiée, notamment par section bilatérale du nerf olfactif : dans ce cas, les souris perdent la préférence pour un régime riche en lipides comparé à un régime contrôle (Kinney and Antill, 1996). Les souris rendues anosmiques (par instillation nasale de sulfate de zinc) montrent une perte de préférence pour de faibles concentrations d'huile de maïs, mais maintiennent la préférence pour des concentrations plus élevées (Takeda et al., 2001b). Chez l'Homme, l'utilisation de pince-nez dans les tests sensoriels n'empêche pas la détection des AG (Chale-Rush et al., 2007). Ainsi, la composante olfactive joue un rôle dans la détection orale des lipides, mais n'est pas strictement nécessaire.

En conclusion, la détection des lipides s'effectue à 2 niveaux : orosensoriel et post-ingestif. Ce dernier intègre les paramètres de texture et d'odeur des lipides, qui contribuent à leur palatabilité. Mais nous venons de voir que ces paramètres ne sont pas strictement nécessaires à la détection des lipides. Il reste une composante, la gustation, que nous allons aborder en détail dans la suite de cet état de connaissances.

Partie IV : Existe-t-il une détection gustative des lipides ?

En plus des 5 saveurs primaires bien connues que sont le sucré, le salé, l'acide, l'amer et l'umami, de plus en plus de preuves font état d'une 6^{ème} saveur : celle des lipides, autrement dit le « goût du gras », à la fois chez le rongeur et chez l'Homme (Mattes, 2011; Passilly-Degrace et al., 2013). Une publication très récente a d'ailleurs proposé un néologisme pour qualifier cette saveur : l'« oléogustus » (en latin *oleo* : huileux, gras et *gustus* : goût) (Running et al., 2015). Cependant, l'existence de cette 6^{ème} saveur fait débat. En effet, même s'il ne fait aucun doute que les lipides sont détectés *via* le système gustatif, il est difficile de les caractériser de saveur primaire de manière définitive (Besnard et al., 2016 (in press); Heinze et al., 2015), en partie parce qu'il n'existe pas de définition précise d'une saveur primaire. Richard Mattes (Université de Purdue, Etats-Unis) a cependant proposé différents critères afin de caractériser une modalité gustative primaire chez l'Homme (Mattes, 2011) :

La saveur :

- 1- Confère un avantage évolutif
- 2- Possède une classe définie de stimuli effectifs
- 3- Est perceptible et décrite comme une sensation unique
- 4- Induit des signaux périphériques qui convergent *via* les nerfs gustatifs et sont décodés par les centres gustatifs
- 5- Provoque une réponse physiologique et/ou comportementale
- 6- Possède un ou plusieurs récepteurs à l'origine d'une transduction intracellulaire.

Un dernier critère peut être ajouté :

- 7- A un système de détection qui est régulé (Chevrot, 2013).

Le fait d'être capable de détecter les lipides représente un avantage certain en période de disette alimentaire, validant le 1^{er} critère. Sans prétendre répondre à la question : « le gras représente-il une saveur primaire ? », nous allons voir dans cette partie comment et dans quelle mesure les lipides répondent aux autres critères, en les extrapolant aux études effectuées chez les rongeurs et en présentant des exemples de données observées chez l'Homme.

IV.1. Détection des lipides au niveau oral

IV.1.1. Types de lipides détectés

Il est admis que les molécules responsables de la stimulation gustative pour le gras sont les AGLC. Des expériences de double-choix court terme (5 min) montrent en effet que des rats préfèrent des solutions d'AGLC à des solutions de TG ou même d'AGMC (Fukuwatari et al., 2003; Tsuruta et al., 1999).

Cette sélectivité est étroite puisque les AGLC sont préférés à leurs dérivés méthylés (Tsuruta et al., 1999). Les expériences d'aversion gustative conditionnée confirment la capacité des rongeurs à détecter les AGLC. Dans ces expériences, l'animal est rendu aversif à une saveur particulière grâce à l'association de sa consommation avec un malaise gastrique (provoqué par une injection de chlorure de lithium). Les souris (Gaillard et al., 2008) et les rats (McCormack et al., 2006) peuvent être rendus aversifs aux AGLC avec une sensibilité de l'ordre du micromolaire (McCormack et al., 2006). L'aversion est commune à plusieurs AGLC, mais ne se généralise pas à d'autres saveurs telles que le salé (McCormack et al., 2006) ou le sucré (Gaillard et al., 2008). De plus, la stimulation orale par des AGLC chez les rongeurs entraîne la phase céphalique de sécrétions pancréatiques, contrairement aux AGMC ou aux AG méthylés (Hiraoka et al., 2003; Laugerette et al., 2005).

Chez l'Homme, la méthode des « 3 alternatives à choix forcé » (3-AFC : *3-alternative forced choice*) est souvent utilisée pour déterminer des seuils de détection de molécules sapides (voir encart n°2). Les AGLC (saturés et insaturés) sont détectés avec une sensibilité de l'ordre du sub-millimolaire (Chale-Rush et al., 2007; Chevrot et al., 2014; Kulkarni and Mattes, 2013; Stewart et al., 2010). Les autres types d'AG sont également détectés : AGCC et AGMC (Running et al., 2015; Running and Mattes, 2014). De manière surprenante, les AGCC semblent avoir un seuil de détection plus bas que les AGLC (Running and Mattes, 2014), ce qui peut être attribué au fait que les AGCC sont plus facilement solubles et peuvent donc mieux diffuser sur l'épithélium lingual (Besnard et al., 2016 (in press)), mais également au fait qu'ils sont plus acides (Running et al., 2015). Les sensations provoquées par les AG de chaînes de longueurs variées sont différentes. Pour les AGMC, il semblerait qu'il puisse y avoir une confusion avec l'umami, mais ce résultat est difficile à interpréter car la saveur umami elle-même est difficile à décrire précisément. Des résultats récents indiquent que les AGLC pourraient entraîner une réponse gustative unique (Running et al., 2015), qui peut être irritante si les concentrations sont élevées (Galindo et al., 2012b; Voigt et al., 2014). Notons que les AG sont aussi capables de stimuler les nerfs trijumeaux (Yu et al., 2012) ; des mécanismes complémentaires sont donc à prendre en compte dans la compréhension du phénomène de détection des lipides.

Les études effectuées chez le rongeur ne sont évidemment pas comparables à ce qui est réalisé chez l'Homme. Cependant, l'ensemble de ces données suggère que les AGLC constituent le stimulus effectif de la détection gustative des lipides. Pourtant, même si les aliments riches en lipides contiennent une petite proportion d'AGL (Laffargue et al., 2007), la grande majorité des lipides de notre alimentation est constituée de TG.

Encart n°2 : La méthode 3-AFC

Cette méthode a notamment été utilisée au Laboratoire, en collaboration avec l'INRA de Dijon, pour déterminer les seuils de détection du LA chez des sujets minces et obèses (Chevrot et al., 2014). Les participants reçoivent des groupes successifs de 3 échantillons : un échantillon contenant une concentration déterminée du stimulus et 2 contrôles. Pour chaque groupe, les participants doivent indiquer l'échantillon qui leur semble différent des 2 autres, après mise en bouche sans ingestion (procédure « *sip and spit* »). Les échantillons sont présentés dans un ordre de concentrations ascendant : si le participant échoue dans l'identification du stimulus, la concentration suivante lui est présentée. Lorsque le participant identifie correctement le stimulus, un 2^{ème} groupe de la même concentration lui est présenté. La procédure s'arrête lorsque le participant identifie correctement le stimulus à une concentration donnée 3 fois de suite. Cette concentration représente la valeur seuil de détection du participant. Pour éviter les influences visuelles, olfactives et texturales, l'ensemble de la procédure est réalisé sous lumière rouge, les participants portent des pince-nez, et les émulsions sont préparées de façon à ce qu'elles soient stables le temps de l'expérience et qu'il n'y ait pas de différence du point de vue de la taille des gouttelettes (figure 17).

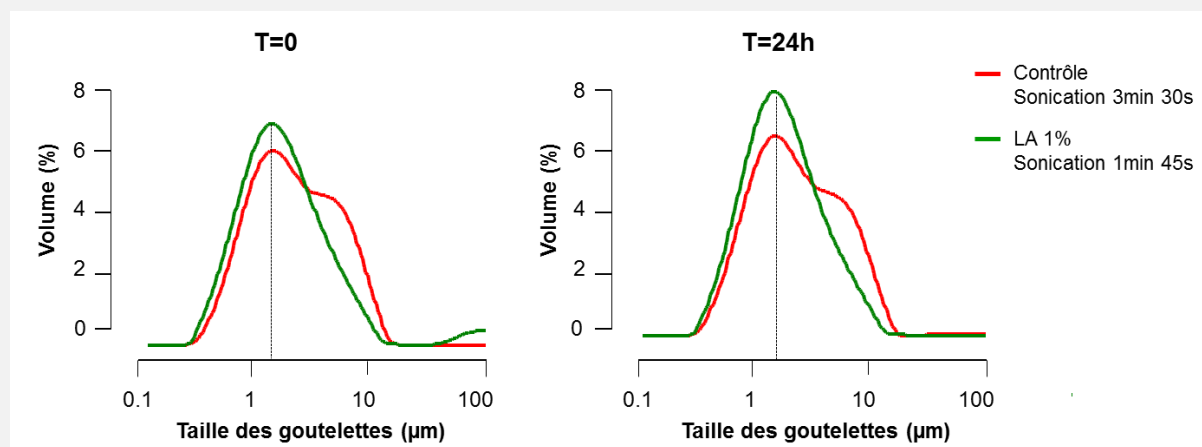


Figure 17 : Exemple d'analyses granulométriques d'émulsions utilisées pour l'étude des seuils de détection de l'acide linoléique chez l'Homme.

Adapté de (Chevrot et al., 2014).

Distribution granulométrique des gouttelettes dans la solution contrôle et l'émulsion de LA 1% à la fin de la sonication (T=0) et 24h plus tard (T=24h).

LA : acide linoléique.

IV.1.2. Existe-t-il une lipase salivaire ?

Un système permettant la libération des AG à partir des TG existe dans l'environnement salivaire chez le rongeur : il s'agit de la lipase linguale. L'inactivation de cette enzyme par l'orlistat entraîne une chute de la préférence des rats pour des solutions de TG ou d'huile de maïs, sans modifier celle pour

des solutions d'AGLC (Kawai and Fushiki, 2003). Chez le rongeur, la lipase linguale est sécrétée par les glandes de Von Ebner situées au niveau basal des sillons des papilles caliciformes et foliées (voir figure 6). Elle est capable d'hydrolyser 3% des TG en 1s, créant un environnement riche en AGLC à proximité des bourgeons du goût.

Chez l'Homme, l'activité lipolytique de la salive est moins efficace (Stewart et al., 2010). De plus, la lipase gastrique, équivalente humaine de la lipase linguale, ne semble pas exprimée par les glandes de Von Ebner (Voigt et al., 2014). Cependant, la présence d'orlistat entraîne une augmentation du seuil de détection des TG lors de tests de type 3-AFC, sans modifier celui de l'OLA (Pepino et al., 2012) ce qui indique qu'il existe bien une activité lipasique au sein de la cavité orale. En accord avec cette conclusion, il a été rapporté que la concentration d'AGL dans la salive de sujets mastiquant des aliments riches en lipides augmente considérablement (de 2 à 9 μ M pour la salive contrôle jusqu'à 20 à 60 μ M pour la salive stimulée par des aliments gras) (Kulkarni and Mattes, 2013). En fait, d'autres types de lipases semblent être exprimés au niveau des papilles gustatives chez l'Homme (Voigt et al., 2014) – sans oublier que de petites quantités d'AGL présentes naturellement dans l'alimentation peuvent aussi contribuer à la détection des lipides. De manière intéressante, les variations interindividuelles de seuils de détection des TG ainsi que l'intensité de la sensation de gras perçue sont corrélées avec l'activité lipolytique de la salive (Neyraud et al., 2012; Voigt et al., 2014).

La salive joue donc un rôle dans la détection gustative des AG. Lorsqu'elle est remplacée par de la salive artificielle, qui ne contient pas de protéines, le LA ne parvient pas à stimuler la corde du tympan chez le rat (Stratford and Contreras, 2009). Ce phénomène peut s'expliquer par un problème d'accessibilité des AG aux bourgeons du goût. En effet, l'environnement salivaire est aqueux, alors que les AG sont hydrophobes. Les protéines de la salive pourraient donc permettre l'émulsification des AG (Tucker et al., 2014). Par exemple, la protéine de la glande de Von Ebner (VEGP), également appelée lipocalin-1, est produite chez le rongeur et chez l'Homme (Kock et al., 1994; Tucker et al., 2014). Elle est capable de lier les AGLC avec une affinité faible, mais sa fonction exacte n'est pas élucidée. D'un côté, sa liaison avec les AG pourrait permettre d'augmenter la solubilité des AG et donc leur accessibilité à la cellule gustative, mais d'un autre côté, cette liaison pourrait au contraire empêcher leur interaction avec les cellules (Tucker et al., 2014).

Une autre protéine importante est sécrétée par les glandes de Von Ebner chez le rongeur et chez l'Homme : l'anhydrase carbonique VI (CA-VI) (Leinonen et al., 2001). Elle permettrait d'améliorer la fonction des canaux potassiques, impliqués dans la dépolarisation de la cellule gustative, en créant un environnement neutre à proximité des bourgeons du goût. En effet, elle pourrait catalyser l'élimination de l'excès de protons, provoqué par la dépolarisation cellulaire, ce qui aiderait les canaux potassiques à retrouver leur état basal (Leinonen et al., 2001). De plus, ce pH pourrait permettre l'ionisation des AGLC (Kanicky and Shah, 2002), les maintenant dans l'environnement extracellulaire. En effet, contrairement à la forme protonée qui permet par exemple une diffusion passive dans l'intestin (Niot et al., 2009), la forme

ionisée peut difficilement passer la barrière de la membrane cellulaire. Cette localisation extracellulaire pourrait faciliter l'interaction avec des récepteurs situés au niveau apical des cellules des bourgeons du goût (Besnard et al., 2016 (in press)).

Ainsi, les lipides possèdent une classe de stimuli gustatifs effectifs, les AGLC, qui sont décrits comme une sensation unique, au même titre que le sucré, le salé, l'amer, l'acide et l'umami. Les critères (2) et (3) évoqués par Richard Mattes sont donc remplis.

IV.2. Transmission du signal lipidique jusqu'au cerveau

Des travaux du Laboratoire ont permis de montrer que la section bilatérale des nerfs gustatifs VII et IX entraîne une perte de préférence pour une solution de LA ainsi qu'une perte de l'aversion gustative conditionnée (Gaillard et al., 2008). D'autres études ont également réalisé ce type d'expérience, avec une section bilatérale soit du nerf VII, soit du nerf IX uniquement, entraînant une diminution partielle de la réponse comportementale vis-à-vis des lipides (Pittman et al., 2007; Treesukosol et al., 2010). De plus, des expériences immunohistochimiques utilisant la protéine Fos comme marqueur de l'activité neuronale montrent qu'un dépôt lingual d'AGLC active la partie rostrale du NTS connue pour recevoir les afférences gustatives. Cette activation neuronale n'est *à priori* pas due à l'activation des nerfs trijumeaux car l'activation du NTS est quasiment inexistante lors d'un dépôt d'une solution contrôle texturée de XG (Gaillard et al., 2008). Cependant, l'activation des terminaisons des nerfs trijumeaux trouvés dans l'épithélium non-gustatif à proximité des bourgeons du goût ne doit pour autant pas être négligée dans l'intégration des stimuli induits par les lipides. Chez l'Homme, la stimulation orale par des lipides entraîne l'activation de différentes zones du cortex et de l'hypothalamus. Ces régions peuvent être activées indépendamment de l'effet textural des lipides (De Araujo and Rolls, 2004).

En bref, ces observations valident le 4^{ème} critère caractéristique d'un goût primaire : ceux-ci sont capables d'envoyer une information au cerveau *via* les voies nerveuses gustatives.

IV.3. Réponse physiologique induite par la stimulation orale avec des lipides

Chez des rats et des souris dont l'œsophage a été ligaturé ou stomisé pour empêcher toute ingestion, la stimulation orale par des AGLC provoque une augmentation des sécrétions pancréato-biliaires. Ce phénomène est la conséquence d'une boucle céphalique (cavité buccale – NTS – retour vagal vers le tractus digestif, figure 16), responsable d'une anticipation digestive (Hiraoka et al., 2003; Laugerette et al., 2005). De ce fait, lorsque la stimulation orale précède une infusion intra-gastrique,

l'élévation du taux plasmatique de TG est prolongée par rapport à l'infusion intra-gastrique seule (Ramirez, 1985).

Concernant l'anticipation digestive chez l'Homme, le rôle joué par les lipides est difficile à identifier car les études effectuées utilisent souvent des aliments riches en lipides, mais pas des lipides seuls. Par exemple, un repas fictif (non ingéré) riche en lipides suivi d'une charge en lipides (ingérés) entraîne une augmentation des taux plasmatiques pré-prandiaux de ghréline. Ce phénomène est suivi par une diminution plus rapide des taux de ghréline que lorsque la charge en lipides n'est pas précédée d'une stimulation orale (Heath et al., 2004). Ces données suggèrent que la détection orale des lipides pourrait être à l'origine non seulement d'une anticipation digestive, mais également d'un contrôle précoce de la prise alimentaire *via* la diminution de la ghréline. D'autre part, de nombreuses études utilisant également des repas fictifs font état d'une augmentation de la triglycéridémie postprandiale suite à une stimulation orale par des lipides (Mattes, 2009a, b). Une étude récente du Laboratoire a permis de mettre en évidence une augmentation de la triglycéridémie chez des sujets de poids normal après une stimulation orale (« *sip and spit* ») par des AGLC (figure 18). Cette augmentation provient de la sécrétion de VLDL par le foie (Chevrot et al., 2014), et pourrait contribuer à la régulation de l'homéostasie énergétique grâce au *sensing* hypothalamique des AG (Mouille et al., 2014).

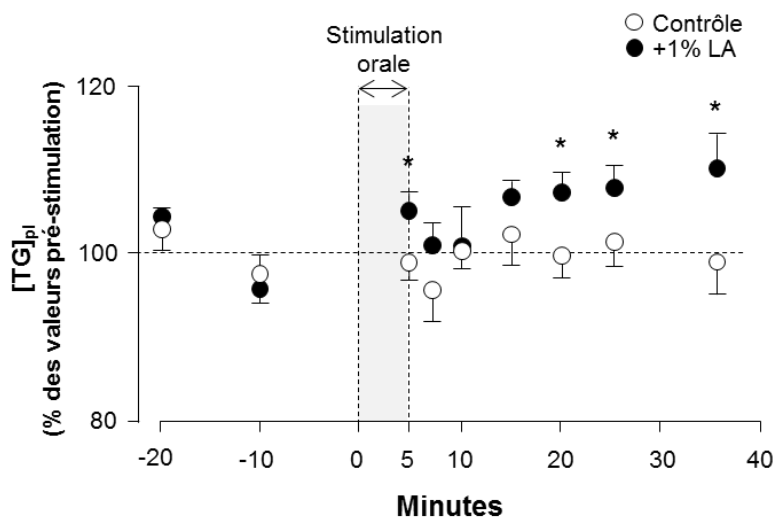


Figure 18 : Effets moyens de la stimulation orale par du LA sur la triglycéridémie chez des sujets sains.

Adapté de (Chevrot et al., 2014).

Les sujets étaient à jeun depuis la veille. Ils ont été soumis à une stimulation orale pendant 5 min (sans ingestion) avec soit une solution contrôle soit une émulsion de LA 1%. * : $P < 0.05$.

LA : acide linoléique ; $[TG]_{pl}$: concentration plasmatique en triglycérides.

Un critère supplémentaire est donc validé, celui de la réponse physiologique induite par la détection orale des lipides (n°5). La détection des AGLC demande donc, comme pour les autres saveurs, la présence de récepteurs spécifiques, capables d'induire une signalisation dans les cellules gustatives.

IV.4. Récepteurs candidats à la détection orale des lipides

Différents types de récepteurs ont été proposés comme candidats pour la détection gustative des lipides : des récepteurs ionotropiques (les canaux DRK : *delayed-rectifying potassium channels*), un récepteur *scavenger* (CD36) et des GPCR (GPR40 et GPR120).

IV.4.1. Canaux DRK

Les canaux DRK s'ouvrent suite à une dépolarisation cellulaire, induite par un ligand, par exemple un stimulus acide ou amer (Cummings and Kinnamon, 1992), ce qui permet la repolarisation de la cellule par efflux d'ions K^+ . Dans les papilles fongiformes de rats, l'équipe de Timothy Gilbertson aux Etats-Unis a montré, grâce à des mesures électrophysiologiques par *patch-clamp*, que les AGPI sont capables d'inhiber spécifiquement les canaux DRK, induisant une dépolarisation transitoire des cellules gustatives en raison de l'accumulation intracellulaire d'ions K^+ (Gilbertson et al., 1997). Les mécanismes impliqués ne sont pas connus. Il est à noter que la dépolarisation de la cellule gustative est nécessaire à la sécrétion de neurotransmetteurs.

Les canaux DRK n'ont pas été étudiés chez l'Homme, mais sont certainement présents étant donné leurs fonctions de maintenance des gradients électriques de la cellule (Tucker et al., 2014). Chez le rat, différentes isoformes existent (KCNA, KCNB, KCNC). KCNA est très sensible aux AGPI, et le KCNA5 (ou Kv1.5) est le membre le plus représenté dans les papilles fongiformes (Liu et al., 2005). De manière intéressante, l'expression des canaux DRK est différente chez les rats résistants ou sensibles à l'obésité, ce qui pourrait influencer la sensibilité aux lipides et le comportement alimentaire (Gilbertson et al., 2005). Cependant, même si les AGPI sont capables d'inhiber les canaux DRK, un rôle de récepteur spécifique capable d'induire une réponse physiologique dans la détection gustative des lipides est peu probable (Gilbertson et al., 2010), et ce pour plusieurs raisons. Tout d'abord, d'autres saveurs sont capables de diminuer l'efflux d'ions K^+ (Cummings and Kinnamon, 1992). De plus, l'expression des canaux DRK n'est pas spécifique d'un type cellulaire (I, II ou III). En effet, les 3 types de cellules gustatives expriment des canaux K^+ (Medler et al., 2003). Enfin, à l'état basal, seuls 5% des canaux DRK sont ouverts (Liu et al., 2005), ce qui n'est pas suffisant pour envisager une dépolarisation cellulaire par les AGPI (Gilbertson et al., 2010).

En revanche, il a été montré que l'ajout de faibles quantités de LA (5 et 20 μ M) permet d'augmenter la préférence pour une solution de saccharine à une concentration située juste sous le seuil de détection (Gilbertson et al., 2005). De même, l'ajout d'AGPI ou d'AGMI (à des concentrations qui ne sont pas détectables oralement) entraîne une modification de la réponse comportementale des rongeurs pour différentes molécules sapides (Martin et al., 2012; Pittman et al., 2006). Ainsi, il est possible d'imaginer que les AGPI/AGMI se comporteraient comme des « modulateurs » de goût. Leur action dépolarisante médiée par les canaux DRK s'additionnerait à celle induite par la signalisation provoquée

par la liaison d'une autre molécule sapide avec son récepteur spécifique (figure 19). Il n'existe à ce jour pas de modèle de souris invalidées pour les canaux DRK, il est donc difficile de conclure sur un éventuel impact des canaux DRK sur la physiologie gustative et le comportement alimentaire.

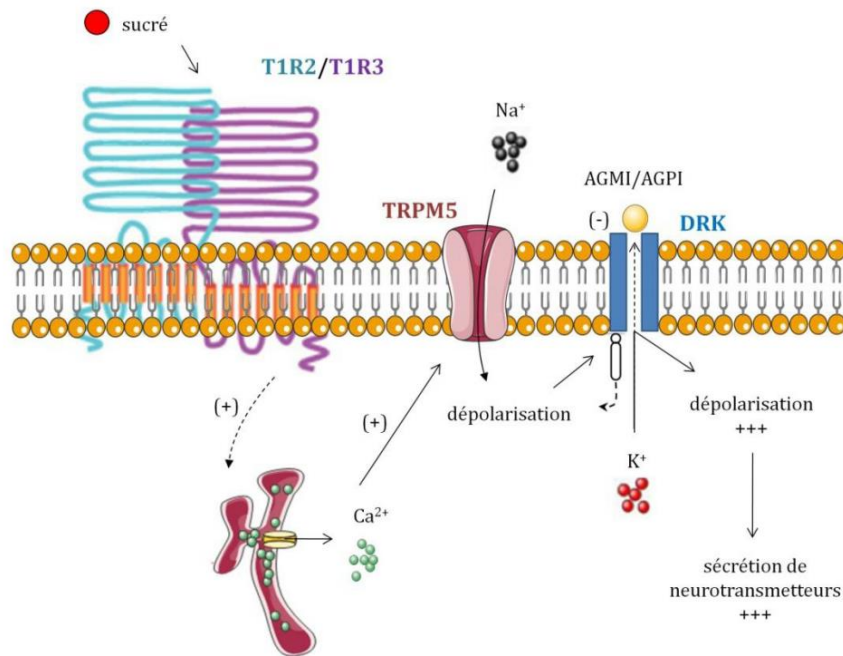


Figure 19 : Rôle possible de modulateurs des saveurs des canaux DRK dans les cellules gustatives : exemple du sucré.
(Martin, 2011)

AGMI : acides gras monoinsaturés ; AGPI : acides gras polyinsaturés ; DRK : *delayed-rectifying potassium channels* ; T1R : *taste receptor type 1* ; TRPM5 : *melastatin-related transient receptor potential cation channel type 5*.

IV.4.2. CD36

Le Cluster de Différenciation 36, précédemment appelé FAT (fatty acid translocase) est une glycoprotéine multifonctionnelle capable de lier des molécules variées. Elle est exprimée dans de nombreux tissus et a été très conservée durant l'évolution. Elle est ainsi impliquée dans des fonctions basiques de régulation énergétique et d'immunité innée, mais également dans de nombreux processus physiologiques ou pathologiques tels que l'angiogenèse, la thrombose, l'athérogenèse, la maladie d'Alzheimer ou la malaria. Une autre de ses fonctions est celle de senseur lipidique, notamment au niveau des tissus en contact avec l'environnement extérieur (épithélia lingual, olfactif et intestinal), mais également au niveau du cerveau, suggérant une continuité fonctionnelle entre ces différents tissus (Martin et al., 2011a).

a. Structure

Le CD36, de masse moléculaire apparente de 88kDa, contient 471 résidus d'acides-aminés, avec deux domaines transmembranaires localisés près des extrémités N- et C-terminales, lui conférant une structure de type épingle à cheveux avec un large domaine extracellulaire (figure 20). Celui-ci contient au

moins deux sites de liaison différents, ainsi que de multiples sites de glycosylation et trois ponts disulfures, essentiels pour le trafic intracellulaire de la protéine et son adressage correct à la membrane (Martin et al., 2011a). Les extrémités N- et C- terminales contiennent des résidus cystéine dont l'acétylation et/ou la palmitoylation contribuent au recrutement du CD36 dans les radeaux lipidiques (Martin et al., 2011a) où il est retrouvé le plus souvent (Ehehalt et al., 2006). Dans les radeaux, le CD36 forme des associations fonctionnelles avec d'autres protéines, telles que les Src-PTK qui jouent un rôle dans la signalisation (Huang et al., 1991) et la cavéoline 1 impliquée dans la localisation de CD36 au niveau des cavéoles, formant ainsi des invaginations membranaires à l'origine de l'endocytose du CD36 (Pepino et al., 2014). Au niveau de la terminaison carboxyle, l'insuline et les AGLC ont des effets opposés sur l'ubiquitination des résidus Lys469 et Lys472. L'insuline réduit l'ubiquitination et stabilise le CD36 à la membrane, alors que les AGLC augmentent l'ubiquitination facilitant ainsi sa sortie de la membrane et sa dégradation par la voie du protéasome (Smith et al., 2008; Tran et al., 2011). Le CD36 présente donc toutes les caractéristiques d'un récepteur capable de transférer un signal exogène dans la cellule.

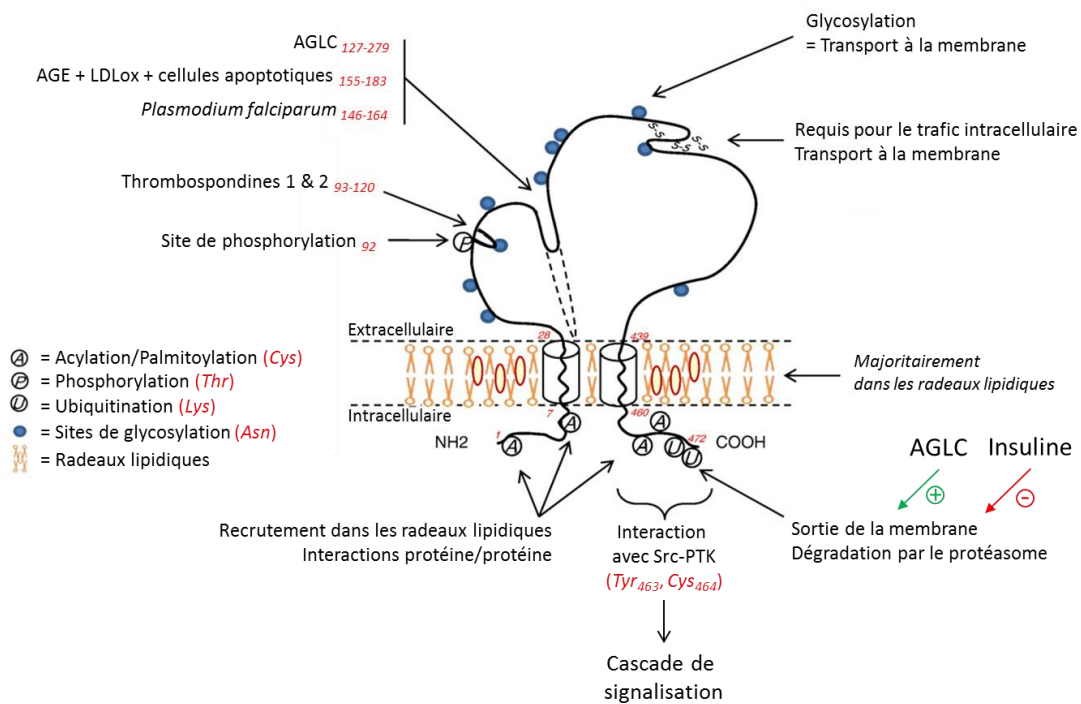


Figure 20 : Structure prédictive du CD36 chez l'Homme.

Adapté de (Martin et al., 2011a).

AGE : produits de glycation avancés (*advanced glycation end-products*) ; AGLC : acides gras à longue chaîne ; Asn : résidu asparagine ; Cys : résidu cystéine ; LDLox : lipoprotéines de basse densité (*low density lipoprotein*) oxydées ; Lys : résidu lysine ; Src-PTK : src-protéine tyrosine kinase ; Thr : résidu thréonine ; Tyr : résidu tyrosine.

b. Propriétés de liaison, fonctions et localisations

Le CD36 est capable de lier de nombreux ligands hydrophobes. Ces molécules peuvent être natives comme la thrombospondine et le collagène, d'où son rôle dans la thrombose et l'angiogenèse.

Ces ligands peuvent également être des molécules modifiées trouvées dans les fluides corporels (produits de glycation avancés ou LDL oxydés) ou à la surface des cellules apoptotiques et des érythrocytes infectés par le *Plasmodium falciparum*. Pour toutes ces molécules, le CD36 joue un rôle de récepteur *scavenger* (pour une revue, voir (Martin et al., 2011a)).

D'autre part, le CD36 peut lier les AGLC saturés ou insaturés, avec une affinité de l'ordre du nanomolaire (Baillie et al., 1996). De ce fait, il joue un rôle de récepteur aux AGLC aux niveaux des adipocytes et des myocytes (Coburn et al., 2000), contribuant à la régulation de la balance énergétique. Il est également impliqué dans la détection des AGLC par l'intestin (Poirier et al., 1996) et l'hypothalamus (Le Foll et al., 2009). Récemment, un homologue du CD36, le SNMP (*sensory neuron membrane protein*), capable de lier une phéromone dérivée des AG, a été trouvé chez la drosophile dans l'épithélium olfactif (Benton et al., 2007), illustrant la conservation de ce gène durant l'évolution.

c. Rôle du CD36 dans la détection orale des lipides

Le CD36 est exprimé dans l'épithélium gustatif chez de nombreuses espèces incluant le rat (Fukuwatari et al., 1997), la souris (Laugerette et al., 2005) et l'Homme (Simons et al., 2011). Chez la souris, le CD36 a une localisation apicale au niveau de certaines cellules gustatives bordant le pore gustatif des bourgeons du goût, majoritairement dans les papilles caliciformes (Laugerette et al., 2005). Sa colocalisation avec l' α -gustducine (Gaillard et al., 2008; Laugerette et al., 2005) et le GPR120 (Martin et al., 2012; Ozdener et al., 2014) laisse penser qu'il est exprimé majoritairement dans les cellules de type II. De nombreuses études montrent l'implication du CD36 dans la détection orale des AGLC, notamment grâce à l'utilisation de souris CD36^{-/-}. L'inactivation du gène diminue drastiquement voire abolit la préférence pour des solutions d'AGLC (LA) ou de TG (huile de soja) lors de tests de double-choix long terme (Laugerette et al., 2005; Sclafani et al., 2007a). Des résultats similaires ont été reproduits lors de tests à court terme (5 min) utilisés pour minimiser les influences post-ingestives (Martin et al., 2011b). De plus, l'utilisation de siRNA (*small interfering RNA*) dirigés contre le CD36 spécifiquement au niveau des papilles caliciformes s'accompagne également d'une diminution de la préférence pour le LA chez le rat (Chen et al., 2013). Il faut noter cependant que les souris CD36^{-/-} montrent une préférence pour les grandes concentrations de lipides lors de double-choix long terme, qui serait conditionnée par leurs actions post-ingestives, médiées par d'autres récepteurs au niveau intestinal (Sclafani et al., 2007a; Sclafani et al., 2013). D'autre part, l'analyse immunohistochimique du marqueur Fos au niveau du NTS a montré qu'un dépôt lingual de LA entraîne une activation neuronale dépendante du CD36. En effet, ce phénomène est absent chez les souris CD36^{-/-} (Gaillard et al., 2008). Enfin, l'induction de la phase céphalique de la digestion induite par un dépôt oral d'AGLC semble aussi être dépendante du CD36 chez la souris (Laugerette et al., 2005).

Chez l'Homme, les effets d'un variant commun du gène de CD36 sur la détection orale des lipides ont été testés. Le polymorphisme rs1761667 affecte l'expression de la protéine CD36. On constate que la

diminution de l'expression de CD36 trouvée chez les porteurs de l'allèle AA est associée à une augmentation des seuils de détection de l'OLA (Pepino et al., 2012). Dans une autre étude (Keller et al., 2012), les porteurs de ce variant montrent une plus grande avidité pour des matières grasses ajoutées.

L'ensemble de ces résultats suggère que l'expression du CD36, en affectant la sensibilité oléosensorielle pour les lipides, pourrait jouer un rôle dans les choix alimentaires. Le 6^{ème} critère est rempli car il existe au moins un récepteur gustatif des lipides. Les mécanismes impliqués dans la transduction du signal au niveau de la cellule gustative sont bien connus même s'il reste de nombreuses zones d'ombre.

d. Signalisation via CD36 dans les bourgeons du goût

Outre le CD36, l'analyse comportementale de toute une série de modèles de souris transgéniques a permis d'identifier un certain nombre de gènes impliqués dans la signalisation cellulaire induite par la liaison des AGLC sur le CD36 des cellules gustatives : STIM1 (*stromal interaction molecule 1*) (Dramane et al., 2012), TRPM5 (Sclafani et al., 2007b), CALHM1 (Besnard et al., 2016 (in press)), et P₂X₂/P₂X₃ (Sclafani and Ackroff, 2014). De plus, des événements tels que la phosphorylation des Src-PTK, l'augmentation de [Ca²⁺]_i ou la sécrétion de neurotransmetteurs ont été rapportés dans des cellules CD36-positives (El-Yassimi et al., 2008). Ces données permettent de proposer le modèle de travail illustré sur la figure 21 (Besnard et al., 2016 (in press)).

Pendant une prise alimentaire, les AGLC se lient au CD36 situé dans des radeaux lipidiques au pôle apical des cellules de type II. Cette liaison induit la phosphorylation de la Src-PTK qui active une phospholipase C (probablement PLCβ2, figure 21-1). Celle-ci va hydrolyser le PIP₂ (phosphoinositol-4,5 diphosphate) pour donner de l'IP₃. L'action de l'IP₃ sur son récepteur au niveau du RE permet le relargage de Ca²⁺. La déplétion des réserves internes de Ca²⁺ au niveau du RE est détectée par STIM1 qui joue un rôle essentiel dans la cascade de réactions qui aboutit à l'activation des canaux calciques SOC (Orai1 et Orai1/3 : *calcium release-activated calcium channel protein 1 et 1/3*), permettant une augmentation encore plus importante de [Ca²⁺]_i (figure 21-2). Les canaux TRPM5, dépendants du Ca²⁺ s'ouvrent ensuite et permettent l'entrée de Na⁺, aboutissant à une dépolarisation cellulaire (figure 21-3). Notons que la présence d'AGPI, en inhibant les canaux DRK, pourrait amplifier cette dépolarisation (Gilbertson and Khan, 2014) (figure 21-4) jusqu'au niveau requis pour induire un relargage d'ATP au travers les canaux CALHM1 (figure 21-5). L'ATP pourrait ensuite agir à plusieurs endroits *via* ses récepteurs P₂X₂/P₂X₃ (figure 21-6). Tout d'abord, une boucle de régulation positive autocrine permettrait d'entretenir la sécrétion d'ATP. Puis, il activerait les terminaisons nerveuses non-conventionnelles formées avec les cellules de type II, et enfin il induirait le relargage de 5-HT par les cellules de type III. La 5-HT permettrait d'augmenter la durée du signal en régulant le relargage d'ATP, limitant la désensibilisation des récepteurs purinergiques situés sur les terminaisons nerveuses (Jaber et al., 2014) (figure 21-7). Une sécrétion de norépinephrine a également été rapportée suite à l'activation de CD36 par des AGLC (El-Yassimi et al., 2008), mais son action en aval n'est pas connue.

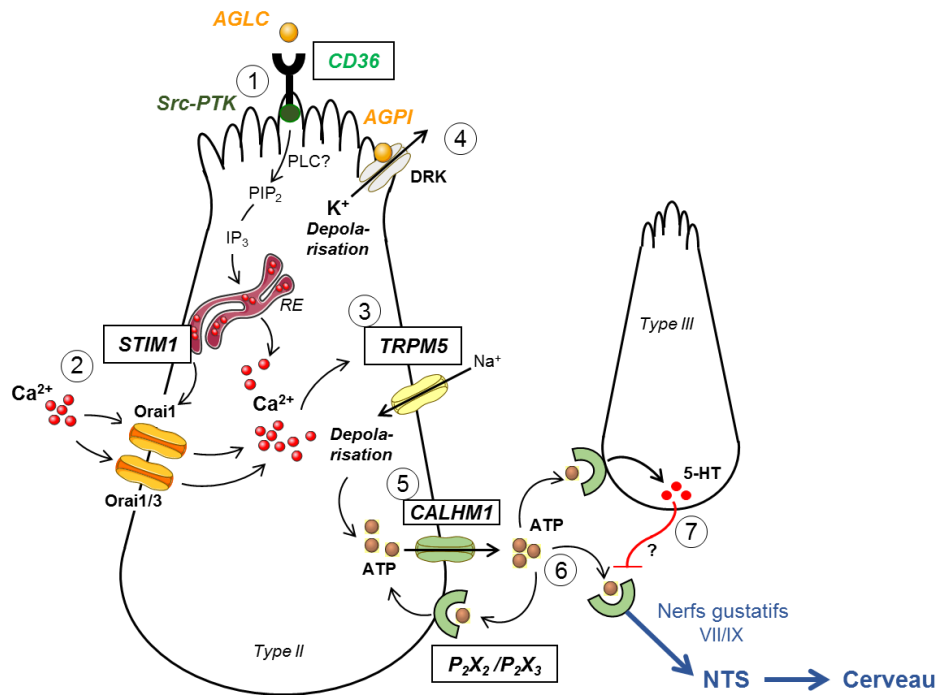


Figure 21 : Hypothèse de travail sur la signalisation induite par les AGLC via CD36 dans les gustatives.

Adapté de (Besnard et al., 2016 (in press))

AGLC : acides gras à longue chaîne ; AGPI : acides gras polyinsaturés ; ATP : adénosine triphosphate ; CALHM1 : *calcium homeostasis modulator 1* ; DRK : *delayed-rectifying potassium channels* ; IP₃ : inositol-triphosphate ; NTS : noyau du tractus solitaire ; PIP₂ : phosphoinositol-4,5 diphosphate ; PLC : phospholipase C ; P₂X₂/P₂X₃ : récepteurs purinergiques ; RE : réticulum endoplasmique Src-PTK : src-protéine tyrosine kinase ; STIM1 : *stromal interaction molecule 1* ; TRPM5 : *melastatin-related transient receptor potential cation channel type 5* ; 5-HT sérotonine ; VII : corde du tympan ; IX : nerf glosso-pharyngien.

e. Régulation du CD36 dans les bourgeons du goût

Des travaux du Laboratoire (Martin et al., 2011b) ont permis l'étude du cycle nyctéméral du CD36 dans la papille caliciforme chez la souris : son niveau d'ARNm diminue pendant la phase nocturne, où la souris consomme la grande majorité de sa prise alimentaire. De plus, le taux de protéine CD36 est diminué de moitié dans la papille caliciforme chez les souris nourries pendant une heure après un jeûne, de manière dépendante à la présence de lipides dans la nourriture. De façon intéressante, un dépôt d'huile sur la langue suffit pour déclencher une diminution de la protéine CD36, suggérant une régulation locale qui semble avoir une origine post-transcriptionnelle puisque dans ce cas, aucune diminution des ARNm n'est observée. D'autre part, la perte de préférence observée chez les souris CD36^{-/-} pour une solution de LA se retrouve également chez les souris hétérozygotes qui expriment la moitié des taux de protéine CD36 par rapport aux souris sauvages. Il est donc tentant de penser que la régulation négative lipide-dépendante de CD36 dans la papille caliciforme pourrait moduler la motivation pour le gras durant un repas, d'abord élevée puis diminuant progressivement au fur et à mesure de la prise alimentaire, rappelant le phénomène de satiété sensorielle spécifique (Cabanac, 1971).

Ainsi, si CD36 permet la détection orosensorielle des lipides, le fait qu'il soit régulé répond au 7^{ème} critère de la définition d'une saveur primaire. D'autres aspects de la régulation des lipides seront détaillés plus loin.

IV.4.3. GPR40

Le GPR40, également appelé FFAR1 (*free fatty acid receptor 1*), est aussi un récepteur lipidique. Il lie les AGLC et AGMC (Briscoe et al., 2003; Schnell et al., 2007). Il est exprimé dans les cellules β des îlots de Langerhans où il amplifie la sécrétion d'insuline stimulée par le glucose (Briscoe et al., 2003; Schnell et al., 2007). Il joue un rôle important dans les mécanismes qui lient l'obésité et le diabète de type II (Hara et al., 2014; Talukdar et al., 2011). Il est également exprimé dans l'intestin où il stimule la sécrétion d'hormones gastro-intestinales lors d'un repas : la CCK (Liou et al., 2011), le GLP-1 et le GIP (Edfalk et al., 2008). L'activation de GPR40 entraîne son association avec une protéine G (probablement la $G\alpha_q$), puis une augmentation de $[Ca^{2+}]_i$ (Hara et al., 2014). Il est intéressant de noter que le GPR40, associé au GPR120, joue un rôle dans la préférence pour les lipides médiée par leurs effets de renforcement post-oraux (Sclafani et al., 2015; Sclafani et al., 2013).

En 2010, une équipe suisse a étudié le comportement des souris GPR40^{-/-} vis-à-vis de la détection orale des lipides (Cartoni et al., 2010). En effet, l'ARNm de GPR40 a été détecté au niveau des papilles caliciformes et foliées (Gilbertson et al., 2010) et sa protéine a été retrouvée au niveau des papilles caliciformes (Cartoni et al., 2010). Cependant, il faut préciser que, dans la papille caliciforme, GPR40 était trouvé co-exprimé avec GLAST (marqueur des cellules de type I) et dans une moindre mesure avec SNAP25 (marqueur des cellules de type III), son expression dans les cellules de type II n'a pas été analysée dans cette étude (Cartoni et al., 2010). Les tests de comportement alimentaire (double-choix long terme et tests de licking court terme) ont montré une chute de la préférence pour les AGLC chez les souris GPR40^{-/-} (sans affecter la détection des autres saveurs). De plus, ces souris montrent une diminution de la réponse des nerfs gustatifs à une stimulation orale par des AG. Ainsi, GPR40 représentait un candidat potentiel pour la détection orosensorielle des lipides. Plus récemment, la même équipe a montré que des agonistes de GPR40 sont capables d'exciter le nerf glossopharyngien chez les souris WT mais pas chez les GPR40^{-/-} (Godinot et al., 2013). Deux de ces agonistes ont même pu induire un goût « LIN » – définit comme un goût « gras » en prenant comme référence le LA – chez des sujets humains. Cependant, ces 2 agonistes étaient également décrits comme « astringent », il est donc possible qu'une confusion ait eu lieu, d'autant plus que la saveur du gras est difficile à décrire. Une stimulation des nerfs trijumeaux est également envisageable. Chez la souris, les animaux WT n'ont montré aucune préférence pour des agonistes de GPR40 lors de tests de double-choix. De même, l'équipe d'Anthony Sclafani a montré que les souris GPR40^{-/-} ne présentent aucune diminution de la préférence pour des solutions d'Intralipide en comparaison des souris WT (Sclafani et al., 2013). En outre, d'autres équipes n'ont pas été en mesure de détecter l'ARNm codant pour GPR40 dans les papilles gustatives de rat (Matsumura et al., 2007), de souris (Montmayeur et al., 2011) et d'Homme (Galindo et al., 2012b). En accord avec ces résultats négatifs, nos analyses en qPCR n'ont pas permis de détecter GPR40 dans les papilles caliciformes de souris. Ainsi, dans l'état actuel des connaissances, il est peu probable que le GPR40 soit un récepteur impliqué dans la détection orosensorielle des lipides alimentaires.

IV.4.4. GPR120

Le GPR120 est un autre récepteur aux lipides, présent au niveau lingual. Il régule de nombreux processus physiologiques incluant la sécrétion d’hormones gastro-intestinales, l’homéostasie du glucose, l’adipogenèse et les processus anti-inflammatoires. Récemment, une étude génétique chez l’Homme a identifié une mutation de GPR120 associée à l’obésité et à l’insulino-résistance (Ichimura et al., 2012). Un rôle dans la détection orosensorielle des lipides lui a également été attribué (Cartoni et al., 2010), mais les données comportementales et fonctionnelles dans ce domaine sont encore peu nombreuses.

a. Structure

Le GPR120, également appelé FFAR4 (*free fatty acid receptor 4*) a pour la première fois été identifié en tant que récepteur orphelin en 2003 (Fredriksson et al., 2003). Il est membre de la famille des GPCR *rhodopsin-like* ; il possède donc 7 domaines transmembranaires. Son poids moléculaire est d’environ 42kDa. Il existe chez l’Homme sous deux isoformes : une courte (361 acides aminés) et une longue (377 acides aminés) (figure 22), alors que la plupart des autres espèces, dont les rongeurs, ne possèdent que le variant correspondant à la forme courte (Moore et al., 2009; Watson et al., 2012). Le GPR120 est capable d’interagir avec une protéine Gαq/11 (Hirasawa et al., 2005) et également de se coupler à la β-arrestine (Oh et al., 2010), avec pour conséquence au moins 2 voies de signalisation différentes.

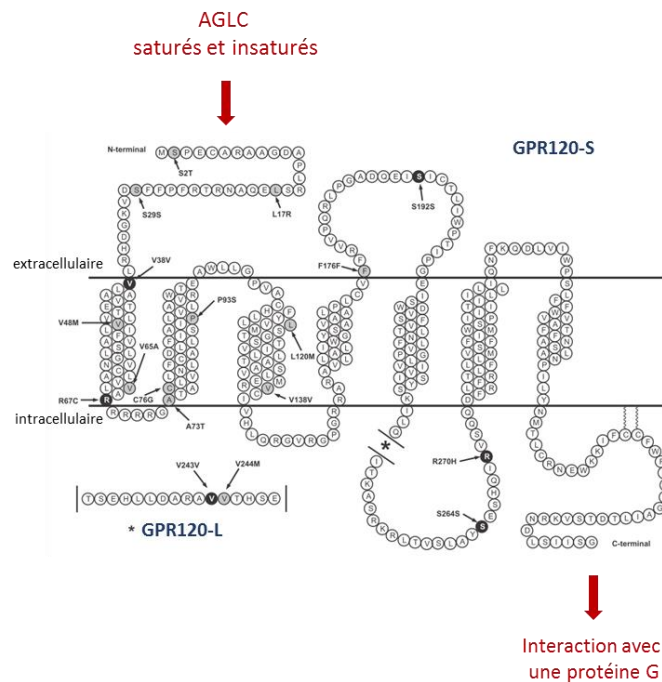


Figure 22 : Structure prédictive de GPR120 chez l’Homme.

Adapté de (Mo et al., 2013)

Les flèches indiquent les polymorphismes.

AGLC : acides gras à longue chaîne ; GPR120-L : isoforme longue ; GPR120-S : isoforme courte.

b. Propriétés de liaison, fonctions et localisations

Le GPR120 a été déorphanisé en 2005. Même s'il est surtout connu pour sa capacité à lier les ω 3 et ainsi à médier des effets anti-inflammatoires (Oh et al., 2010), il est en fait activé par de nombreux AGMC (≥ 14 C) et AGLC, avec une affinité de l'ordre du μ M (Hirasawa et al., 2005). Il est largement exprimé dans de nombreux tissus de l'organisme, notamment le cerveau, le thymus, l'intestin, les tissus adipeux, les muscles squelettiques, l'hypophyse, le cœur, le foie, les bourgeons du goût, et de manière particulièrement importante dans les poumons et le côlon (Cornall et al., 2011; Gotoh et al., 2007; Hirasawa et al., 2005; Tanaka et al., 2008b). Ces dernières années, le GPR120 a reçu beaucoup d'attention car il représente une cible potentielle pour le traitement de désordres métaboliques, incluant le diabète de type II et l'obésité (Mo et al., 2013; Ulven and Christiansen, 2015). Les fonctions physiologiques de GPR120 sont résumées dans la figure 23.

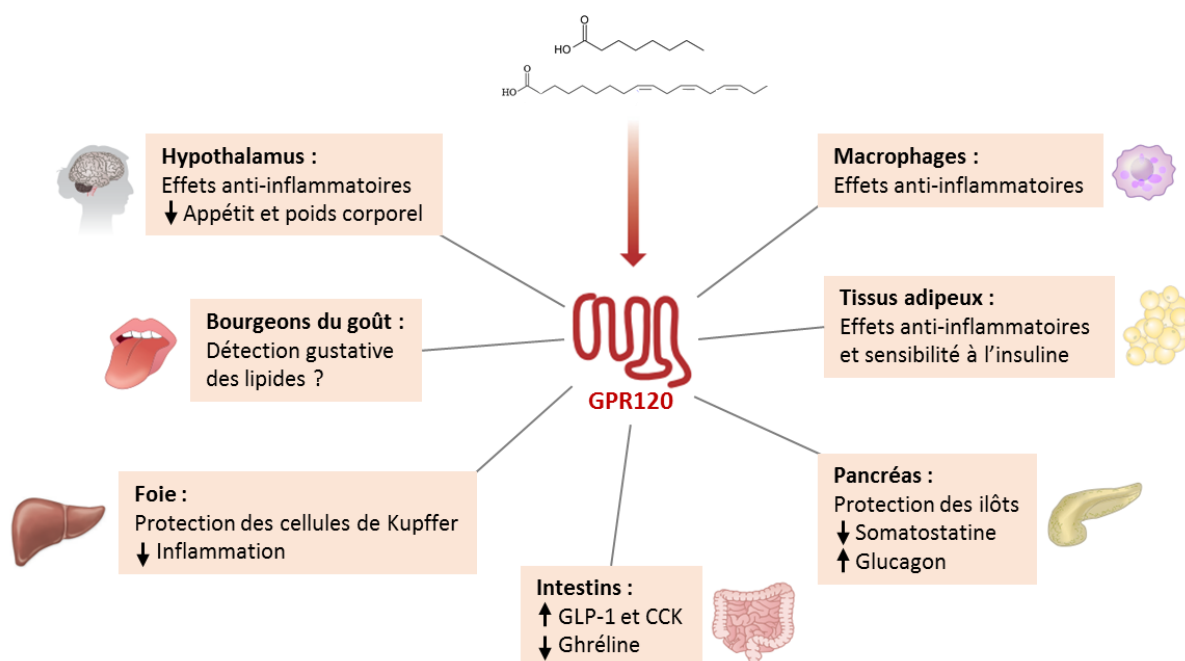


Figure 23 : Principales fonctions physiologiques de GPR120.

Adapté de (Ulven and Christiansen, 2015).

CCK : cholécystokinine ; GLP-1 : *glucagon-like peptide-1*.

Au niveau de l'intestin, le GPR120 est particulièrement exprimé dans les cellules entéroendocrines L. Il permet la sécrétion d'hormones gastro-intestinales *via* l'augmentation de $[Ca^{2+}]_i$: GLP-1 (Hirasawa et al., 2005) – qui augmente la sécrétion d'insuline stimulée par le glucose, GIP (Iwasaki et al., 2015) et CCK (Tanaka et al., 2008a), même si ce rôle n'est pas systématiquement confirmé pour le GLP-1 et la CCK (Liou et al., 2011; Paulsen et al., 2014). Dans l'estomac, GPR120 régule négativement la sécrétion de ghréline (Gong et al., 2014). La sécrétion de ces hormones, associée aux effets anti-inflammatoires de GPR120 dans l'hypothalamus (Cintra et al., 2012), peut affecter l'appétit et la prise alimentaire (Ulven and Christiansen, 2015). Dans le pancréas, GPR120 semble stimuler la sécrétion de

glucagon (Suckow et al., 2014) mais là aussi, son rôle exact dans cet organe reste à déterminer. Dans le tissu adipeux, le rôle du GPR120 est mieux connu : il est notamment impliqué dans la différenciation des adipocytes (Gotoh et al., 2007). De plus, il préserve contre le diabète de type II en améliorant l'action de l'insuline et en augmentant le captage de glucose par les adipocytes grâce au GLUT4 (*glucose transporter 4*) (Oh et al., 2010). Mais son action protectrice concerne particulièrement ses effets anti-inflammatoires par l'intermédiaire des $\omega 3$ (Oh et al., 2014), même si, là encore, ce rôle n'est pas systématiquement confirmé (Bjursell et al., 2014). GPR120 est en effet très exprimé dans les macrophages où il est capable de bloquer la cascade d'inflammation induite par le LPS (lipopolysaccharide). C'est d'ailleurs l'un des mécanismes permettant l'augmentation de la sensibilité à l'insuline dans le tissu adipeux (Oh et al., 2010). La signalisation engagée dans l'effet anti-inflammatoire de GPR120 implique le recrutement de la β -arrestine, suivi de l'inhibition de TAK1 (*transforming growth factor- β activated kinase 1*) grâce à l'internalisation et la séquestration de TAB1 (*TAK1-binding protein*) – TAK-1 étant un médiateur commun de la cascade de signalisation inflammatoire du LPS et de TNF- α (*tumor necrosis factor α*) (Oh et al., 2010; Talukdar et al., 2011) (figure 24). Le développement d'agonistes sélectifs de GPR120 représente donc une voie potentielle pour le traitement des maladies associées à l'insulino-résistance, et notamment les processus inflammatoires (Oh et al., 2014).

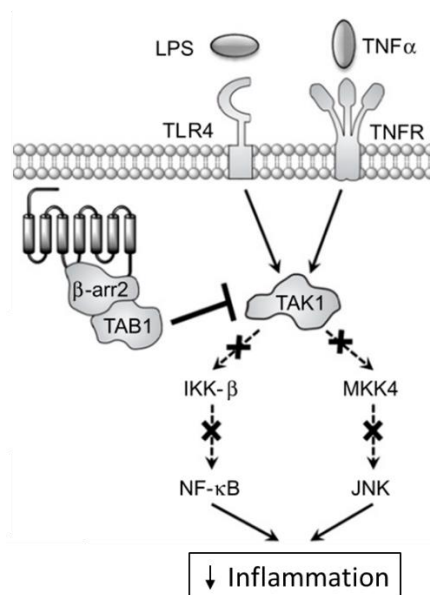


Figure 24 : Cascade de signalisation impliquée dans les effets anti-inflammatoires de GPR120.

Adapté de (Mo et al., 2013).

β -arr2 : β -arrestine 2 ; IKK- β : inhibitor of kappa B kinase β ; JNK : c-Jun N-terminal kinase ; LPS : lipopolysaccharide ; MKK4 : mitogen-activated protein kinase 4 ; NF- κ B : nuclear factor-kappa B ; TAB1 : TAK1-binding protein ; TAK1 : transforming growth factor- β activated kinase 1 ; TLR4 : toll-like receptor 4 ; TNF- α : tumor necrosis factor α ; TNFR : tumor necrosis factor receptor.

Enfin, plusieurs observations sont en faveur d'un rôle de GPR120 dans la régulation de la masse corporelle. Chez l'Homme, des études ont montré une augmentation de l'expression de GPR120 dans les tissus adipeux viscéral et sous-cutané, dans l'intestin et dans l'estomac, corrélée avec l'IMC ou l'obésité

(Ichimura et al., 2012; Little et al., 2014; Widmayer et al., 2012). Une étude récente a montré au contraire une diminution de l'expression de GPR120 dans le tissu adipeux viscéral chez des patients obèses morbides (Rodriguez-Pacheco et al., 2014). Chez les rongeurs, un régime HF entraîne une augmentation de l'expression de GPR120 dans l'estomac, le tissu cardiaque et les muscles squelettiques (Cornall et al., 2011; Widmayer et al., 2015), ainsi qu'une altération de sa distribution dans les radeaux lipidiques des cellules des bourgeons du goût (Ozdener et al., 2014). D'autre part, l'étude phénotypique des souris GPR120^{-/-} montre une augmentation de la masse corporelle de ces souris par rapport aux souris WT soit en régime standard (Suckow et al., 2014), soit en régime HF (Ichimura et al., 2012). Enfin, la mutation R270H a été associée à un risque d'obésité dans une population européenne (Ichimura et al., 2012) et d'autres variants ont été identifiés dans une population japonaise en relation avec l'IMC (Waguri et al., 2013). Globalement, le GPR120 représente donc une cible potentielle pour la prévention de l'obésité, notamment grâce à ses propriétés anti-inflammatoires (Ulven and Christiansen, 2015), mais il est possible également que le GPR120 ait une action sur la dépense énergétique. Il est en effet régulé positivement dans le tissu adipeux brun lors d'une exposition au froid chez la souris (Rosell et al., 2014).

c. Rôle du GPR120 dans la détection orale des lipides

Le GPR120 a été proposé comme candidat potentiel à la détection gustative des lipides par la même équipe que le GPR40 (Cartoni et al., 2010). Il est retrouvé dans les bourgeons du goût chez le rongeur (Cartoni et al., 2010; Matsumura et al., 2009; Matsumura et al., 2007), majoritairement colocalisé avec des marqueurs de cellules de type II : TRPM5 (Cartoni et al., 2010), IP₃R₃ (Montmayeur et al., 2011), PLCβ2 et α-gustducine (Matsumura et al., 2009), et minoritairement avec le marqueur de cellules de type III NCAM (Matsumura et al., 2009). Contrairement au GPR40, notre équipe a également montré sa présence dans les bourgeons du goût chez la souris, largement colocalisé avec CD36 (Martin et al., 2012; Ozdener et al., 2014). Chez l'Homme, le GPR120 est exprimé à la fois dans les bourgeons du goût et dans l'épithélium gustatif environnant (Galindo et al., 2012b).

De même que pour le GPR40, des tests de comportement alimentaire long terme et court terme ont montré une chute de la préférence pour les AGLC chez les souris GPR120^{-/-}, sans affecter la détection des autres saveurs. De plus, ces souris montrent une légère diminution de la réponse des nerfs gustatifs à une stimulation orale par des AG (Cartoni et al., 2010). La signalisation dans les bourgeons du goût semble se faire à travers une augmentation de [Ca²⁺]_i (Ozdener et al., 2014). L'ensemble de ces résultats est séduisant dans le sens où les saveurs sucré, amer et umami sont elle-même détectées par des GPCR (récepteurs T1R et T2R), et sont également associées à une signalisation calcique. Cependant, les preuves concernant le rôle de GPR120 dans la détection des lipides restent limitées ; c'est d'ailleurs l'objet d'une partie des travaux de cette thèse.

Il est à noter par ailleurs que, contrairement au CD36, les niveaux d'ARNm et de protéines de GPR120 restent stables tout au long du nyctémère et ne sont pas modifiés par la présence de lipides

dans l'alimentation (Martin et al., 2011b). Cependant, la distribution membranaire de la protéine semble être modifiée en présence d'AGLC, le traitement de cellules gustatives humaines ou de souris avec du LA entraînant une augmentation de GPR120 dans les radeaux lipidiques (Ozdener et al., 2014).

En résumé, deux des quatre lipido-récepteurs candidats semblent remplir les conditions nécessaires à cette fonction : le CD36 et le GPR120, connus pour être activés par les AGLC. Ce constat soulève des questions en regard des caractéristiques communes aux récepteurs gustatifs, c'est-à-dire qu'un type de récepteur est dédié à un type de molécule sapide.

IV.5. Régulation par les hormones

La détection gustative des lipides semble être régulée par différentes molécules, ce qui permet de répondre au 7^{ème} critère de définition d'une saveur primaire. Une étude réalisée au Laboratoire (Martin et al., 2012) montre que les souris GLP-1R^{-/-} présentent une diminution de la détection des lipides dans des expériences de comportement long terme (double-choix 12h) mais également court terme (tests de *licking* 1 min), suggérant un effet du GLP-1 au niveau oral. De manière intéressante, la diminution de l'expression du CD36 dans la papille caliciforme suite à une prise alimentaire contenant des lipides n'est pas retrouvée chez les souris GLP-1R^{-/-}. Ainsi, il est possible que l'effet du GLP-1 sur la détection orosensorielle des lipides se fasse grâce à une action sur la dynamique de régulation de CD36 au niveau de la membrane plasmique des cellules gustatives. La leptine semble jouer un rôle inverse à celui de GLP-1 dans la détection des lipides : une injection systémique chez des rats entraîne une diminution de la réponse pour de petites concentrations (<1%) d'huile de maïs (Shin et al., 2011a).

Nous venons de voir que l'ensemble des critères proposés pour la définition d'une saveur primaire (Mattes, 2011) semble satisfait par les lipides. Cependant, de nombreuses questions subsistent, notamment concernant les rôles respectifs du CD36 et du GPR120 au niveau des bourgeons du goût. Il est donc difficile de conclure définitivement sur la réalité d'une 6^{ème} saveur primaire. D'un point de vue physiologique, l'existence d'un système de détection gustative des lipides entraînant une préférence pour les aliments gras, représente un avantage certain en cas de pénurie alimentaire. Cependant, ce système peut s'avérer délétère du point de vue de la gestion de la balance énergétique quand l'offre alimentaire est abondante et diversifiée. Existe-t-il un lien entre l'obésité et la capacité à détecter les lipides au niveau du système gustatif périphérique ?

Partie V : La détection gustative des lipides est-elle perturbée lors de l'obésité ?

L'obésité est associée à une modification du comportement alimentaire, avec une surconsommation d'aliments palatables, et notamment une préférence marquée pour les aliments riches en graisses (Bray and Popkin, 1998; Drewnowski et al., 1985; Mela and Sacchetti, 1991). Plusieurs mécanismes interconnectés peuvent être mis en cause, comprenant une perturbation des systèmes de régulations centraux (cerveaux émotionnel et métabolique) et périphériques associés au comportement alimentaire.

Les individus obèses subissent en effets des modifications hormonales bien connues (insuline, leptine, GLP-1, etc.) qui peuvent altérer les mécanismes de régulation de la prise alimentaire au niveau hypothalamique (Lam et al., 2005; Schwartz, 2004) ; mais ils montrent également des altérations aux niveaux des régions cérébrales associées aux circuits de la récompense (Carnell et al., 2012). Par exemple, comparé à des sujets minces, des femmes obèses à qui sont présentées des images d'aliments palatables montrent une plus grande activation des zones cérébrales (visualisée par imagerie par résonance magnétique – IRM – fonctionnelle) liées à la récompense et à l'émotion : le NAc, la VTA et l'amygdale (Stoeckel et al., 2008). L'ensemble de ces modifications entraîne une surconsommation de nourriture palatable (figure 25), pouvant aller jusqu'à des comportements de type addictif (Schulte et al., 2015). L'étude des mécanismes au niveau central liés à ces comportements (notamment les voies de signalisation opioïdiques et dopaminergiques (Berthoud et al., 2012)) sort du cadre de cette thèse. Cependant, de manière intéressante, il existe des différences structurelles dans des aires cérébrales associées non seulement au comportement alimentaire et aux circuits de la récompense, mais également à la détection gustative (Pannacciulli et al., 2006). Ce dernier paramètre entraîne une interrogation concernant les mécanismes périphériques de détection des lipides, qui pourraient eux-aussi être perturbés lors de l'obésité, comme c'est le cas pour d'autres saveurs, avec des données parfois contradictoires concernant l'augmentation ou la diminution de la sensibilité (Donaldson et al., 2009; Overberg et al., 2012; Park et al., 2015).

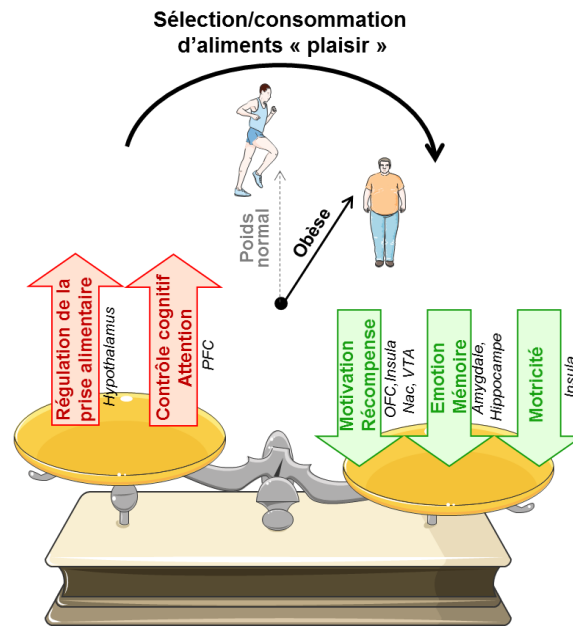


Figure 25 : Conséquences de l'altération du fonctionnement des cerveaux émotionnel et métabolique.
D'après (Besnard, 2015).

Nac : noyau accumbens ; OFC : cortex orbito-frontal ; PFC : cortex pré-frontal ; VTA : aire ventrale tegmentale.

V.1. Etudes chez le rongeur

De manière surprenante, le lien entre l'obésité et la détection gustative des lipides, et même des autres saveurs, a été peu étudié chez le rongeur, en comparaison des nombreuses études effectuées chez l'Homme. Pourtant, la détection des nutriments est la première étape du comportement alimentaire. Une altération du système de détection, notamment du sucré, au niveau des cellules gustatives (diminution du nombre de cellules répondant au sucré et diminution du signal calcique) chez les souris rendues obèses par un régime riche en lipides (*high-fat* : HF), a été montré (Maliphol et al., 2013). Concernant les lipides, des rats obèses possèdent un seuil de préférence plus élevé (autrement dit une sensibilité orosensorielle plus basse) pour le LA que des rats résistants à l'obésité lors de tests de double-choix long terme (Chen et al., 2013). Dans une autre étude chez des rats placés en régime HF, des expériences de licking très court terme (10s) montrent globalement que les rats obèses, d'origine génétique ou alimentaire, ont une préférence diminuée pour les faibles concentrations de lipides, mais une préférence plus élevée pour les grandes concentrations (Shin et al., 2011a). Si les auteurs suggèrent qu'un défaut du système de récompense serait à l'origine de ces modifications, on ne peut pas exclure que la détection périphérique puisse être également altérée.

V.2. Etudes chez l'Homme

Chez l'Homme, la plupart des études concernant le lien entre l'obésité et la détection gustative des lipides ont été réalisées par l'équipe de Russell Keast en Australie. Cette équipe a montré un lien entre la détection orale des AGLC (notamment l'OLA) et l'IMC. Les sujets obèses sont hyposensibles, et cette hyposensibilité est associée à une consommation plus importante d'aliments énergétiques et riches en lipides, ainsi qu'à une altération de la capacité à évaluer le contenu en lipides des aliments (Stewart et al., 2010; Stewart et al., 2011a; Stewart et al., 2011b). Cependant, une étude plus récente de la même équipe n'a pas été en mesure d'établir une relation entre le seuil de détection de l'OLA et l'IMC (Stewart and Keast, 2012). Notons qu'il est difficile de comparer des études psychophysiques portant sur une sensation complexe et peu descriptible. De manière intéressante, des sujets minces qui consomment un régime riche en lipides pendant 4 semaines voient leur sensibilité pour l'OLA diminuer, alors que l'ensemble des individus (minces et obèses) montrent une amélioration de la sensibilité pour l'OLA après un régime pauvre en lipides, ce qui suggère un effet du régime sur la capacité de détection des lipides.

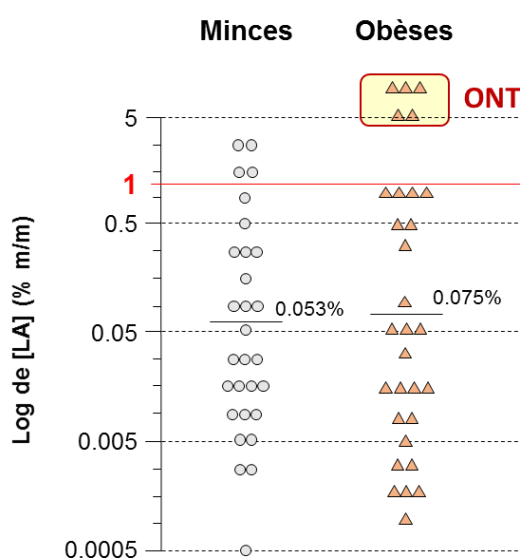


Figure 26 : Seuils de détection de l'acide linoléique (LA) chez les sujets minces et obèses.

Adapté de (Chevrot et al., 2014).

Seuils de détection établis grâce à la méthode des 3-AFC (*3-alternative forced-choice*) avec des solutions de concentration croissante de 0.0005 à 5% (m/m) de LA (acide linoléique).

Une étude récente conduite au Laboratoire (Chevrot et al., 2014) avait pour but de comparer la sensibilité orosensorielle pour un AGLC chez des sujets minces (IMC < 25, n = 30) et obèses (IMC > 30, n = 30). La méthode des 3-AFC a été utilisée (voir encart n°2) pour établir les seuils de détection du LA (figure 26). Cette étude n'a pas été en mesure d'établir un lien entre l'IMC et les seuils de détection du LA. En revanche, il est intéressant de noter que les 5 individus qui n'ont pu détecter que la concentration la plus élevée (5%), ou qui étaient insensibles au LA même à cette concentration, étaient tous obèses. D'après l'analyse des carnets de consommations portant sur les 24h précédant les séances d'évaluation

des seuils de détection, ces individus étaient également ceux qui avaient consommé le plus d'aliments hautement énergétiques, riches en glucides et en lipides (figure 27). Cette étude a de plus permis de mettre en évidence une altération de la réponse physiologique induite par la détection gustative des lipides et médiée par le nerf vague (correspondant à la boucle céphalique de la digestion). En effet, l'augmentation des TG plasmatiques observée chez les sujets minces suite à une stimulation uniquement orale par du LA n'a pas lieu chez les obèses. Or, les TG peuvent avoir une action directe au niveau central induisant ainsi un changement comportemental. En effet, une infusion de TG sous forme d'Intralipide (0.1 à 0.3µL/min) au niveau de la carotide pour cibler le cerveau entraîne une diminution de la préférence pour des aliments palatables chez la souris (Cansell et al., 2014).

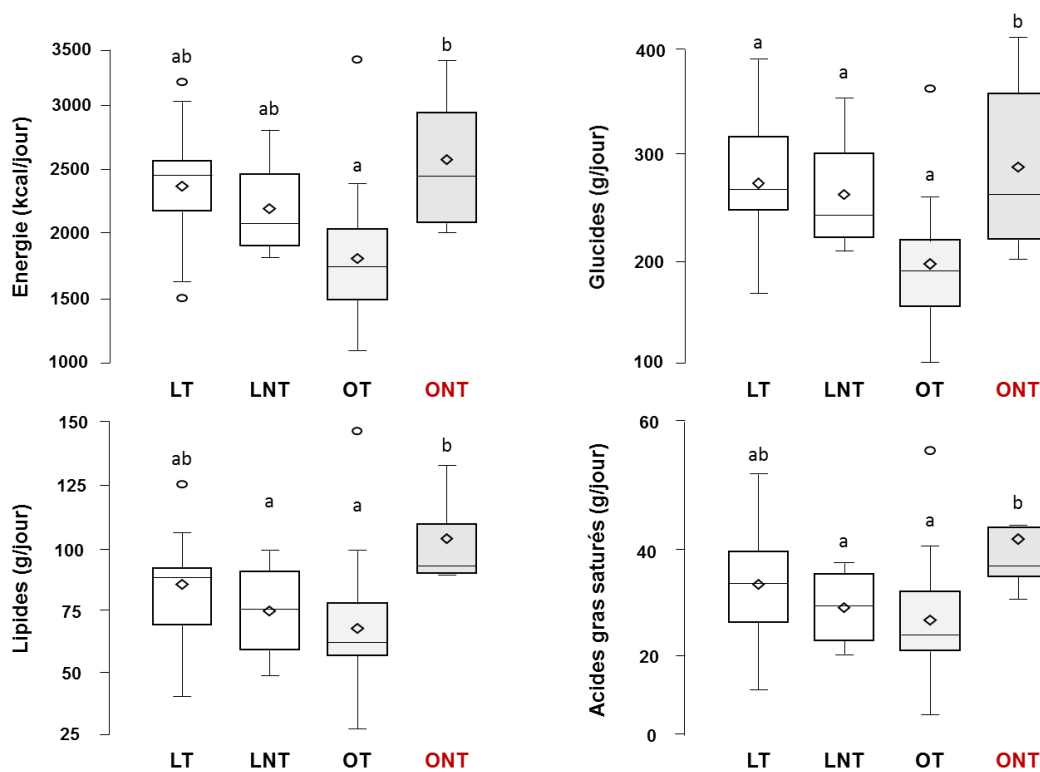


Figure 27 : Analyse des carnets de consommation sur 24h.

Adapté de (Chevrot et al., 2014).

Boîtes à moustache représentant les consommations en énergie, glucides, lipides, acides gras saturés sur 24h des sujets minces « tasters » (LT pour *lean taster*, n = 25), minces « non-tasters » (LNT, n = 4), obèses « tasters » (OT, n = 25) et obèses « non-tasters » (ONT, n = 5). Les petits losanges dans les boîtes représentent les moyennes. P < 0.05.

L'ensemble de ces résultats indique que l'obésité est bien associée à un bouleversement du système périphérique de détection des lipides. Les individus obèses seraient moins sensibles aux lipides, tout en préférant les aliments gras. Ceci peut sembler paradoxal, mais une explication possible est que ces individus auraient besoin de consommer plus de lipides pour atteindre un niveau de satisfaction

hédonique. Les données disponibles indiquent que l'obésité pourrait être la cause de ces perturbations au niveau périphérique. En effet, des rats obèses soumis à une restriction calorique ou à un bypass gastrique perdent du poids et retrouvent par la même occasion leur préférence et donc leur capacité de détection des faibles concentrations d'huile de maïs lors de tests comportementaux (Shin et al., 2011a; Shin et al., 2011b). De plus, les patients obèses qui subissent un bypass gastrique préfèrent consommer des aliments pauvres en lipides, en comparaison des patients en pré-opératoire, et même en comparaison des patients ayant subi d'autres types de chirurgie bariatrique (Miras and le Roux, 2013). Les mécanismes impliqués restent peu connus et les seuils de détection orosensorielle n'ont pas été étudiés chez ces patients, ce qui constitue une piste d'investigation pour le futur.

La question des mécanismes impliqués, et notamment le rôle joué par le CD36, dans l'altération de la détection orosensorielle des lipides lors de l'obésité apparaît donc importante. Plusieurs hypothèses concernant l'origine de cette perturbation sont envisagées. Tout d'abord, les perturbations endocrines peuvent jouer un rôle. Des injections de leptine par exemple, influencent négativement la détection de l'huile de maïs chez le rat (Shin et al., 2011a) ; or il est connu que les taux de leptine sont proportionnels à la masse grasse (Benoit et al., 2004). Une autre approche concerne le rôle très important de la salive dans la détection des lipides. En effet, les sujets obèses présentent une composition salivaire différente, avec notamment une activité lipolytique plus basse que les sujets de poids normal (Vors et al., 2015). Ceci pourrait contribuer aux différences de perception de la palatabilité des aliments gras, mais n'explique pas la modification des seuils de perception des AGLC. D'autres pistes peuvent être envisagées, notamment l'inflammation bas-bruit observée au cours de l'obésité (Gregor and Hotamisligil, 2011) ainsi que des modifications du microbiote intestinal (Everard and Cani, 2013), que nous aborderons dans les résultats de cette thèse.

Cet état des lieux souligne l'importance d'intégrer l'ensemble des mécanismes, qu'ils soient périphériques ou centraux, quand on veut étudier le comportement alimentaire. L'épidémie actuelle d'obésité s'explique en partie par un déséquilibre de la balance énergétique, en raison, notamment, d'une attirance pour les aliments gras entraînant une surconsommation de lipides. Comprendre les mécanismes impliqués dans cette préférence pour les aliments gras semble donc essentielle. La détection orosensorielle des lipides est un évènement périphérique précoce impliqué dans la construction des choix alimentaires, dont les mécanismes ne sont pas encore totalement élucidés. Les travaux de cette thèse visent à explorer une partie de ces mécanismes ainsi que la relation entre leur dysfonctionnement et le risque d'obésité.

Problématique

Cette revue bibliographique pointe un certain nombre de questions concernant la détection orosensorielle des lipides. Parmi celles-ci, trois ont été abordées au cours de ce travail de thèse.

La première concerne le mécanisme même de la détection des AGLC par les cellules gustatives. Face au CD36, dont le rôle dans la détection gustative des lipides a été progressivement étayé par différentes équipes, un autre récepteur aux AGLC, le GPR120, a été identifié au niveau des papilles gustatives chez le rongeur et chez l'Homme. Le fait que deux récepteurs différents, activés par les mêmes molécules (AGLC), soient simultanément exprimés au niveau des cellules gustatives nous a amené à nous interroger sur leurs rôles respectifs. S'agit-il d'une redondance fonctionnelle ? Ceci serait inédit concernant la détection gustative et remettrait donc en cause l'idée émergente d'une 6^{ème} modalité gustative dédiée à la détection des lipides. Ou bien s'agit-il d'un système régulateur original ?

La deuxième question abordée concerne l'efficacité de la détection orosensorielle des lipides au cours de l'obésité. On sait en effet que l'obésité est souvent associée à un changement du comportement alimentaire se traduisant par une surconsommation d'aliments gras. L'usage de l'imagerie cérébrale a permis de montrer l'existence d'un dysfonctionnement de l'axe cortico-limbique responsable du circuit de la récompense, chez les personnes obèses. Or, les signaux gustatifs sont également intégrés au niveau du cerveau « émotionnel ». Ce constat suggère que la perception gustative pourrait être faussée au cours de l'obésité, entraînant une modification du comportement alimentaire et des choix associés. Cependant, ce changement comportemental peut aussi être la conséquence d'un défaut de fonctionnement périphérique au niveau des papilles gustatives. Nous nous sommes donc posé la question : quel est le lien entre l'obésité et la sensibilité de la détection orosensorielle des lipides chez la souris, et quels sont les mécanismes impliqués ?

La dernière question est directement liée à la deuxième : quelle est l'origine de ces modifications ?

Matériels & Méthodes : Introduction aux tests de comportement alimentaire

Partie I : Animaux, conditions de vie et régimes

Ce Matériels & Méthodes a pour vocation de présenter la démarche globale suivie pour les tests de comportement alimentaire sur les souris. Nous verrons dans un premier temps les modèles animaux utilisés, puis les méthodes détaillées des expériences de comportement.

Les souris, sur fond génétique C57Bl/6, sont élevées dans un environnement contrôlé (température $22\pm 1^\circ\text{C}$ et humidité 55-60%, cycle nuit de 19h à 7h). Les souris WT sont fournies par Charles River. Pour l'étude du rôle de GPR120 dans la détection orosensorielle des lipides, le Laboratoire a fait l'acquisition d'une lignée de souris GPR120 KO (sur fond génétique C57Bl/6), fournie par l'équipe de Gosoh Tsujimoto (Kyoto, Japon). L'inactivation du gène a été obtenue par recombinaison homologue entraînant le remplacement de l'exon 1 par une PGK-neo cassette ((Ichimura et al., 2012), figure 28). Les souris GPR120^{-/-} et les contrôles GPR120^{+/+} ont été générés localement par reproduction des animaux hétérozygotes. Le génotypage des animaux a été réalisé par PCR en utilisant la méthode de (Ichimura et al., 2012). Les souris utilisées pour les expériences sont de sexe masculin, sauf indication contraire.

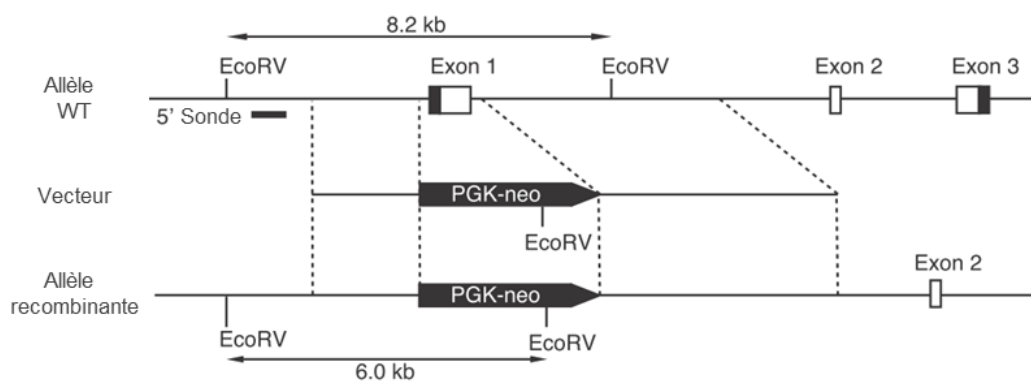


Figure 28 : Inactivation du gène GPR120 chez les souris.

(Ichimura et al., 2012).

Le vecteur a été construit par la ligation de 3 fragments : les fragments 5' et 3' recombinants et un fragment de la cassette LacZ-PGK-neo. Un fragment de 1.2 kpb de l'ADN contenant l'exon 1 a été remplacé par la cassette LacZ-PGK-neo. Le vecteur linéarisé a ensuite été introduit par électroporation dans des cellules souches embryonnaires 129/Sv.

Pour la plupart des expériences de comportement, les souris ont été placées en cages de vie conventionnelles individuelles, avec un accès à l'eau et à la nourriture illimité, sauf indication contraire. La nourriture standard (souris minces – STD) est constituée de croquettes de laboratoire 4RF21 (Mucedola, Italie).

Pour étudier l'obésité et ses conséquences, de nombreux modèles animaux existent. Certains sont basés sur des mutations ou des manipulations d'un ou plusieurs gènes (par exemple, les souris ob/ob sont un modèle d'obésité monogénique), d'autres sont génétiquement intacts mais leur environnement est obésogène (comme dans le cas d'un régime « cafétéria »), d'autres encore impliquent des manipulations

chirurgicales qui ont principalement pour cibles des régions de l'hypothalamus. Certains modèles incluent plusieurs aspects : les rats Sprague-Dawley sont par exemple un modèle d'obésité polygénique. Lorsque ces rats sont exposés à un régime dense en énergie, certains deviennent obèses (OP – *obesity prone*) et d'autres suivent une courbe de poids similaire à celle des contrôles en régime STD (OR – *obesity resistant*) (Lutz and Woods, 2012).

Les modèles d'obésité induite par un régime (DIO) sont considérés comme étant les plus représentatifs de l'obésité commune de l'Homme (Lutz and Woods, 2012). Un régime hyperlipidique permet d'induire rapidement une obésité chez le rongeur, d'une part par l'augmentation des calories ingérées due à la densité énergétique du régime, et d'autre part en réduisant les actions de la leptine et de l'insuline directement au niveau hypothalamique notamment. La composition en AG du régime joue un rôle majeur : les AGS ont des effets plus délétères que les AG insaturés (Hariri and Thibault, 2010; Lutz and Woods, 2012).

Pour nos travaux, nous avons rendu des souris obèses (souris *high-fat* – HF), grâce à un régime riche en AGS, réalisé à partir de croquettes 4RF25 (Mucedola, Italie) auxquelles sont ajoutés de l'huile de palme et du cholestérol (voir composition des régimes STD et HF tableau 3).

Tableau 3 : Composition des principaux régimes utilisés.

Pour 100g de croquettes		Régime standard (4RF21 Mucedola)	Régime <i>high-fat</i> (4RF25 Mucedola + Huile de Palme)
Protéines		18.5g	15g
Glucides (amidon)		53.5g	34.4g
Fibres		6g	3.1g
Lipides		3g	34.2g
	Huile de soja	3g	2.4g
	Huile de palme	-	31.8g
	Cholestérol	-	0.03g
<i>dont</i>	<i>acides gras saturés</i>	0.6g	16.4g
	<i>acides gras mono-insaturés</i>	0.7g	12.6g
	<i>acides gras poly-insaturés</i>	1.7g	5g
Energie		330 kcal	514 kcal

L'étude de la composition corporelle des animaux (masse grasse et masse maigre) a été effectuée à l'aide d'un spectroscope en résonance magnétique nucléaire (EchoMRI™ 500T Body Composition Analyzer).

Partie II : Présentation des méthodes utilisées pour l'étude du comportement alimentaire

La compréhension du comportement alimentaire doit intégrer les paramètres intrinsèques des aliments : aspect visuel, odeur, texture, saveurs, arômes, qui vont influencer le comportement alimentaire de l'animal (attraction/avidité, préférence ou aversion notamment). Les travaux du Laboratoire s'intéressent au comportement des souris par rapport au paramètre « saveur » des aliments ; les méthodes utilisées et les substances testées sont choisies de manière à limiter l'influence des autres paramètres.

Le Laboratoire possède un plateau technique qui permet un phénotypage global des souris. Du point de vue du comportement alimentaire, plusieurs approches sont utilisées, avec des objectifs complémentaires et des mises en œuvre variées. Il est nécessaire de comprendre dans quels cas ces différentes méthodes sont utilisées avant d'aborder les résultats de nos travaux. Le tableau 5 page 92 récapitule les principaux avantages et inconvénients de chaque méthode.

II.1. Tests de double-choix long terme

Les tests de double-choix sont utilisés en routine au Laboratoire car ils sont simples, rapides à mettre en œuvre et apportent une réponse de préférence alimentaire globale. Ils consistent à proposer deux choix de boisson à la souris : une solution test et une solution contrôle. La consommation de chaque solution est mesurée par pesée des biberons afin de déterminer quelle est la solution préférée. Le résultat est donc une quantité de liquide consommé, que l'on peut exprimer en pourcentage de consommation de la solution test, rapporté à la consommation totale des 2 solutions. Ainsi, si le résultat est $> 50\%$, on parle de préférence et si le résultat est $< 50\%$, on parle d'aversion pour la solution test. Les solutions contrôles sont constituées de gomme de xanthane (XG) 0.3% et les solutions tests sont préparées dans cette même solution ce qui permet de minimiser les différences de texture, notamment pour les solutions lipidiques. Il est à noter que les quantités de liquide perdues par l'écoulement naturel des biberons ont été mesurées et sont considérées comme négligeables.

Les souris sont placées individuellement dans des cages conventionnelles. Le biberon d'eau de boisson est retiré pour toute la durée du test ainsi que, pour la plupart des tests, la nourriture. En effet, des mises au point effectuées sur des souris minces et obèses ont montré que les tests réalisés à jeun permettent une plus grande discrimination entre les réponses des deux groupes de souris que les tests effectués en présence de croquettes STD ou HF.

Concernant la durée du test, elle est généralement de 48h dans la littérature (Cartoni et al., 2010; Sclafani et al., 2013), avec inversion de la position des biberons (droite-gauche) au bout de 24h pour éviter le développement d'une préférence de place. Au laboratoire, nous privilégions les tests de 12h sur la période de nuit. En effet, l'essentiel de la consommation de la souris s'effectuant sur cette période, les résultats sont similaires entre un test effectué sur 12h la nuit et un test effectué sur 24h ou 48h. Enfin, pour certaines substances oxydables comme par exemple le LA, il est important de limiter la durée du test (ou de changer régulièrement la solution).

Pour un même test, la position droite-gauche des biberons est randomisée pour l'ensemble des cages, et la position des biberons pour une même souris est inversée d'un test à l'autre afin d'éviter l'apparition d'une préférence de place (Yoneda et al., 2007a). Les souris étant à jeun de nourriture pendant la durée du test, un délai de 48h de repos est observé entre deux tests successifs.

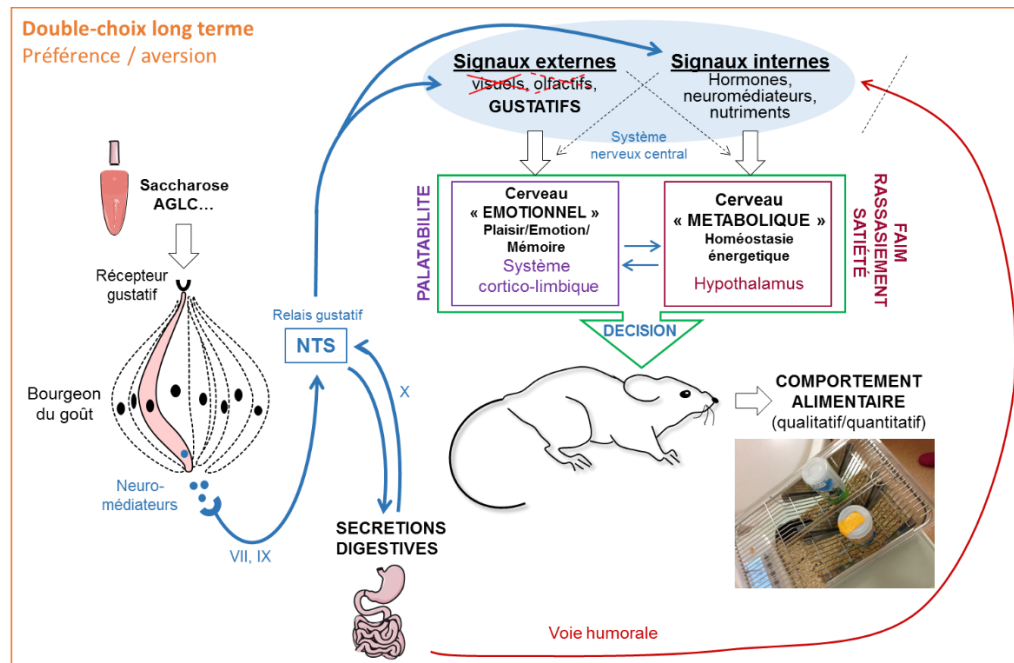


Figure 29 : Circuit conduisant au comportement alimentaire lors de tests de double-choix long-terme.

D'après P. Besnard.

VII : Chorde du tympan ; IX : nerf glossopharyngien ; X : nerf vague ; NTS : noyau du tractus solitaire.

Les principaux avantages de ces tests sont leur simplicité d'exécution et le fait qu'ils ne nécessitent pas d'appareillage complexe. Les souris restent dans leur cage de vie, ce qui limite le stress causé. En revanche, ces tests ayant lieu sur le long terme (12h), ils reflètent non seulement les préférences orales, mais également les signaux post-ingestifs et post-absorptifs (figure 29) ce qui, suivant la question posée, peut constituer un inconvénient majeur. Il faut donc considérer ces tests comme une approche globale qui constitue une première étape dans la compréhension des phénomènes de comportement alimentaire liés à la détection orale des lipides.

II.2. Licking tests court terme

II.2.1. Lickomètres en simple choix

Les lickomètres permettent de mesurer en temps réel le nombre de lapées que donne une souris sur un biberon. Ces tests sont basés sur le fait que plus la solution est attractive pour la souris, plus celle-ci va laper rapidement ; ils mesurent donc l'avidité de la souris pour la solution ou encore la palatabilité de la solution (paramètre *liking*). Les lickomètres (figure 30) sont des cages dont le sol, constitué d'une grille métallique, et le biberon sont reliés par un dispositif électrique à très faible ampérage ($<1\mu\text{A}$). A chaque coup de langue donné sur le biberon, la souris boucle le circuit électrique (de manière indétectable pour l'animal) et un signal est comptabilisé par un ordinateur. Ce système permet de comptabiliser les lapées sur une courte période (généralement 1 à 10 min), ce qui permet de limiter, voire de s'affranchir, des effets post-ingestifs.

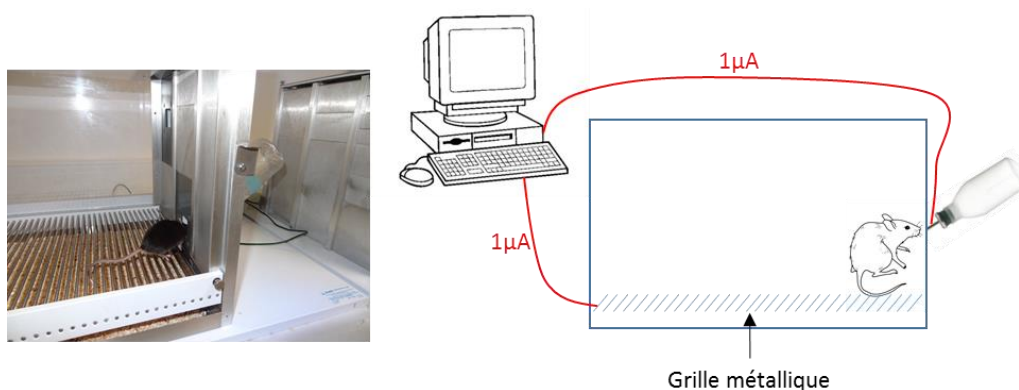


Figure 30 : Photo et schéma d'une cage de lickomètre.

Les biberons test et contrôle sont présentés successivement à la souris, dans un ordre aléatoire, il s'agit donc de tests en simple choix. Les solutions sont préparées dans de la paraffine pour éliminer les différences de texture entre les deux solutions (solution contrôle = paraffine pure).

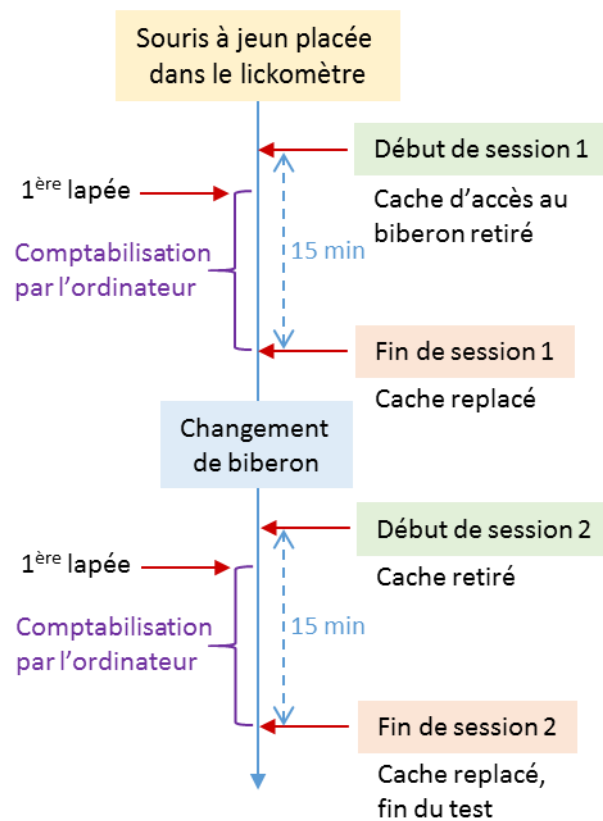
Test de licking :

Figure 31 : Procédure utilisée pour un test en lickomètre.

Les souris sont mises à jeun d'eau et de nourriture pendant 6h, puis elles sont placées dans les cages de lickomètres avant le démarrage du test (un cache empêche l'accès au biberon), qui a lieu lors du cycle de nuit, période d'activité de la souris. Le cache est ensuite retiré et l'ordinateur démarre le comptage dès le 1^{er} coup de langue donné sur le biberon. Une session dure environ 15 min ; on considère en effet que la majorité des souris va commencer à boire dans les 5 premières minutes, ainsi l'ordinateur pourra intégrer le nombre de lapées pendant au moins 10 min. Au bout de 15 min, le cache est replacé et la 1^{ère} session est arrêtée. Le biberon est remplacé et la 2^{ème} session démarre (figure 31). L'ordre des biberons test et contrôle entre les 2 sessions est randomisé pour l'ensemble des souris, et l'ordre des biberons pour une même souris est inversé d'un test à l'autre (voir tableau 4). Un délai de 48h de repos est observé entre 2 tests successifs.

Tableau 4 : Exemple d'enchaînement des sessions et d'ordre des biberons pour deux souris en lickomètres.

		Souris A	Souris B	Durée
		Privation hydrique et alimentaire		6h
Test 1	Session 1	Biberon Contrôle	Biberon Test	15 min
	Session 2	Biberon Test	Biberon Contrôle	15 min
		Repos		48h
		Privation hydrique et alimentaire		6h
Test 2	Session 1	Biberon Test	Biberon Contrôle	15 min
	Session 2	Biberon Contrôle	Biberon Test	15 min

Ces expériences nécessitent une période d'acclimatation/apprentissage qui a pour but de diminuer la néophobie contextuelle (environnement métallique de la cage, bruit, manipulateur, etc.) et d'apprendre aux souris le déroulement des tests (2 biberons successifs différents, il faut donc les conditionner à boire pendant les 2 sessions). Cette période dure une dizaine de jours, avec différentes séances d'entraînement lors desquelles les souris sont placées dans les conditions des tests, avec changement des biberons entre les 2 sessions. Lors des 1^{ères} séances d'entraînement, les souris ont accès à de l'eau, puis à une substance appétente (sucrose), puis à la paraffine. A l'issue des entraînements, seules sont gardées pour les tests les souris qui répondent aux critères définis pour chaque expérience (par exemple, nombre de lapées > 300 en 10 min).

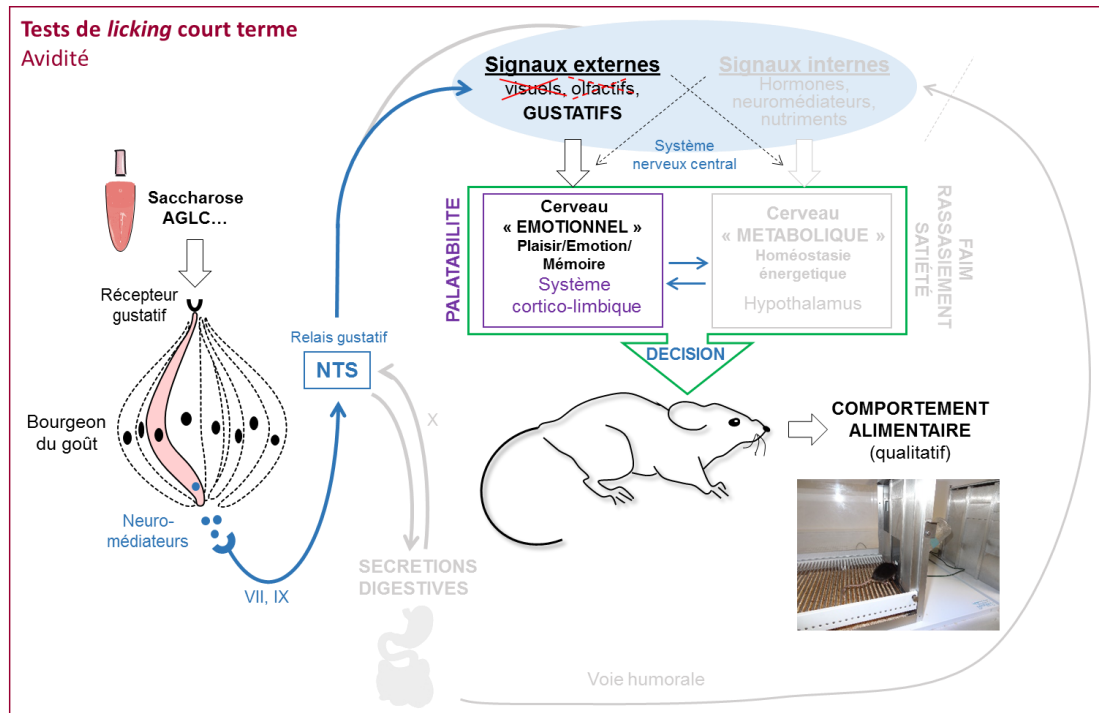


Figure 32 : Circuit conduisant au comportement alimentaire lors de tests de licking court terme.

D'après P. Besnard.

VII : Chorde du tympan ; IX : nerf glossopharyngien ; X : nerf vague ; NTS : noyau du tractus solitaire.

L'avantage majeur de ce dispositif est la précision de la mesure sur une très courte période, qui permet de limiter fortement les effets post-ingestifs (figure 32). Les inconvénients sont – en plus de la longue période d'entraînement des souris – le stress occasionné et la nécessité d'effectuer une privation alimentaire et hydrique, ainsi que le travail en cycle nuit.

II.2.2. Gustomètres

Les double-choix et les lickomètres présentent chacun leurs avantages et inconvénients, mais tous deux ne permettent de tester qu'une solution à la fois. Lorsqu'il s'agit d'établir des seuils de détection (figure 33), ou des corrélations entre l'attractivité d'une solution et sa concentration, la méthode la plus adaptée est celle des gustomètres. Ils sont basés sur le même principe que les lickomètres (mesure du nombre de coups de langue par un ordinateur), mais avec l'avantage de pouvoir tester plusieurs solutions dans une même session et sur des fenêtres de temps très courtes. Il existe différents types d'appareillages de gustomètres. Celui utilisé au cours de cette thèse permet de tester 5 solutions. Le système a nécessité une mise au point importante, basée sur les travaux de (Glendinning et al., 2002) et est en cours de brevetage. Pour cette raison, le principe de la méthode ainsi que le protocole utilisé ne sont pas détaillés dans ce manuscrit.

Les avantages majeurs de ces appareils sont encore une fois la précision de la mesure sur une très courte période, mais aussi la possibilité de tester plusieurs concentrations d'une solution dans une même

session. De plus, le conditionnement est tel que les tests peuvent s'effectuer de jour, ce qui évite une inversion de cycle ou un travail de nuit. Cependant, les souris sont soumises à un stress et surtout à une privation très longue d'eau et de nourriture, qui n'est pas sans conséquence sur leur masse corporelle et nécessite la définition d'un point limite (qui n'a jamais été atteint lors de nos expériences) : si une souris perd plus de 20% de sa masse corporelle, elle est éliminée de l'expérience.

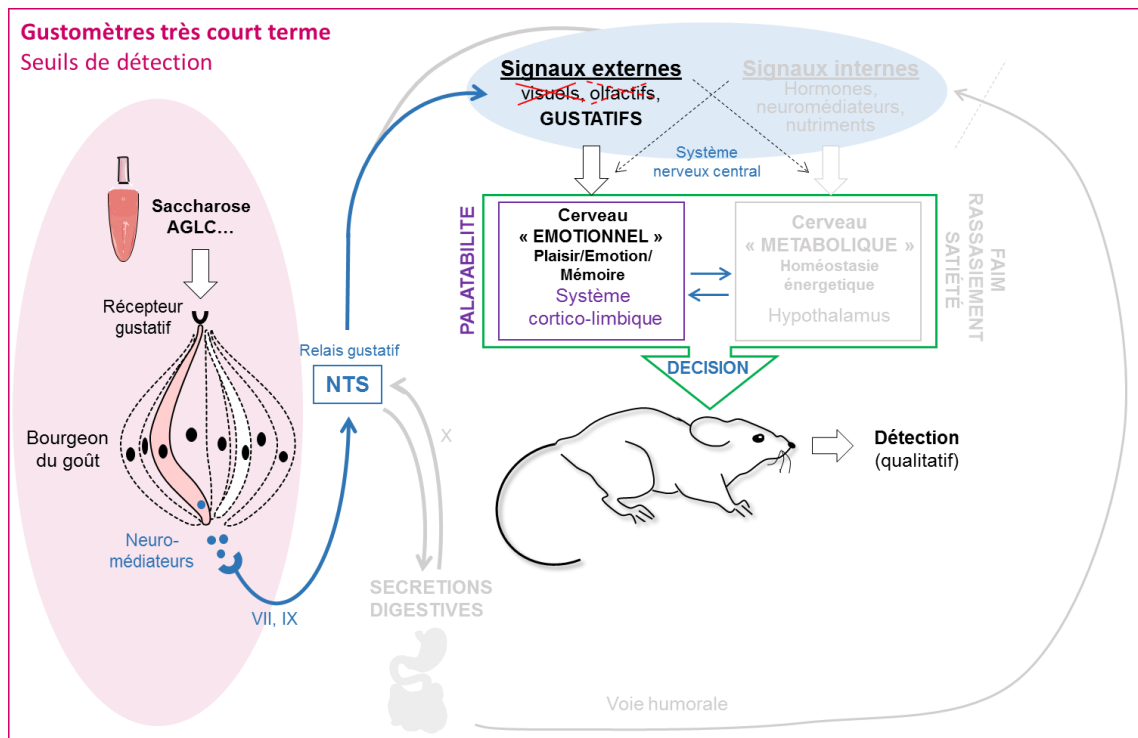


Figure 33 : Circuit conduisant à la détection des saveurs lors de tests de gustomètres.

D'après P. Besnard.

VII : Chorde du tympan ; IX : nerf glossopharyngien ; X : nerf vague ; NTS : noyau du tractus solitaire.

II.3. Tests d'aversion gustative conditionnée

Pour leur survie, les animaux doivent différencier les aliments sains des aliments toxiques. De manière innée, ils vont par exemple consommer préférentiellement les aliments sucrés (riches en calories), et éviter les aliments amers (souvent toxiques). Mais cette capacité à éviter certains saveurs peut être acquise par un conditionnement pavlovien : c'est le cas de l'aversion gustative conditionnée (CTA). Ces tests constituent une toute autre approche dans l'étude de la capacité de détection d'une saveur. Ils se basent sur un phénomène d'apprentissage appelé « bait-shyness » (Barnett, 1963) : devant une nourriture nouvelle, les rats sauvages ont un comportement de méfiance (réponse néophobique). Ils vont consommer un échantillon de la nourriture, et évaluer ses effets sur l'organisme. Si la nourriture est toxique et les rend malade, ceux qui survivent vont par la suite éviter cette nourriture. L'expérience antérieure avec un aliment permet donc d'associer ses caractéristiques orosensorielle avec ses effets

post-ingestifs. Si ceux-ci ont entraîné une expérience négative (malaise gastrique par exemple), ils peuvent conduire à une aversion pour l'aliment en question. Il s'agit ici du phénomène de *learning*. Dans le cadre des CTA, les souris sont rendues aversives envers une substance (stimulus conditionné – CS) en faisant suivre la présentation de celle-ci par un malaise gastrique, provoqué par une injection de Chlorure de Lithium (stimulus inconditionné – UCS). L'aversion est ensuite vérifiée par un test de double-choix. L'aversion est acquise même après un seul couplage entre le CS et l'UCS. L'intervalle entre le CS et l'UCS peut être supérieur à 1h (Dragoin et al., 1973; Galindo et al., 2012a), mais la probabilité de créer une aversion diminue lorsque l'intervalle entre le CS et l'UCS augmente ; ainsi, il est préférable de ne pas dépasser 2h. La seule condition nécessaire pour une aversion durable au goût est la stimulation des récepteurs gustatifs suivie par un UCS qui affecte directement le tractus gastro-intestinal ou ses fibres afférentes (Galindo et al., 2012a; Garcia et al., 1974). Ainsi, si une substance à tester (dans notre cas, le LA) est capable de rendre une souris aversive, on peut en déduire que cette substance est détectée gustativement par l'animal. Des aversions conditionnées au LA ont déjà été réalisées avec succès chez le rat (McCormack et al., 2006) et la souris (Gaillard et al., 2008).

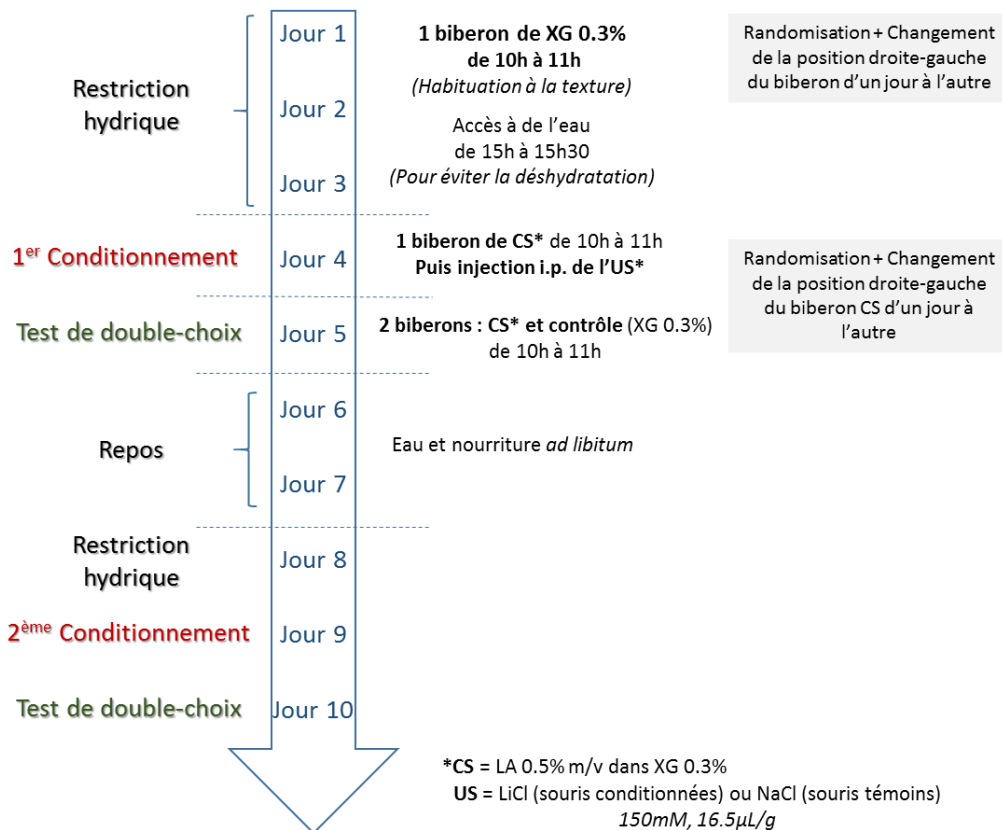


Figure 34 : Procédure utilisée pour le test d'aversion gustative conditionnée (CTA).

CS : stimulus conditionné ; LA : acide linoléique ; LiCl : chlorure de lithium ; NaCl : chlorure de sodium ; US : stimulus inconditionné ; XG : gomme de xanthane.

Les souris sont d'abord entraînées à boire pendant une courte période grâce à une restriction hydrique (voir figure 34). Le jour du conditionnement, la substance à tester (dans notre cas, CS = LA 0.5% m/v dans de la gomme de xanthane 0.3%) est présentée à la souris, puis une injection intrapéritonéale de LiCl 150mM (16.5µL/g (Gaillard et al., 2008)) est réalisée. Les souris témoins reçoivent une injection de NaCl isotonique. L'aversion est observée le lendemain du conditionnement par un test de double-choix entre le CS et une solution contrôle. Si l'aversion n'est pas suffisamment importante, un 2^{ème} conditionnement est réalisé (après une période de repos).

Cette méthode permet de confirmer la capacité de l'animal à détecter une substance : elle est complémentaire au double-choix classique. Cependant, elle entraîne un stress très important du fait de l'induction d'un malaise gastrique. De plus, suite à ce conditionnement, les souris ne peuvent plus être utilisées pour d'autres expériences de comportement puisque l'aversion peut perdurer plusieurs semaines après le conditionnement (Barry, Larson et al. 1993).

II.4. Choix des lipides et véhicules utilisés pour les tests

Même si les lipides alimentaires sont majoritairement constitués de TG, les AGLC sont responsables de la préférence spontanée pour les lipides (Fukuwatari et al., 2003; Tsuruta et al., 1999). Chez les rongeurs, la lipase linguale est en effet très efficace pour libérer les AGLC à partir des TG (Kawai and Fushiki, 2003). Pour étudier la réponse gustative à la saveur des lipides, plusieurs AG sont utilisés au Laboratoire : le LA (acide linoléique, L1376, Sigma et W338001, Aldrich) majoritairement (Laugerette et al., 2005), mais également l'OLA (acide oléique, O1008, Sigma-Aldrich) et l'ALA (l'acide α -linoléique, L2376, Sigma-Aldrich). Les rats montrent une préférence marquée pour ces 3 AG en comparaison de solutions contrôles lors de double-choix de 5 min, dans l'ordre : ALA > LA > OLA (Tsuruta et al., 1999). Il est à noter que ces AG sont très oxydables (voir encart n°3), il est donc nécessaire de prendre certaines précautions lors de la préparation des solutions (conservation des solutions mères à -20°C, agitation sous azote etc.).

Cependant, pour une réponse plus globale et plus proche de ce qui est retrouvé dans l'alimentation humaine, l'huile alimentaire s'avère très intéressante à étudier, et permet de s'affranchir – dans une certaine mesure – des problèmes d'oxydation. L'huile de colza (Fleur de colza, Lesieur) a été choisie pour sa composition : ses TG contiennent une grande variété d'AG, avec notamment 54% d'OLA (AGMI), 18% de LA (AGPI de la famille des ω 6), 8% d'ALA (AGPI de la famille des ω 3). D'autre part, cette huile est désarômatisée, ce qui permet de limiter les influences olfactives.

Dans les deux cas, le véhicule utilisé doit permettre une bonne suspension des lipides, qui ne sont pas solubles dans l'eau (encart n°3). La paraffine est de ce point de vue assez efficace, mais présente certains inconvénients. Tout d'abord, elle ne contient pas d'eau ; la gomme de xanthane (0.3% m/V dans

l'eau) est donc privilégiée lors de tests long terme comme les double-choix. De plus, la paraffine est très palatable, elle peut donc parfois interférer avec la réponse aux lipides ; c'est le cas pour les gustomètres où l'utilisation de la paraffine pour suspendre le LA empêche une bonne discrimination de la réponse des souris en fonction des différentes concentrations.

Pour s'affranchir de l'utilisation d'un véhicule spécifique, il est également possible d'utiliser de l'Intralipide (Fresenius Kabi AB, Suède) (Sclafani et al., 2013), qui est une émulsion stable de lipides (sous forme de triglycérides) composée d'huile de soja, de phospholipides et de glycérine. L'IL peut se diluer dans l'eau directement, cependant il est à noter qu'il possède une forte odeur caractéristique ; nous avons utilisé cette solution pour certains double-choix.

Encart n°3 : Quelques propriétés physico-chimiques des acides gras

Le point de fusion :

Il détermine l'état physique (solide ou liquide) des AG. Le point de fusion des AG augmente en fonction de la longueur de chaîne. Pour une longueur de chaîne donnée, la température de fusion diminue avec le nombre de double-liaisons. Les isomères *trans* ont un point de fusion plus élevé que les *cis*.


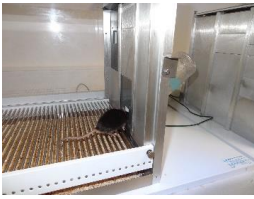
La solubilité :

Les AG sont amphiphiles. Ils sont solubles dans des solvants organiques, mais seuls les AG à très courte chaîne (C4, C6) sont solubles dans l'eau. Les AG à chaîne plus longue peuvent être émulsionnés dans l'eau (sous forme de micelles).

L'auto-oxydation :

C'est ce qu'on appelle le rancissement : au contact de l'air, les AG sont oxydés et forment de l'acide butyrique et des radicaux peroxydes ; puis, par rupture de la chaîne carbonée, des composés volatils (aldéhydes ou cétones), responsables de l'odeur de « rance ». L'attaque de l'oxygène s'effectue au niveau des double-liaisons, l'ALA sera donc plus sensible à l'oxydation que l'OLA par exemple.

Tableau 5 : Avantages et inconvénients des tests comportementaux utilisés.

Tests	Double-choix	CTA	Lickomètres	Gustomètres
Appareillage	 2 biberons, cages conventionnelles, test long-terme		 1 biberon, test court-terme	5 biberons, test court-terme
Résultat	Préférence	Aversion	Avidité/Attraction	Seuil de détection
Avantages	<ul style="list-style-type: none"> - Simple, rapide à mettre en place, peu couteux - Peu stressant - Respect du cycle de lumière 	<ul style="list-style-type: none"> - Simple et peu couteux - Apporte une réponse complémentaire aux double-choix - Respect du cycle de lumière 	<ul style="list-style-type: none"> - Mesure précise qui peut exclure le post-ingestif - Utilisation de la paraffine 	<ul style="list-style-type: none"> - Mesure précise qui exclue le post-ingestif - Permet de tester plusieurs solutions par expérience - Respect du cycle de lumière
Inconvénients	<ul style="list-style-type: none"> - Réponse globale (Intégration des signaux oraux et post-ingestifs) - Utilisation de la gomme de xanthane (moins bon texturant que la paraffine) - Mesure peu sensible - Privation de nourriture pendant le test 	<ul style="list-style-type: none"> - Réponse globale (Intégration des signaux oraux et post-ingestifs) - Très stressant pour l'animal - Nécessite un conditionnement - Utilisation de la gomme de xanthane - Mesure peu sensible - Privation de nourriture pendant le test 	<ul style="list-style-type: none"> - Appareillage complexe et couteux - Environnement stressant, nécessité d'une habituation - Nécessité d'un apprentissage du déroulement du test - Privation hydrique de 6h - Une seule solution testée à la fois - Inversion du cycle de lumière ou expériences de nuit - Analyse complexe des résultats du logiciel 	<ul style="list-style-type: none"> - Appareillage complexe et couteux - Nécessité d'une mise au point - Environnement stressant, nécessité d'une habituation - Nécessité d'un apprentissage (assez court) du déroulement du test - Privation d'eau et de nourriture très longue - Analyse complexe des résultats du logiciel - Paraffine pas utilisée car trop palatable

II.5. Analyses statistiques

Les logiciels GraphPad Prism et Excel ont été utilisés pour les analyses statistiques. La normalité et l'homoscédasticité des valeurs ont été vérifiées, après élimination des valeurs aberrantes si nécessaire. Si les valeurs étaient normales et les variances égales, des tests paramétriques (test t ou ANOVA en fonction du nombre de groupes) ont été appliqués ($P < 0.05$). Dans le cas contraire, des tests non-paramétriques (test de Mann-Whitney ou Kruskal-Wallis) ont été appliqués ($P < 0.05$). Pour certains résultats de double-choix, des tests t par rapport à la valeur arbitraire de 50% de préférence ont été réalisés. Enfin, des corrélations de Pearson après régression linéaire ont également été utilisées. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM. Les étoiles indiquent le degré de significativité entre deux groupes statistiquement différents : * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$. Les lettres indiquent si des groupes sont différents ou non : deux groupes portant la même lettre ne sont pas différents.

Résultats

Partie I : Le récepteur GPR120 joue-t-il un rôle dans la détection orosensorielle des lipides ?

I.1. Introduction

Des quatre récepteurs candidats à la détection orosensorielle des lipides (CD36, GPR40, GPR120 et les canaux DRK), seuls le CD36 et le GPR120 semblent impliqués directement dans cette fonction au niveau des papilles gustatives. Tous deux sont présents dans les bourgeons du goût chez la souris (Cartoni et al., 2010; Laugerette et al., 2005; Matsumura et al., 2009), le rat (Fukuwatari et al., 1997; Matsumura et al., 2007) et l'Homme (Galindo et al., 2012b; Simons et al., 2011). Le CD36 possède clairement une fonction de récepteur aux AGLC, capable d'induire une information médiée par le système gustatif, chez le rongeur et chez l'Homme (Gaillard et al., 2008; Laugerette et al., 2005; Pepino et al., 2012). Concernant le GPR120, une seule étude datant de 2010 (Cartoni et al., 2010) attribue à ce récepteur un caractère indispensable pour la détection des AGLC chez la souris.

Chez l'Homme, le profil d'activation pharmacologique du GPR120 humain (transfecté dans des cellules HEK 2093T) correspond à la sensation de « gras » décrite chez les sujets (Galindo et al., 2012b), mais aucune étude n'a montré de lien direct entre la sensation de « gras » et le GPR120 *in vivo*.

Il est vrai cependant qu'en tant que membre de la famille des GPCR, l'hypothèse d'un rôle du GPR120 dans la détection gustative des lipides est séduisante. En effet, les récepteurs T1Rs et T2Rs, impliqués dans les saveurs sucré, amer et umami font également partie de cette famille. Mais se pose alors la question des rôles respectifs du CD36 et du GPR120 car la détection d'une même catégorie de molécules (AGLC) par 2 récepteurs différents semble surprenante en regard de ce qui est connu pour les autres saveurs (Chandrashekar et al., 2006). De plus, les régulations différentes de ces deux récepteurs dans les papilles gustatives (Martin et al., 2011b; Ozdener et al., 2014) suggèrent des rôles distincts. Trois scénarios sont proposés pour expliquer la présence de ces deux récepteurs aux AGLC dans les bourgeons du goût (figure 35).

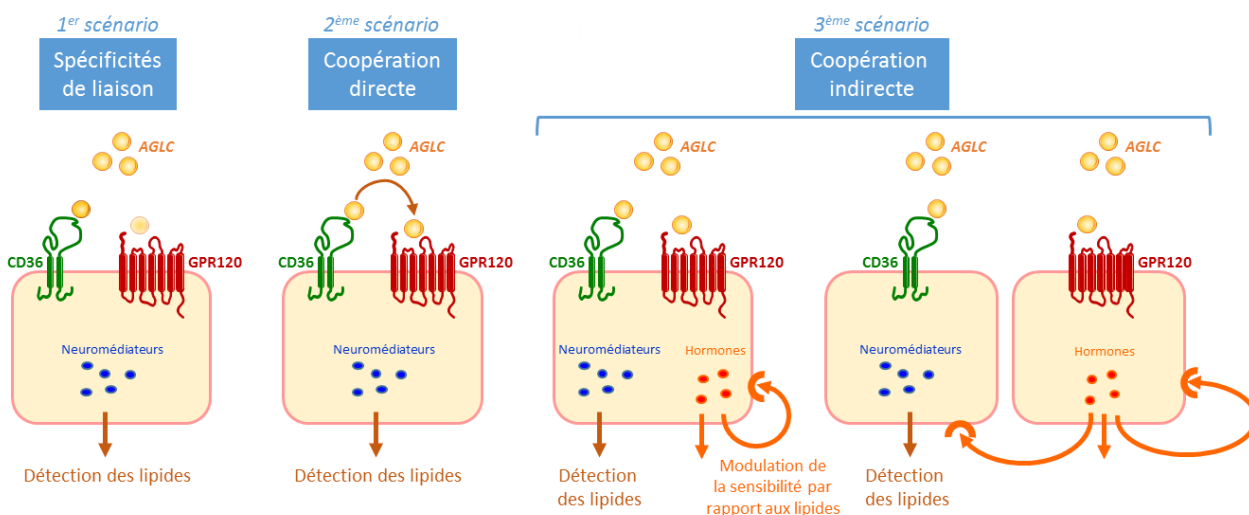


Figure 35 : Scénarios pouvant expliquer la présence concomitante de CD36 et GPR120 dans les bourgeons du goût.

AGLC : acides gras à longue chaîne.

- 1^{er} scénario : Spécificités de liaison de chaque récepteur

Dans ce scénario, chaque récepteur aurait la capacité de lier des AGLC spécifiques. Or, le CD36 lie les AG ≥ 16 carbones (Baillie et al., 1996), et le GPR120 lie les AG ≥ 14 carbones (Hirasawa et al., 2005; Wellendorph et al., 2009) ; il n'y a pas de différence claire entre les deux récepteurs. Cette hypothèse est donc peu plausible.

- 2^{ème} scénario : Coopération directe entre le CD36 et le GPR120

Le CD36 montre une affinité plus élevée pour les AGLC (nM) que le GPR120 (μ M) (Baillie et al., 1996; Hirasawa et al., 2005). Gilbertson et coll. ont proposé un modèle théorique dans lequel le CD36 lierait les AGLC trouvés dans la salive pendant un repas, ce qui activerait le GPR120 qui induirait une cascade de signalisation cellulaire (Gilbertson et al., 2010). Ce scénario est cohérent avec des travaux montrant que le SNMP, un récepteur homologue au CD36 chez la drosophile, agit en tant que cofacteur pour les récepteurs olfactifs (OR67d/OR83b) en transférant la phéromone cis-vaccenyl acetate (de type lipide) à la surface des cils des neurones sensoriels olfactifs (Benton et al., 2007). Cette hypothèse implique une colocalisation de CD36 et GPR120 dans les cellules gustatives. Elle est cohérente avec la perte de préférence pour les lipides trouvée à la fois chez les souris CD36^{-/-} (Laugerette et al., 2005) et GPR120^{-/-} (Cartoni et al., 2010).

- 3^{ème} scénario : Coopération indirecte entre le CD36 et le GPR120

Dans ce scénario, le CD36 et le GPR120 auraient des fonctions distinctes mais complémentaires. Le CD36 serait responsable, *via* sa liaison avec les lipides, du relargage de neurotransmetteurs par les cellules gustatives. Il serait ensuite régulé négativement par le GLP-1, lui-même sécrété après l'activation du GPR120 par les AGLC (Martin et al., 2012). Cette boucle de régulation qui a pour cible le CD36 pourrait

moduler la motivation pour les lipides durant un repas, d’abord élevée puis diminuant progressivement après la prise de lipides (ce qui rappelle le phénomène de satiété sensorielle spécifique) (Martin et al., 2011b). Cette hypothèse soulève également la question des localisations respectives du CD36 et du GPR120 dans les bourgeons du goût, car l’action du GLP-1 pourrait se faire soit de manière autocrine, soit paracrine.

En accord avec le 2^{ème} scénario, une co-expression du GPR120 avec le CD36 a été montrée dans des cellules issues de papilles caliciformes chez la souris (Martin et al., 2011b). Cependant, cette colocalisation n’a pas été quantifiée et il semble important de savoir si ces deux récepteurs sont présents systématiquement ou non dans les même cellules gustatives afin d’avoir un début de réponse quant aux hypothèses formulées sur leurs rôles respectifs. Dans cet objectif, un plug-in pour le logiciel Visilog a été développé en collaboration avec l’INRA de Dijon. La mise au point a été effectuée sur des coupes de papilles caliciformes ($\approx 10\mu\text{M}$ d’épaisseur), immuno-marquées pour le CD36 (AF2519, R&D system) et le GPR120 (LS-A2004, MBL) (figure 36) et observée au microscope confocal qui permet une analyse du volume total approximatif de la coupe grâce à sa division en sections optiques ($\approx 0.33\mu\text{m}$ d’épaisseur).

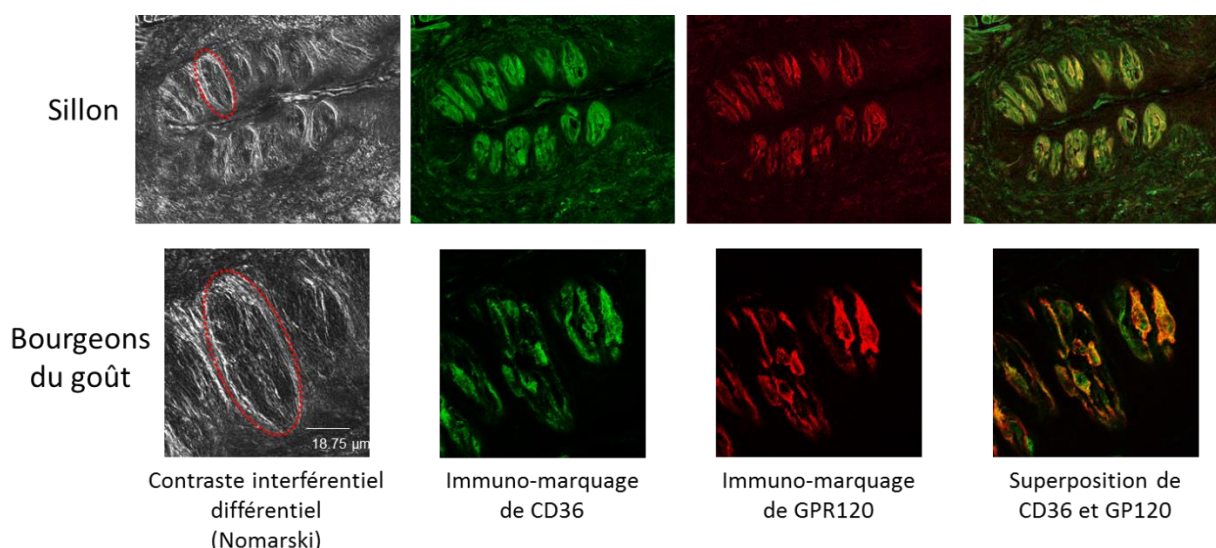


Figure 36 : Coupe de papille caliciforme observée au microscope confocal.

Un des bourgeons du goût est entouré de pointillés rouge.

A l’aide du logiciel, les contours des bourgeons du goût sont réalisés sur une des sections optiques (figure 37), puis le logiciel reproduit le calque sur toutes les sections optiques de la coupe, pour chacune des deux protéines. Il quantifie ensuite, grâce aux coordonnées de chaque pixel, le volume de fluorescence (en μm^3) – connaissant l’épaisseur de la section – par rapport au volume analysé (délimité par les contours des bourgeons du goût).

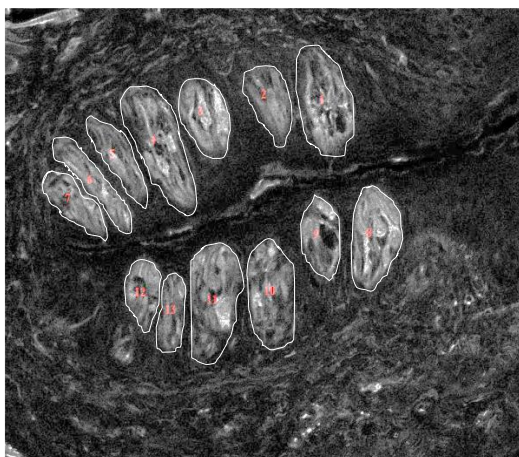


Figure 37 : Contours des bourgeons du goût effectué sur le logiciel Visilog.

Ainsi, trois résultats sont obtenus : le volume de fluorescence du CD36, le volume de fluorescence du GPR120 et le volume de co-marquage des deux protéines. En additionnant les résultats de toutes les sections optiques, le volume de co-marquage dans les bourgeons du goût pour la section entière de la papille peut être estimé (Figure 38).

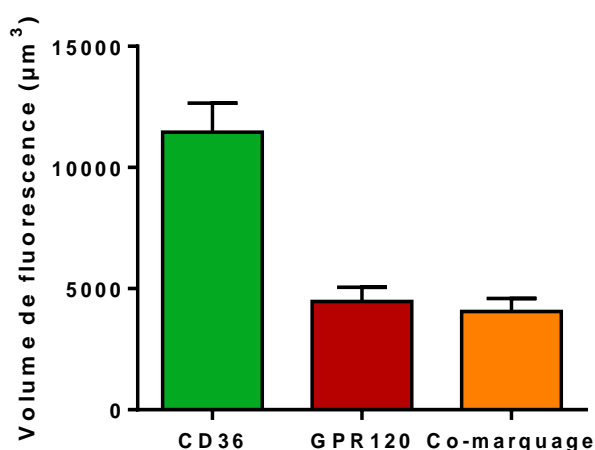


Figure 38 : Volumes de fluorescence de chaque protéine et volume de co-marquage.

L'analyse a été réalisée sur 13 bourgeons du goût d'une coupe de papille caliciforme de 10µm d'épaisseur d'une souris C57Bl6J.

D'après la figure 39, le pourcentage de CD36 non co-marqué avec GPR120 est près de 6 fois plus élevé que le pourcentage de GPR120 non co-marqué avec CD36. Autrement dit, le GPR120 est presque systématiquement colocalisé avec le CD36 dans les bourgeons du goût, alors qu'une grande partie du CD36 est trouvé seul.

Cette méthode de quantification du volume de marquage assistée par un logiciel est très utile pour la comparaison de l'expression et de la localisation de différentes protéines (l'analyse est possible sur plusieurs protéines, du moment que les couleurs d'émissions sont différentes), au niveau d'entités

physiologiques telles que les bourgeons du goût. Ces premiers résultats sont cependant à prendre avec précaution car l'analyse, qui prend beaucoup de temps, n'a été effectuée jusqu'à présent que sur une seule coupe de papille caliciforme. La principale interprétation de ces résultats est que le CD36 semble majoritaire par rapport au GPR120 dans les bourgeons du goût des papilles caliciformes. Pourtant, dans les papilles fongiformes humaines, toutes les cellules gustatives exprimant le CD36 expriment également le GPR120 (Ozdener et al., 2014). Il ne s'agit ni des mêmes espèces (souris vs. humain), ni des mêmes papilles (caliciformes vs. fongiformes), ni de la même méthode d'analyse (observation visuelle vs. analyse informatique), ce qui pourrait expliquer les différentes interprétations. Pour aller plus loin, l'analyse devra être réalisée sur la totalité de l'épaisseur de la papille gustative, et également à l'échelle de la cellule.

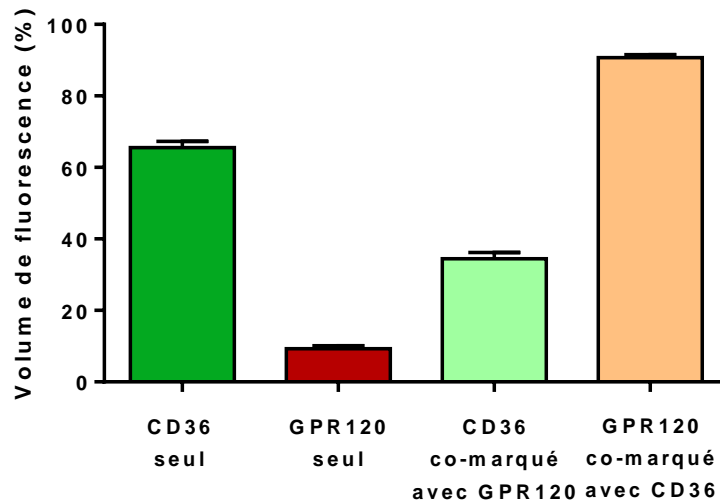


Figure 39 : Pourcentages de volumes de fluorescence de chaque protéine seule, et pourcentages de volume de fluorescence de chaque protéine co-marquée avec l'autre.

L'analyse a été réalisée sur 13 bourgeons du goût d'une coupe de papille caliciforme de 10µm d'épaisseur d'une souris C57Bl6J.

Quoi qu'il en soit, on peut affirmer que certaines cellules de type II expriment simultanément le CD36 et le GPR120, ce qui est cohérent avec les 2^{ème} et 3^{ème} hypothèses qui postulent que les deux récepteurs pourraient avoir des fonctions distinctes dans l'épithélium gustatif, tout en coopérant de manière plus ou moins directe.

I.2. Le GPR120 est-il indispensable pour la détection orosensorielle des lipides alimentaires chez la souris ?

Partant du constat que les données de la littérature sur l'intérêt physiologique d'une co-expression du CD36 et du GPR120 dans les papilles gustatives ne sont pas claires, et pour tenter de trancher entre les hypothèses de coopération directe ou indirecte, nous avons décidé de déterminer plus précisément la fonction du GPR120 au niveau des papilles gustatives chez la souris. Pour ce faire, une collaboration avec l'équipe de Gosoh Tsujimoto (Kyoto, Japon) nous a permis d'acquérir une lignée de souris GPR120 KO (Ichimura et al., 2012). En utilisant une combinaison d'études morphologiques (immunohistochimie sur des coupe de papilles caliciformes), comportementales (tests de double-choix, *licking tests*, CTA) et fonctionnelles (imagerie calcique sur des cellules gustatives), nous avons montré que l'absence de GPR120 au niveau oral ne s'accompagne pas de changements :

- de l'organisation morphologique des papilles caliciformes,
- de l'induction lipides-dépendante de la $[Ca^{2+}]_i$ dans la cellule gustative
- du comportement des animaux vis-à-vis de différentes sources de lipides (AGLC, TG)

Ces résultats inattendus contredisent donc l'hypothèse d'une coopération directe entre le CD36 et le GPR120 dans laquelle le GPR120 jouerait un rôle central. Ces travaux ont donné lieu à un article paru en 2015 dans le *Journal of Lipid Research*.

Article n°1 :

The oral lipid sensor GPR120 is not indispensable for the orosensory detection of dietary lipids in mice

Déborah Ance, Arnaud Bernard, Selvakumar Subramaniam, Akira Hirasawa, Gozoh Tsujimoto, Toshihiro Hashimoto, Patricia Passilly-Degrace, Naim-Akhtar Khan, and Philippe Besnard.

J Lipid Res. 2015 Feb;56(2):369-78



The oral lipid sensor GPR120 is not indispensable for the orosensory detection of dietary lipids in mice

Déborah Ancel,* Arnaud Bernard,* Selvakumar Subramaniam,* Akira Hirasawa,[†] Gozoh Tsujimoto,[†] Toshihiro Hashimoto,[§] Patricia Passilly-Degrace,* Naim-Akhtar Khan,* and Philippe Besnard^{1,*}

NUTox,* UMR U866 INSERM/Université de Bourgogne/AgroSup Dijon, F21000 Dijon, France; Department of Pharmacogenomics,[†] Kyoto University Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Sakyo-ku, Kyoto 606-8501, Japan; and Faculty of Pharmaceutical Sciences,[§] Tokushima Bunri University, Japan

Abstract Implication of the long-chain fatty acid (LCFA) receptor GPR120, also termed free fatty acid receptor 4, in the taste-guided preference for lipids is a matter of debate. To further unravel the role of GPR120 in the “taste of fat”, the present study was conducted on GPR120-null mice and their wild-type littermates. Using a combination of morphological [i.e., immunohistochemical staining of circumvallate papillae (CVP)], behavioral (i.e., two-bottle preference tests, licking tests and conditioned taste aversion) and functional studies [i.e., calcium imaging in freshly isolated taste bud cells (TBCs)], we show that absence of GPR120 in the oral cavity was not associated with changes in *i*) gross anatomy of CVP, *ii*) LCFA-mediated increases in intracellular calcium levels ($[Ca^{2+}]_i$), *iii*) preference for oily and LCFA solutions and *iv*) conditioned avoidance of LCFA solutions. In contrast, the rise in $[Ca^{2+}]_i$ triggered by grifolic acid, a specific GPR120 agonist, was dramatically curtailed when the *GPR120* gene was lacking. Taken together, these data demonstrate that activation of lingual GPR120 and preference for fat are not connected, suggesting that GPR120 expressed in TBCs is not absolutely required for oral fat detection in mice.—Ancel, D., A. Bernard, S. Subramaniam, A. Hirasawa, G. Tsujimoto, T. Hashimoto, P. Passilly-Degrace, N-A. Khan, and P. Besnard. **The oral lipid sensor GPR120 is not indispensable for the orosensory detection of dietary lipids in mice.** *J. Lipid Res.* 2015. 56: 369–378.

Supplementary key words lipids • diet and dietary lipids • nutrition • receptors • G-protein • fat taste • feeding behavior • mouse

A growing number of studies strongly suggest that, in addition to textural, olfactory, and post-ingestive cues, the oro-sensory detection of lipids involves a taste component dependent on long-chain fatty acids (LCFAs). LCFAs are mainly released from triglycerides by the salivary lipases (1–3). The plasma membrane receptor CD36 is thought to

play a significant role in this taste detection system. First, CD36 displays a high affinity for LCFAs (4) and its expression in lingual epithelium is restricted to the gustatory papillae in rats (5), mice (6), and humans (7). Second, a LCFA-dependent signaling cascade leading to a huge rise in intracellular calcium levels ($[Ca^{2+}]_i$) was specifically found in mouse CD36-positive taste bud cells (TBCs), associated with neurotransmitter release (8, 9). Third, the activation of the nucleus of the solitary tract in the brainstem after an oral fat deposition is CD36-dependent (8). Finally, there is a tight correlation between CD36 gene expression and oral fat detection sensitivity: CD36 disruption rendered mice unable to properly detect, and prefer, low concentrations of lipids (6, 10, 11). Similarly, siRNA-targeted depletion of CD36 expression in gustatory papillae decreased oral lipid detection performance in rats (12). In humans, subjects expressing the A/A alleles at the gene variant rs1761667, which reduces CD36 expression (13), displayed a higher detection threshold (i.e., a lower sensitivity) for lipids than G/G controls (2) and showed a greater attraction for added fats and oils (14).

Recently, two members of the G-protein coupled receptor (GPCR) family, GPR40, [also known as free fatty acid receptor (FFAR) 1] and GPR120 (FFAR4), known to bind and be activated by medium- and long-chain fatty acids, were reported also to be implicated in oral lipid sensing in mice (15). A low gustatory nerve response to LCFAs and a decreased preference for linoleic or oleic acids (LAs, OLAs) were found both in GPR40^{-/-} and GPR120^{-/-} mice (15). Nevertheless, a role of GPR40 as gustatory lipid sensor is questionable because this GPCR has not been

Abbreviations: $[Ca^{2+}]_i$, intracellular calcium level; CTA, conditioned taste aversion; CVP, circumvallate papilla; FFAR, free fatty acid receptor; GA, grifolic acid; GLP-1R, GLP-1 receptor; GPCR, G-protein coupled receptor; LA, linoleic acid; LCFA, long-chain fatty acid; OLA, oleic acid; TBC, taste bud cell.

¹To whom correspondence should be addressed.
e-mail: pbesnard@u-bourgogne.fr

This work was supported by a grant from the French National Research Agency (ANR-12-BSV1-0027-01, *SensoFAT-2* project to P.B.).

Manuscript received 30 September 2014 and in revised form 28 November 2014.

Published, JLR Papers in Press, December 8, 2014

DOI 10.1194/jlr.M055202

Copyright © 2015 by the American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc.

This article is available online at <http://www.jlr.org>

found by others in mouse (16), rat (17), or human (18) taste buds. In contrast, GPR120 was systematically detected in murine and human gustatory papillae (11, 15, 18) in which it was frequently coexpressed with CD36 (11, 19). This last observation raises the question of the respective role(s) of these two LCFA receptors in the coding mechanisms eliciting the oro-sensory detection of dietary lipids at the periphery. Recently, it was shown that CD36 and GPR120 have non-overlapping roles in the LCFA-mediated signaling in human TBCs (19). Whether GPR120 plays a primary role in oral fat detection and preference remains a subject of debate. In contrast to prior results (15), a recent study reported that GPR120^{-/-} mice did not differ from wild-type mice in their preference for Intralipid (20), a fat emulsion composed of soy bean oil, egg phospholipids, and glycerin, suggesting that GPR120 might not be essential for oral fat detection. Although these two studies were conducted using the same GPR120 KO mouse model, a direct comparison between these two sets of data is difficult because of major differences in the lipid stimuli used, which were either free LCFAs (15) or lipid micelles (20). In another report, despite a specific activation of their afferent gustatory fibers, wild-type mice were unable to detect and prefer nonfatty acid GPR120 agonists during behavioral tests (21). Consistent with this behavioral data, healthy humans subjected to a two-alternative forced choice test were also unable to detect these GPR120 agonists (21). Altogether, these new findings suggest that the ligand binding activation of lingual GPR120 is not sufficient to generate a typical food choice. These contradictory reports confuse the role played by GPR120 in the preference for fat. To unravel the GPR120 function in the lingual gustatory epithelium, a set of behavioral tests (two-bottle preference tests, licking tests, and conditioned taste aversion) associated with functional experiments (calcium imaging studies on freshly isolated TBCs) were conducted in GPR120^{-/-} mice and their wild-type littermates.

MATERIALS AND METHODS

Animals

French guidelines for the use and care of laboratory animals were followed and experimental protocols were approved by the Animal Ethic Committee of the University of Burgundy. GPR120-deficient mice on a C57Bl/6 background were generated by homologous recombination leading to the replacement of exon 1 by a PGK-neo cassette (21). Animals were individually housed in a controlled environment (constant temperature and humidity, dark period from 7 PM to 7 AM). The mice had free access to regular chow and tap water during the experiments, unless otherwise specified. GPR120^{-/-} mice and GPR120^{+/+} littermate controls were locally generated by mating of heterozygous animals. Genotypes of animals were determined by PCR using previously published procedures (21).

Tissues and blood samples

Mouse circumvallate papillae (CVPs) were isolated according to the procedure described elsewhere (6). Briefly, lingual epithelium was separated from connective tissue by enzymatic dissociation

(elastase and dispase mixture, 2 mg/ml each in Tyrode buffer) and the unique CVP was dissected under a binocular microscope. Heparinized blood samples were obtained from retro-orbital sinus and plasmas were obtained after centrifugation of blood (5,000 g for 10 min, 4°C). Plasma insulin levels were assayed by using a commercial ELISA kit (Mercodia, Sweden) and plasma glucose levels were determined using enzymatic reaction kits (Biomerieux, France).

Behavioral experiments

Two-bottle preference tests. Mice were offered simultaneously two bottles for 12 h at the beginning of the dark period (22). Animals were subjected to a choice between control or experimental solutions (each test was separated by a rest period of at least 48 h). In one set of experiments, both solutions contained 0.3% xanthan gum w/v (Sigma-Aldrich) in water in order to produce an oil suspension and to minimize textural cues between the two bottles. Experimental solutions contained, in addition to xanthan gum, either 0.02%, 0.2%, or 2.0% rapeseed oil (w/v, Fleur de Colza, Lesieur, France), 0.5% or 1% LA, 2% sucrose (w/v), or 0.3 mM quinine (Sigma-Aldrich). In another set of experiments, Intralipid (20% Fresenius kabi a.b., Sweden) solutions were tested versus deionized water (0.25% and 2.5% Intralipid, v/v) (20). To avoid the development of side preferences, the position of each bottle was randomized and reversed for each test. At the end of the tests, the consumption of control and experimental solutions was analyzed by weighing the bottles and the percentage of preference for the experimental solution was calculated (ratio of the consumption of the experimental solution relative to total consumption).

Licking tests. Licking tests were performed in order to analyze the short-term (1 min) attraction for a LCFA by using computer-controlled lickometers (Med Associates). Mice were food and water deprived at the beginning of the dark period and for 6 h before the tests. Naive animals were trained to learn the procedure. The first day, mice were successively subjected to a bottle containing either water or a more attractive solution (4% sucrose) for 15 min sessions. The following day, the procedure was repeated, except that the mice were given the bottles in the reverse order. On the third day, mice were given mineral oil (Cooper, France) for both sessions so that the mice were not neophobic to the oily texture.

On test days, animals were successively and randomly subjected to the control (mineral oil) or experimental (mineral oil + 0.5% OLA or 0.5% LA w/v; Sigma-Aldrich) solutions and the number of licks on each bottle was determined for 1 min from the first lick to minimize post-ingestive signals (11). LA and OLA were tested on 2 different days.

CTA tests. Conditioned taste aversion (CTA) was performed on wild-type and GPR120^{-/-} mice. To train the animals to drink during a short period, access to water (containing 0.3% xanthan gum) was restricted to 10:00 to 11:00 AM for 3 days before conditioning. Water restriction was followed during the conditioning and the preference tests. To avoid dehydration, animals also had access to drinking water from 3:00 to 3:30 PM. On the day of conditioning, mice were given 2% LA in 0.3% xanthan gum (conditioned stimulus) from 10:00 to 11:00 AM, then were intraperitoneally injected with 0.15M LiCl (16.5 µl/g body weight, conditioned mice) or saline solution (16.5 µl/g body weight, controls). To reinforce the CTA, a second conditioning was performed 3 days later, as described previously, with 0.5% LA. Preference tests were performed with 0.5% LA versus vehicle (0.3% xanthan gum in water). The specificity of aversion to LA was assessed using an additional two-bottle preference test with 2% sucrose versus vehicle.

For all double-choice tests, the preference for the experimental solution (LA or sucrose) was calculated as the ratio of the consumption of the experimental solution to total consumption.

Histology and immunohistochemistry

CVPs from fasted male wild-type and GPR120^{-/-} mice were harvested and tissues were fixed by immersion in 4% paraformaldehyde in PBS for 4 h on ice. CVPs were transferred to 15% sucrose in PBS for 2 h then placed in 30% sucrose overnight before being embedded in OCT medium (Tissue-Tek, Sakura Finetek). Cryostat sections (10 µm) were air dried for 2 h at room temperature and then rehydrated in PBS for 10 min. Rehydrated sections were incubated during 1 h with PBS containing 0.3% Triton X-100 and 10% fatty acid-free BSA. Then, the slices were incubated overnight at 4°C with an anti-rabbit α-gustducin antibody (1/50; Santa Cruz Biotechnology Inc., sc-395) or an anti-rabbit Ki67 antibody (1/50; Abcam, ab16667). α-gustducin was used as a marker of type II TBCs and Ki67 as a proliferative cells marker. After washing, sections were incubated for 1 h at room temperature with a fluorescent anti-rabbit secondary antibody (Alexa 568, 1:500 dilution; Invitrogen) for α-gustducin staining or for 30 min with an HRP-conjugated anti-rabbit secondary antibody (JIR, 111-035-144) for Ki67, then were revealed with an Alexa fluor 568 tyramide kit (Invitrogen, T20934). The nuclei were counterstained with Hoechst 33258 (0.05 mg/ml; Sigma-Aldrich). Negative control tests without primary antibodies were performed (data not shown). Slices were analyzed under an epifluorescence microscope (Cell Observer Zeiss). For hematoxylin-eosin staining, the tissues containing CVP were fixed in formalin, dehydrated, and then embedded in paraffin. Colorations were performed with Autostainer XL robot (Leica Biosystems, Germany).

Real-time RT-PCR

Total RNAs from CVP were extracted using the Total RNA Purification Kit (Norgen Biotek, Canada) according to the manufacturer's instructions. Briefly, nitrogen-frozen CVPs were homogenized in the lysing buffer with an RNase free piston pellet. After homogenization, RNAs were bound on purification columns and treated with an amplification grade DNase (RNase-Free DNase I kit, Norgen Biotek, Canada) to ensure genomic DNA removal. After purification, RNAs were resuspended in RNase free water. RNA concentrations were measured with a Nanodrop® (Thermo Fisher Scientific) spectrophotometer. Reverse transcription reactions were carried out using the High Capacity cDNA Reverse Transcription kit (LifeTechnology) according to the manufacturer's recommendations with 50 ng of total RNA from CVP and random primers. Real-time PCR reactions were performed with a StepOne Plus (LifeTechnology) device with the use of TaqMan Gene Expression Master Mix (LifeTechnology) according to the manufacturer's instructions. To assay transcript quantities, commercially available Taqman Gene Expression Assays (LifeTechnology) were used: *ffar4* (GPR120) Mm00725193_m1, GPR40 Mm_00809442_S1, *Hprt1* (housekeeper) Mm01545399_m1; and CD36 and α-gustducin as described in (22). The comparative 2^{-ΔΔCT} method was used for relative quantification.

Measurement of Ca²⁺ signaling

CD36-positive gustatory taste buds cells were freshly isolated from mouse CVP as described previously (23) and further cultured for 24 h in Willico-Dish wells, containing RPMI-1640 medium, supplemented with 10% fetal calf serum, 200 U/ml penicillin, and 0.2 mg/ml streptomycin. The next day, the CD36-positive TBCs were gently washed with a buffer containing the following: 3.5 mM KH₂PO₄; 17.02 mM Na₂HPO₄; 136 mM NaCl,

pH 7.4. The cells were then incubated with Fura-2/AM (1 µM) for 60 min at 37°C in loading buffer, which contained the following: 110 mM NaCl; 5.4 mM KCl; 25 mM NaHCO₃; 0.8 mM MgCl₂; 0.4 mM KH₂PO₄; 20 mM Hepes-Na; 0.33 mM Na₂HPO₄; 1.2 mM CaCl₂, pH 7.4.

After loading, the cells (2 × 10⁵/ml) were washed three times and remained suspended in the identical buffer. After adding LA or specific agonist grifolic acid (GA) at a concentration of 20 µmol/l, or both successively in the medium, the changes in intracellular Ca²⁺ (F₃₄₀/F₃₈₀) were monitored under the Nikon microscope (TiU) by using S-fluor 40× oil immersion objective. The planes were taken at Z intervals of 0.3 µm, and NIS-Elements software was used to deconvolve the images. The microscope was equipped with EM-CCD (Lucas) camera for real-time recording of 16-bit digital images. The dual excitation fluorescence imaging system was used for studies of individual cells. The changes in intracellular Ca²⁺ were expressed as ΔRatio, which was calculated as the difference between the peak F₃₄₀/F₃₈₀ ratio. The data were summarized from the large number of individual cells (20–40 cells in a single run, with 3–9 identical experiments done in at least three cell preparations). Each experiment was repeated 3 times.

Statistics

Results are expressed as means ± SEM. The significance of differences between groups was evaluated with GraphPad Prism (GraphPad Software). We first checked that the data for each group were normally distributed and that variances were equal. We then carried out two-tailed Student's *t*-test or two-way ANOVA corrected for multiple comparison with the Tukey posthoc test.

RESULTS

The lack of GPR120 does not affect CVP organization

According to the genotyping profile (Fig. 1A), no GPR120 mRNA was detected in small intestine or in CVP from GPR120^{-/-} animals (Fig. 1B). *GPR120* gene inactivation did not interfere on CD36 and α-gustducin expression levels in taste buds as similar mRNA levels were found in CVP from GPR120^{+/+} and GPR120^{-/-} mice. According to data found in different species (16–18), GPR40 mRNA was undetectable in mouse CVP (Fig. 1B). In young GPR120^{-/-} animals, evolution of body mass is slightly lower than in littermate controls (Fig. 1C). This small difference is due to a lower lean mass, which might explain the weaker energy expenditure previously found in GPR120^{-/-} mice during the light-inactive phase (21). In agreement with published data obtained in different GPR120 KO mouse models (21, 24), our GPR120^{-/-} mice displayed higher fasted blood glucose and plasma insulin levels than wild-type counterparts, suggesting a latent insulin resistance (Fig. 1C). In brief, the GPR120^{-/-} mice used in this study share the classical phenotyping characteristics previously evidenced by others (21, 24).

The *GPR120* gene is flanked by two genes known to be involved in the regulation of cell cycle and cell proliferation (i.e., Centrosomal Protein 55 and Retinol Binding Protein 4, respectively). To verify whether the genic deletion used to disrupt GPR120 gene expression interfered

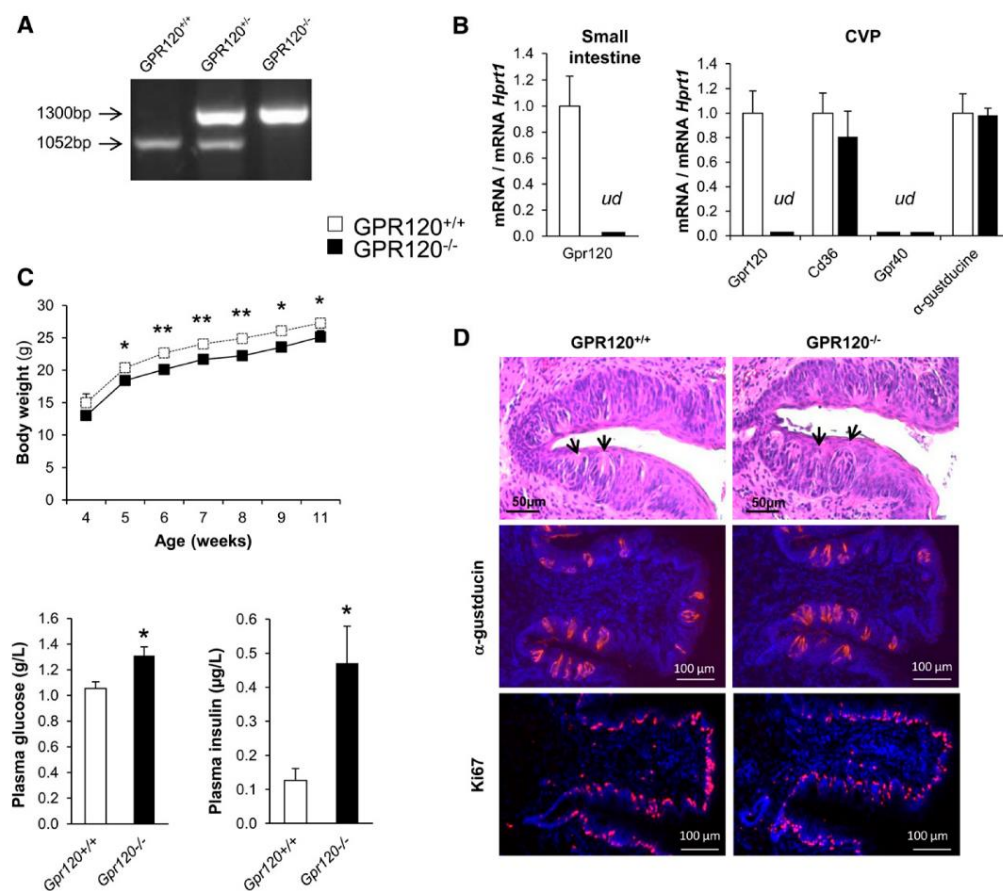


Fig. 1. Impacts of GPR120 gene inactivation on body weight, blood glucose, plasma insulin levels and circumvallate papilla morphology. A: Genotyping of studied mice: agarose gel electrophoresis of PCR products. B: RT-quantitative PCR of CVP (n = 5, *ud*, undetectable). C: Typical GPR120^{-/-} phenotypes compared with littermates GPR120^{+/+} mice: evolution of body weight in mice fed a standard chow (n = 7), fasted blood glucose and plasma insulin levels (n = 8–12). Means ± SEM. *, *P* < 0.05; **, *P* < 0.01. D: Morphology of CVP from wild-type and GPR120^{-/-} mice. Gross anatomy: hematoxylin-eosin-stained CVP. Black arrows show apical taste pore areas of taste buds. Identification of taste buds cells by α -gustducin staining and visualization of taste bud cells proliferation by Ki67 staining.

with the organization of the gustatory tissue, histology and immunostaining using specific markers of type-II cells (i.e., α -gustducin), in which GPR120 is mainly expressed (17), and of cell proliferation (i.e., Ki67) were undertaken in CVP from controls and GPR120^{-/-} mice. No obvious change in the gross anatomy of CVP, taste bud structure, or Ki67 labeling was elicited when GPR120 was lacking (Fig. 1D).

GPR120-null mice detect and prefer lipid solutions

We have previously shown, using 12 h two-bottle preference tests performed with different concentrations of rapeseed oil, that mice become able to detect and prefer oily solutions when concentration reaches 0.02% oil, the maximal preference being observed with 2.0% oil in solution (22). According to this previous result, preference tests were performed in wild-type and GPR120^{-/-} mice in presence of 0.02, 0.2, and 2% rapeseed oil mixed with 0.3%

xanthan gum. Rapeseed oil was chosen by reason of its LCFA composition including saturated, mono-unsaturated (OLA) and poly-unsaturated ω 6 (LA) and ω 3 fatty acids known to be GPR120 ligands (25). Surprisingly, GPR120^{-/-} mice displayed the same behavior as their littermate controls and were able to properly detect the different concentrations of oil (Fig. 2A). This behavior is not gender-dependent as similar results were found in age-matched males and females (data not shown). Consistent with data from Sclafani et al. (20), GPR120^{-/-} mice displayed an attraction to Intralipid similar to that of controls (Fig. 2B). Also, in contrast to prior results (15), the GPR120 gene inactivation was not associated with a decrease in the detection and preference for LA during two-bottle preference tests (Fig. 2C). No difference between the responses of control and GPR120-null mice was detected for sucrose (sweet) and quinine (bitter) (Fig. 2D).

GPR120^{-/-} and GPR120^{+/+} mice display similar conditioned aversion to LA

CTA is a learned reduction of hedonic value of a taste occurring when the taste experience is paired with a digestive malaise. This paradigm was used to further explore the putative involvement of GPR120 in oral LCFA detection. Consistent with previously published data (8), control mice developed a clear aversion for LA when this conditioned stimulus was previously paired with a LiCl-induced digestive pain (Fig. 3A). A similar behavior was maintained in GPR120^{-/-} mice (Fig. 3A). This avoidance was specific as the sweet preference was not affected in LA-conditioned GPR120^{+/+} and GPR120^{-/-} mice (Fig. 3B).

GPR120^{-/-} and GPR120^{+/+} mice display similar reward behavior for LCFAs

The behavior observed during long-term two-bottle preference tests is greatly influenced by post-ingestive regulatory feedback (26). The brief-access lick paradigm, by limiting post-ingestive cues, is believed to primarily

measure taste-guided reward behavior [i.e., hedonic value and motivation (27)]. Therefore, computer-controlled lickometers were used to measure the number of licks for 1 min and determine the attraction for 0.5% OLA or 0.5% LA solubilized in mineral oil. As shown in Fig. 4, the number of licks given by GPR120^{-/-} or GPR120^{+/+} mice is significantly higher for the LA or OLA solutions than for the control solution; thus, the lack of GPR120 did not affect the reward behavior for these two LCFAs.

LA triggers the Ca²⁺ signaling pathway in TBCs from GPR120-null mice

LCFAs are known to induce Ca²⁺ signaling in mouse circumvallate TBCs (8, 9, 19, 28). To explore the role played by the GPR120 receptor in this event, freshly isolated circumvallate TBCs from wild-type and GPR120^{-/-} mice were subjected to 20 μmol/l LA or GA, a specific GPR120 partial agonist (29), and were analyzed using calcium imaging. LA triggered a similar induction of [Ca²⁺]_i both in TBCs from control and GPR120^{-/-} mice, indicating that

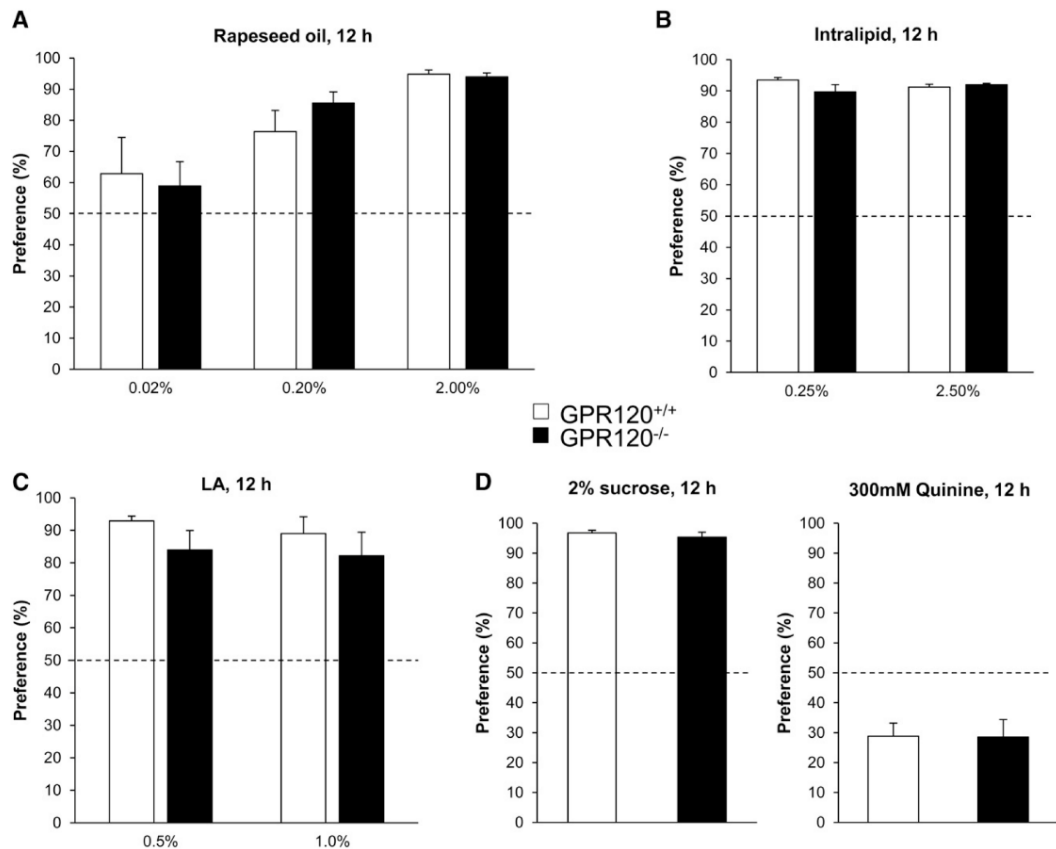


Fig. 2. Effect of GPR120 gene invalidation on the preference for lipids. Two bottles (control and experimental solutions) were simultaneously offered to wild-type and GPR120^{-/-} mice for 12 h. Experimental solutions contained: A: 0.02%, 0.2% or 2.0% of rapeseed oil (w/v), n = 10–12. B: 2.5%, 0.25% of Intralipid (v/v), n = 10. C: 0.5% or 1% LA, n = 7. D: 2% sucrose (w/v) or 0.3 mM quinine (bitter taste), n = 10–12. Means ± SEM. Dotted line represents the absence of preference.

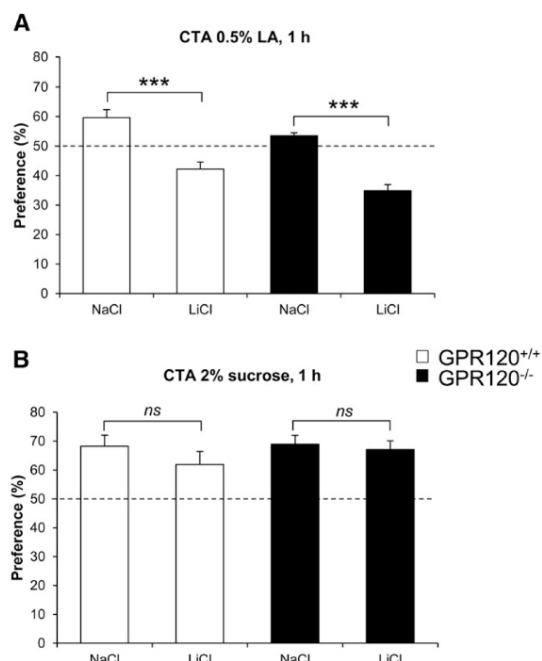


Fig. 3. Effect of GPR120 gene invalidation on the conditioned avoidance of LA. Conditioned taste aversion (CTA) performed by pairing a conditioned stimulus, i.e., LA with a digestive pain obtained by intraperitoneal (i.p.) injection of LiCl (150 mM, 16 μ l/g of body weight), was assessed by using 1 h two-bottle preference tests. Unconditioned controls (GPR120^{+/+} and GPR120^{-/-} mice) received an i.p. NaCl injection. A: LA-mediated CTA. Data shown are the average of two successive tests (48 h interval). There was no interaction between the tests and no effect of the time. Means \pm SEM (n = 7–9). ***, $P \leq 0.001$. B: To demonstrate the specificity of LA-taste aversion, two-bottle preference test was performed with sucrose (n = 7–9). Dotted line represents the absence of preference.

GPR120 was not indispensable for the LA-mediated calcium response in taste buds (Fig. 5A, C). As expected, the rapid and huge rise in $[Ca^{2+}]_i$ triggered by GA in control

TBCs was dramatically curtailed when the GPR120 gene was lacking (Fig. 5B, C). To strengthen these observations, the effect of combinations of LA and GA on $[Ca^{2+}]_i$ response in TBCs was studied. The addition of 20 μ mol/l GA after that of 20 μ mol/l LA, or inversely, triggered an additive response in TBCs from wild-type controls (Fig. 6A, C) while this effect was lacking in GPR120^{-/-} mice (Fig. 6B, C).

DISCUSSION

A growing number of studies support the involvement of a taste component in the oro-sensory detection of dietary lipids. By detecting LCFAs, this sensing system might play a significant role in food choices. The plasma membrane glycoprotein CD36 was first identified as a candidate for the function of gustatory lipid sensor in mice (6, 10). More recently, the LCFA sensors GPR40 and GPR120 were shown to be possible alternative candidates (15). Mice lacking GPR40 or GPR120 were unable to detect and prefer a lipid source (OLA or LA) during behavioral tests. Moreover, direct recording of gustatory nerves reveals that GPR40 and GPR120 were required to generate nerve signals in response to oral lipid stimulation (15). This original finding correlated quite well with the gustatory function of other GPCRs, like Taste receptor type 1 and Taste receptor type 2 receptors involved in sweet, bitter, and umami tastes. Nevertheless, a direct implication of GPR40 in oral fat detection is unlikely because we did not retrieve any transcript of this receptor in mouse CVP; also, it was not found in mouse circumvallate, fungiform, nor foliate papillae by others, in contrast to what was found for GPR120. Similarly, GPR40 was not retrieved in gustatory papillae in rats (17) or humans (18).

Despite the expression of GPR120 in mouse type-II taste cells (17) and its activation by LCFAs (25), an implication of GPR120 in fat detection and preference remains a matter of debate. As aforementioned, it was recently reported that oral GPR120 is not essential for this function in mice

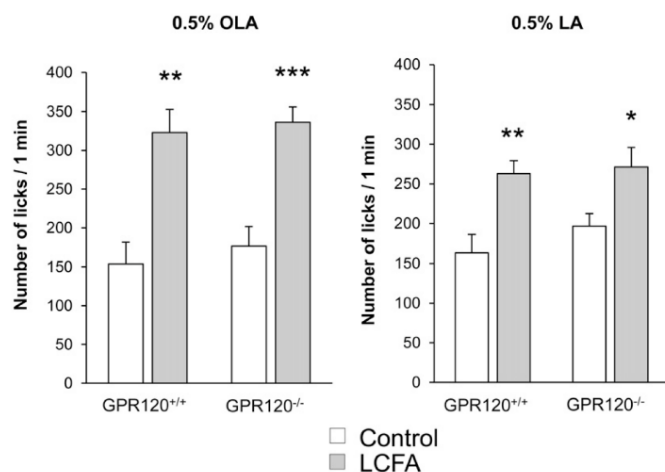


Fig. 4. Effect of GPR120 gene invalidation on the attraction for LCFAs. Short-term (1 min) licking tests in GPR120^{-/-} and their littermate controls (GPR120^{+/+}). Animals were subjected successively in a randomized manner to a control solution (mineral oil) and an experimental solution of 0.5% OLA or LA in mineral oil. Means \pm SEM (n = 12). *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$.

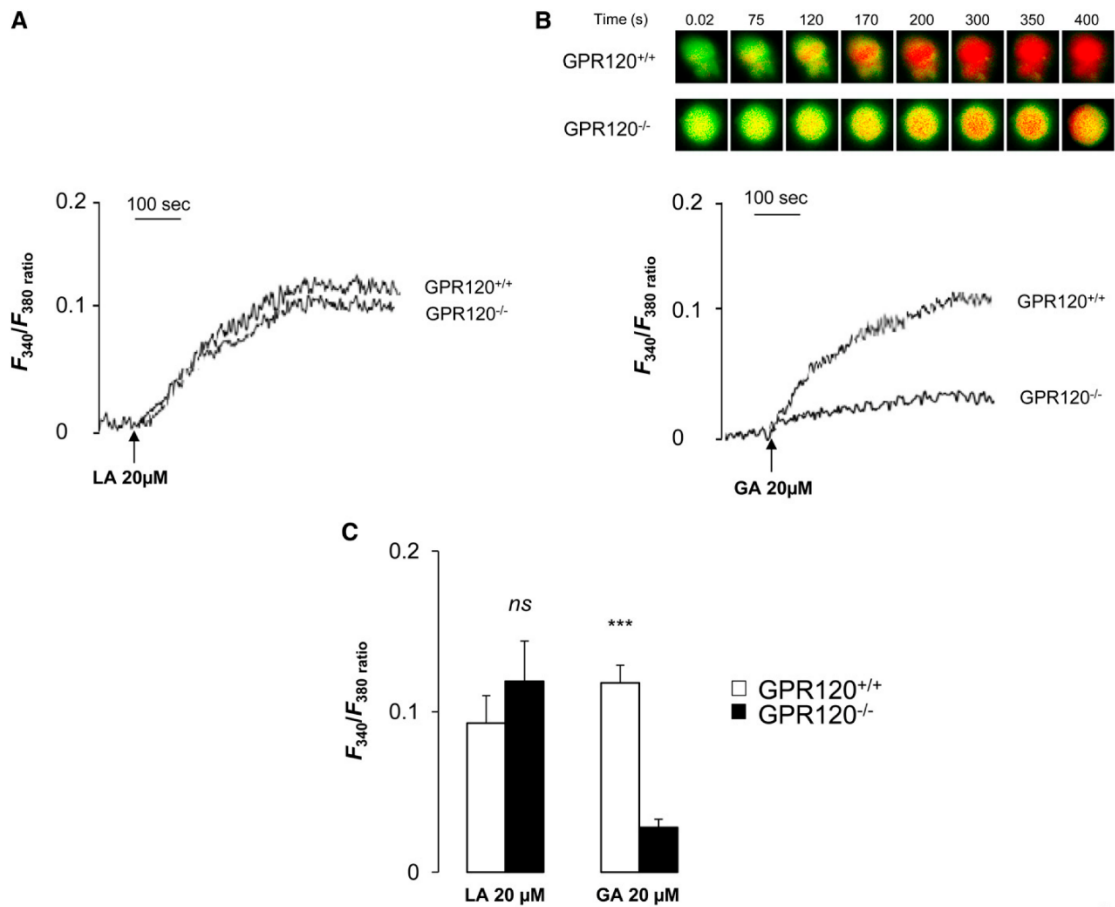


Fig. 5. Effects of LA or GA on Ca²⁺ signaling in mouse circumvallate TBCs. Ca²⁺ imaging studies were performed in calcium-containing (100% Ca²⁺) media. The changes in intracellular Ca²⁺ (F340/F380) were monitored under a Nikon microscope (TiU) by using S-fluor 40× oil immersion objectives, as described in the Materials and Methods section. Colored time-lapse changes show the kinetics of the rise in [Ca²⁺]_i levels in a CD36-positive TBC freshly isolated from CVP from GPR120^{+/+} and GPR120^{-/-} mice following addition of 20 µM LA or GA in the medium. The arrows indicate when LA or GA were added into the cuvette without interruptions in the recording. A: changes (F₃₄₀/F₃₈₀) in intracellular Ca²⁺ evoked by LA, 20 µM and (B) by GA, 20 µM. C: Means ± SEM (n = 7). ***, P < 0.001. ns, nonsignificant.

(20, 30), contrary to prior findings (15). To further unravel the GPR120 role in the “taste of fat”, we chose to revisit the effects of a GPR120 gene inactivation on taste bud functionality and lipid preference in mice. Because the aforementioned contradictory data were generated in the same KO mouse model, present experiments were conducted using an alternative GPR120^{-/-} mouse model. We report herein that GPR120^{-/-} mice and controls displayed a similar appetite for oily solution or Intralipid emulsion during 12 h two-bottle preference tests. This behavior was reproduced when free LCFA (LA) solutions were checked by using long-term (12h) two-bottle preference tests, but also in conditions known to deeply minimize post-ingestive influences (i.e., 1 min licking tests with LA or OLA) suggesting that the absence of GPR120 in oral cavity did not alter the taste-guided attraction for fat. Moreover,

GPR120^{-/-} mice subjected to conditioned taste aversion tests learned to avoid 0.5% LA like wild-type mice, whereas their preference for sweet was maintained. Altogether, these results suggest that GPR120 is not indispensable for the oro-sensory detection of lipids in mice. Long-term two-bottle preference tests performed with LA or OLA allows a direct comparison with the previous study (15), but leads to an opposite conclusion. Origin of this discrepancy remains elusive. In the present study, LCFA concentrations tested were deliberately limited to values reported as leading to significant differences between controls and GPR120^{-/-} mice during two-bottle preference tests in (15), but remaining within the limits that may be found in the feed. Moreover, an influence of the KO mouse model used is unlikely because we found an attraction for Intralipid similar to the one found by Sclafani et al. (20), whose

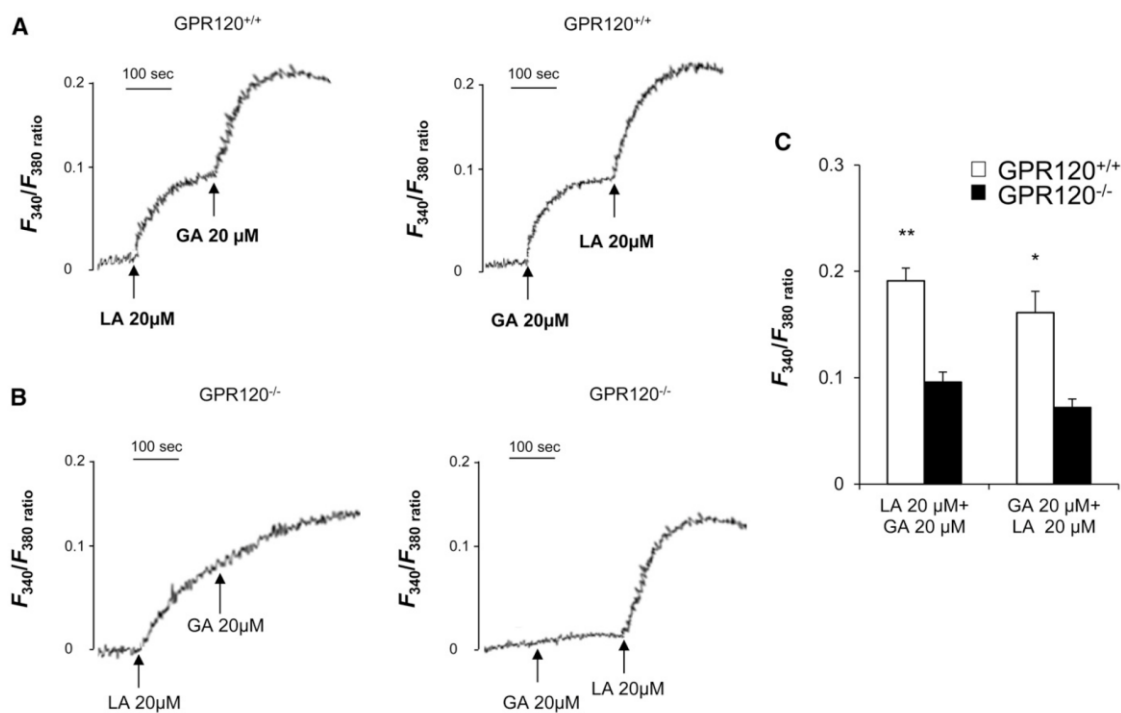


Fig. 6. Differential intracellular Ca^{2+} signaling responses induced by LA and GA in TBCs. Ca^{2+} imaging studies were performed in calcium-containing (100% Ca^{2+}) media. The changes in intracellular Ca^{2+} (F_{340}/F_{380}) were monitored under the Nikon microscope (TiU) by using S-fluor 40 \times oil immersion objectives, as described in the Materials and Methods section. Colored time-lapse changes show the kinetics of the rise in $[Ca^{2+}]_i$ levels in a CD36-positive taste bud cell freshly isolated from CVP from GPR120^{+/+} and GPR120^{-/-} mice following addition of 20 μ M LA and GA one after another in the medium. The arrows indicate when LA or GA were added into the cuvette without interruptions in the recording. A: in GPR120^{+/+} mice and (B) in GPR120^{-/-} mice. C: Means \pm SEM (n = 7). *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$.

experiments were conducted using the same GPR120^{-/-} mice as Cartoni et al. (15).


Ca^{2+} signaling being an early event downstream of taste receptor activation, calcium imaging studies were performed in freshly isolated mouse TBCs to gain insight into the functional incidence of a GPR120 gene deletion. In line with our behavioral data, LA-mediated induction of $[Ca^{2+}]_i$ was not altered in GPR120^{-/-} mice. This result is consistent with a recent report showing that LA-mediated increase in $[Ca^{2+}]_i$ is poorly or not affected by the siRNA knockdown of GPR120 in a human fungiform cell line (19). By contrast, the huge rise in $[Ca^{2+}]_i$ triggered by GA, a GPR120 partial agonist, was greatly diminished when GPR120 was lacking. Therefore, in the gustatory cells from mouse CVP, GPR120 can be efficiently activated by GA, demonstrating the functionality of the receptor. However, the LCFA-mediated rise in $[Ca^{2+}]_i$ does not absolutely require GPR120. These unexpected results suggest that activation of GPR120 and preference for lipids might not be connected. This conclusion is consistent with a recent report showing that wild-type mice did not display any preference for non-fatty acid GPR120 agonists over water in two-bottle preference tests, despite a GPR120-dependent activation of the glossopharyngeal nerve (30). Further

experiments are needed to elucidate these paradoxical results. It is noteworthy that expression of GPR120 extends to surrounding non-gustatory epithelium in humans (18). Moreover, GPR120 has been identified in a lingual population of trigeminal neurons in rodents (31, 32). These observations raise the possibility of an implication of GPR120 in other oro-sensory cues. Interestingly, a tight relationship exists between taste and somatosensory signals with a convergence in the NTS (33). In some cases, this association inhibits taste response (34). Existence of a complex modulation of NTS neurons by GPR120-positive trigeminal afferents might explain the dissociation between taste nerve activation and attraction for fat reported by Godinot and coworkers (30).

GPR120 was first identified in the entero-endocrine L-cells in which it mediates the GLP-1 secretion induced by LCFAs (25). Several observations support a similar implication of GPR120 in mouse gustatory papillae. Indeed, GPR120 and GLP-1 are coexpressed in a subset of TBCs (22). Moreover, GLP-1 release is triggered by the specific GPR120 agonist GSK137647A in CVP explants (22) and by GA in freshly isolated TBCs (19). Finally, concomitant presence of the GLP-1 receptor (GLP-1R) in the gustatory mucosa (35) suggests that this hormone is locally active



and, thus, might directly affect the basic functions in mouse taste buds. Consistent with this assumption, it was reported that the GLP-1 signaling modulates the sweet taste sensitivity (35).

We recently reported that CD36 protein levels in mouse CVP is subjected to a highly sensitive short-term downregulation during food intake, in contrast to GPR120 (11). This regulation is strictly dependent on the presence of lipids in the diet. It is a local control, because a direct oil deposition onto the tongue is sufficient to trigger the decrease of CD36 protein in CVP. As reported for numerous surface receptors, this negative feedback might constitute a desensitization system of CD36-positive TBCs during persistent exposure to dietary lipids during a meal (11). Interestingly, the absence of GLP-1R suppresses this lipid-mediated downregulation, suggesting that CD36 protein levels in CVP are dependent on the GLP-1 signaling pathway (22). Because TBCs coexpress GLP-1 and GPR120 (22), it is tempting to speculate that the lipid-mediated drop in CD36 in CVP is locally regulated by GLP-1 via GPR120. Therefore, the lower attraction for fat found in *GLP-1R*^{-/-} mice (22) might be due to the functional impairment of CD36 in CVP. The molecular mechanism of such regulation remains to be determined. It is known that the invalidation of the CD36 gene elicits a dramatic decrease in the attraction for lipids despite the absence of changes in GPR120 expression in CVP (11). We reported herein that GPR120 gene disruption is not associated with a change in CD36 expression levels in CVP and in preference for fat. All these data strongly suggest that CD36 and GPR120 play different, but complementary, functions in the mediation of fat preference. CD36 should be critical for oral fat detection and preference, whereas GPR120, through the local GLP-1 signaling might modulate the lipid detection sensitivity. Further studies are needed to explore this hypothesis. Because taste-guided preference for highly palatable fatty foods contributes to obesity, the molecular deciphering of the mechanisms responsible for the detection of dietary lipids by the peripheral gustatory pathway constitutes a real public health challenge that might lead to new insights to reduce the obesity risk in a near future. 

The authors thank Jean-Christophe Blanchard for animal management, Michael Chevrot, Guillaume Maquart, and Jean-François Merlin for technical assistance and André Bouchot from Cellmap (the University of Burgundy) for cellular imagery. We thank Keiko Iida (Department of Pharmacogenomics, Kyoto University Kyoto, Japan) for her contribution to the construction of GPR120-null mice.

REFERENCES

1. Kawai, T., and T. Fushiki. 2003. Importance of lipolysis in oral cavity for orosensory detection of fat. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **285**: R447–R454.
2. Pepino, M. Y., L. Love-Gregory, S. Klein, and N. A. Abumrad. 2012. The fatty acid translocase gene CD36 and lingual lipase influence oral sensitivity to fat in obese subjects. *J. Lipid Res.* **53**: 561–566.

3. Voigt, N., J. Stein, M. M. Galindo, A. Dunkel, J. D. Raguse, W. Meyerhof, T. Hofmann, and M. Behrens. 2014. The role of lipolysis in human orosensory fat perception. *J. Lipid Res.* **55**: 870–882.
4. Baillie, A. G., C. T. Coburn, and N. A. Abumrad. 1996. Reversible binding of long-chain fatty acids to purified FAT, the adipose CD36 homolog. *J. Membr. Biol.* **153**: 75–81.
5. Fukuwatari, T., T. Kawada, M. Tsuruta, T. Hiraoka, T. Iwanaga, E. Sugimoto, and T. Fushiki. 1997. Expression of the putative membrane fatty acid transporter (FAT) in taste buds of the circumvallate papillae in rats. *FEBS Lett.* **414**: 461–464.
6. Laugerette, F., P. Passilly-Degrace, B. Patris, I. Niot, M. Febbraio, J. P. Montmayeur, and P. Besnard. 2005. CD36 involvement in orosensory detection of dietary lipids, spontaneous fat preference, and digestive secretions. *J. Clin. Invest.* **115**: 3177–3184.
7. Simons, P. J., J. A. Kummer, J. J. Luiken, and L. Boon. 2011. Apical CD36 immunolocalization in human and porcine taste buds from circumvallate and foliate papillae. *Acta Histochem.* **113**: 839–843.
8. Gaillard, D., F. Laugerette, N. Darcel, A. El-Yassimi, P. Passilly-Degrace, A. Hichami, N. A. Khan, J. P. Montmayeur, and P. Besnard. 2008. The gustatory pathway is involved in CD36-mediated orosensory perception of long-chain fatty acids in the mouse. *FASEB J.* **22**: 1458–1468.
9. El-Yassimi, A., A. Hichami, P. Besnard, and N. A. Khan. 2008. Linoleic acid induces calcium signaling, Src kinase phosphorylation, and neurotransmitter release in mouse CD36-positive gustatory cells. *J. Biol. Chem.* **283**: 12949–12959.
10. Sclafani, A., K. Ackroff, and N. A. Abumrad. 2007. CD36 gene deletion reduces fat preference and intake but not post-oral fat conditioning in mice. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **293**: R1823–R1832.
11. Martin, C., P. Passilly-Degrace, D. Gaillard, J. F. Merlin, M. Chevrot, and P. Besnard. 2011. The lipid-sensor candidates CD36 and GPR120 are differentially regulated by dietary lipids in mouse taste buds: impact on spontaneous fat preference. *PLoS ONE.* **6**: e24014.
12. Chen, C. S., E. M. Bench, T. D. Allerton, A. L. Schreiber, K. P. Arceneaux 3rd, and S. D. Primeaux. 2013. Preference for linoleic acid in obesity-prone and obesity-resistant rats is attenuated by the reduction of CD36 on the tongue. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **305**: R1346–R1355.
13. Love-Gregory, L., R. Sherva, T. Schappe, J. S. Qi, J. McCrea, S. Klein, M. A. Connelly, and N. A. Abumrad. 2011. Common CD36 SNPs reduce protein expression and may contribute to a protective atherogenic profile. *Hum. Mol. Genet.* **20**: 193–201.
14. Keller, K. L., L. C. Liang, J. Sakimura, D. May, C. van Belle, C. Breen, E. Driggin, B. J. Tepper, P. C. Lanzano, L. Deng, et al. 2012. Common variants in the CD36 gene are associated with oral fat perception, fat preferences, and obesity in African Americans. *Obesity (Silver Spring).* **20**: 1066–1073.
15. Cartoni, C., K. Yasumatsu, T. Ohkuri, N. Shigemura, R. Yoshida, N. Godinot, J. le Coutre, Y. Ninomiya, and S. Damak. 2010. Taste preference for fatty acids is mediated by GPR40 and GPR120. *J. Neurosci.* **30**: 8376–8382.
16. Montmayeur, J. P., C. Fenech, S. Kusumakshi, F. Laugerette, Z. H. Liu, A. Wiencis, and U. Boehm. 2011. Screening for G-protein-coupled receptors expressed in mouse taste papillae. *Flavour Fragrance J.* **26**: 223–230.
17. Matsumura, S., T. Mizushige, T. Yoneda, T. Iwanaga, S. Tsuzuki, K. Inoue, and T. Fushiki. 2007. GPR expression in the rat taste bud relating to fatty acid sensing. *Biomed. Res.* **28**: 49–55.
18. Galindo, M. M., N. Voigt, J. Stein, J. van Lengerich, J. D. Raguse, T. Hofmann, W. Meyerhof, and M. Behrens. 2012. G protein-coupled receptors in human fat taste perception. *Chem. Senses.* **37**: 123–139.
19. Ozdener, M. H., S. Subramaniam, S. Sundaresan, O. Sery, T. Hashimoto, Y. Asakawa, P. Besnard, N. A. Abumrad, and N. A. Khan. 2014. CD36- and GPR120-mediated Ca signaling in human taste bud cells mediates differential responses to fatty acids and is altered in obese mice. *Gastroenterology.*
20. Sclafani, A., S. Zukerman, and K. Ackroff. 2013. GPR40 and GPR120 fatty acid sensors are critical for postoral but not oral mediation of fat preferences in the mouse. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **305**: R1490–R1497.
21. Ichimura, A., A. Hirasawa, O. Poulain-Godefroy, A. Bonnefond, T. Hara, L. Yengo, I. Kimura, A. Leloire, N. Liu, K. Iida, et al. 2012. Dysfunction of lipid sensor GPR120 leads to obesity in both mouse and human. *Nature.* **483**: 350–354.
22. Martin, C., P. Passilly-Degrace, M. Chevrot, D. Ancel, S. M. Sparks, D. J. Drucker, and P. Besnard. 2012. Lipid-mediated release of

- GLP-1 by mouse taste buds from circumvallate papillae: putative involvement of GPR120 and impact on taste sensitivity. *J. Lipid Res.* **53**: 2256–2265.
23. Chevrot, M., A. Bernard, D. Ancel, M. Buttet, C. Martin, S. Abdoul-Azize, J. F. Merlin, H. Poirier, I. Niot, N. A. Khan, et al. 2013. Obesity alters the gustatory perception of lipids in the mouse: plausible involvement of lingual CD36. *J. Lipid Res.* **54**: 2485–2494.
 24. Oh, D. Y., S. Talukdar, E. J. Bae, T. Imamura, H. Morinaga, W. Fan, P. Li, W. J. Lu, S. M. Watkins, and J. M. Olefsky. 2010. GPR120 is an omega-3 fatty acid receptor mediating potent anti-inflammatory and insulin-sensitizing effects. *Cell.* **142**: 687–698.
 25. Hirasawa, A., K. Tsumaya, T. Awaji, S. Katsuma, T. Adachi, M. Yamada, Y. Sugimoto, S. Miyazaki, and G. Tsujimoto. 2005. Free fatty acids regulate gut incretin glucagon-like peptide-1 secretion through GPR120. *Nat. Med.* **11**: 90–94.
 26. Sclafani, A., and K. Ackroff. 2012. Role of gut nutrient sensing in stimulating appetite and conditioning food preferences. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **302**: R1119–R1133.
 27. Shin, A. C., R. L. Townsend, L. M. Patterson, and H. R. Berthoud. 2011. “Liking” and “wanting” of sweet and oily food stimuli as affected by high-fat diet-induced obesity, weight loss, leptin, and genetic predisposition. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **301**: R1267–R1280.
 28. Dramane, G., S. Abdoul-Azize, A. Hichami, T. Vogtle, S. Akpona, C. Chouabe, H. Sadou, B. Nieswandt, P. Besnard, and N. A. Khan. 2012. STIM1 regulates calcium signaling in taste bud cells and preference for fat in mice. *J. Clin. Invest.* **122**: 2267–2282.
 29. Hara, T., A. Hirasawa, Q. Sun, K. Sadakane, C. Itsubo, T. Iga, T. Adachi, T. A. Koshimizu, T. Hashimoto, Y. Asakawa, et al. 2009. Novel selective ligands for free fatty acid receptors GPR120 and GPR40. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **380**: 247–255.
 30. Godinot, N., K. Yasumatsu, M. E. Barcos, N. Pineau, M. Ledda, F. Viton, Y. Ninomiya, J. le Coutre, and S. Damak. 2013. Activation of tongue-expressed GPR40 and GPR120 by non caloric agonists is not sufficient to drive preference in mice. *Neuroscience.* **250**: 20–30.
 31. Gilbertson, T. A., T. Yu, and B. P. Shah. 2010. Gustatory mechanisms for fat detection. In *Fat Detection: Taste, Texture, and Post Ingestive Effects*. J. P. Montmayeur and J. le Coutre, editors, Boca Raton (FL).
 32. Yu, T., B. P. Shah, D. R. Hansen, M. Park-York, and T. A. Gilbertson. 2012. Activation of oral trigeminal neurons by fatty acids is dependent upon intracellular calcium. *Pflügers Arch.* **464**: 227–237.
 33. Faurion, A. 2006. Sensory interactions through neural pathways. *Physiol. Behav.* **89**: 44–46.
 34. Osada, K., M. Komai, B. P. Bryant, H. Suzuki, A. Goto, K. Tsunoda, S. Kimura, and Y. Furukawa. 1997. Capsaicin modifies responses of rat chorda tympani nerve fibers to NaCl. *Chem. Senses.* **22**: 249–255.
 35. Shin, Y. K., B. Martin, E. Golden, C. D. Dotson, S. Maudsley, W. Kim, H. J. Jang, M. P. Mattson, D. J. Drucker, J. M. Egan, et al. 2008. Modulation of taste sensitivity by GLP-1 signaling. *J. Neurochem.* **106**: 455–463.

I.3. Résultats complémentaires

D'autres travaux concernant les souris GPR120 KO, non présentés dans l'article n°1, ont été réalisés. Ils avaient pour but de répondre à deux interrogations :

- Est-ce que le comportement vis-à-vis des lipides est sexe-dépendant ?
- Est-ce que l'absence de GPR120 interfère avec le changement de la détection gustative des lipides observée au cours de l'obésité (voir article n°2) ?

I.3.1. Le comportement des souris GPR120^{-/-} vis-à-vis des lipides est-il sexe-dépendant ?

Des tests de comportement ont été réalisés chez les femelles GPR120^{-/-} pour vérifier que le sexe n'influence pas le phénotype des souris par rapport à la détection des lipides. Les double-choix ne révèlent aucune différence entre les souris WT et KO chez les femelles (figure 40-B et figure 41), comme c'était le cas chez les mâles (figure 2 de l'article n°1). Les mêmes tests ont également été effectués chez les souris hétérozygotes et, comme attendu, des résultats comparables ont été obtenus (non présentés).

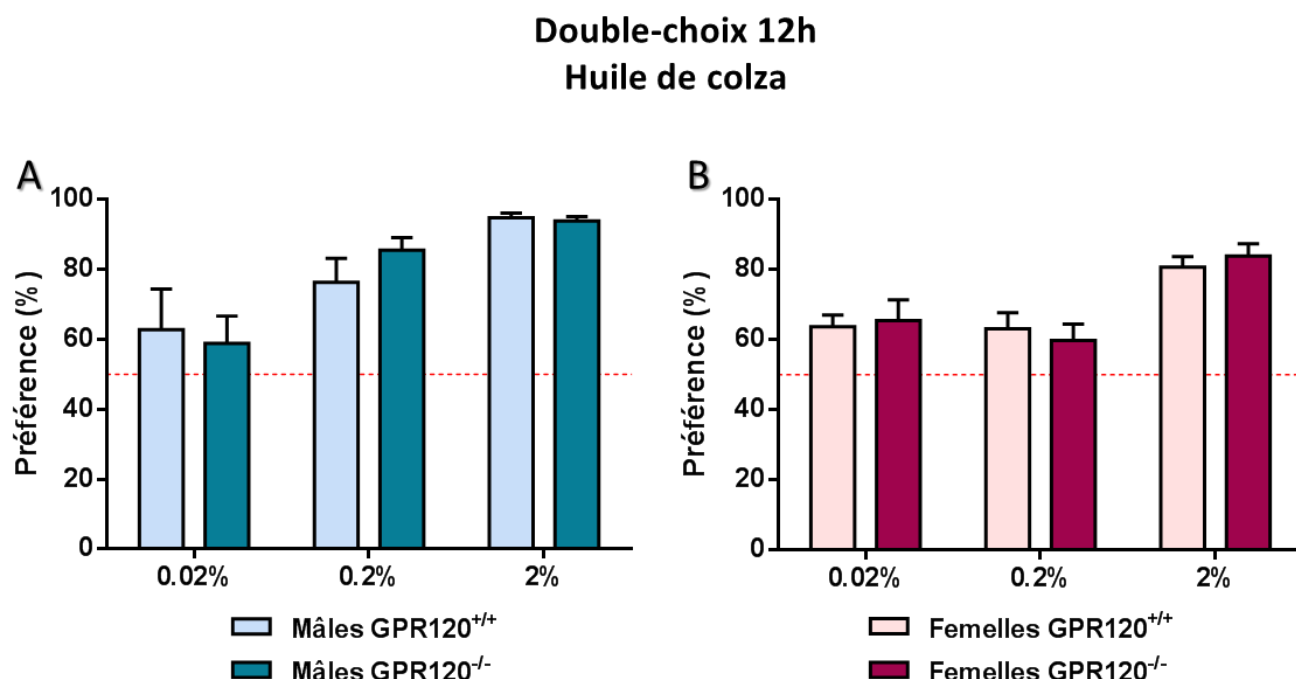


Figure 40 : Comparaison des tests de double-choix 12h réalisés sur des souris GPR120^{+/+} et GPR120^{-/-} mâles (A) et femelles (B).

Solutions tests : huile de colza (0.02, 0.2 ou 2% m/V) dans 0.3% XG vs. solution contrôle : 0.3% XG. N = 7-12.
XG : gomme de xanthane.

Il est à noter cependant qu'il existe des différences significatives entre les mâles et les femelles pour les résultats de préférence des concentrations les plus élevées d'huile de colza (0.2 et 2%) : les souris femelles montrent une préférence moins importante que les mâles. Les variations hormonales liées au cycle utérin des souris femelles peuvent être mises en cause. Ces résultats soulignent l'importance du choix du sexe des souris pour les études comportementales.

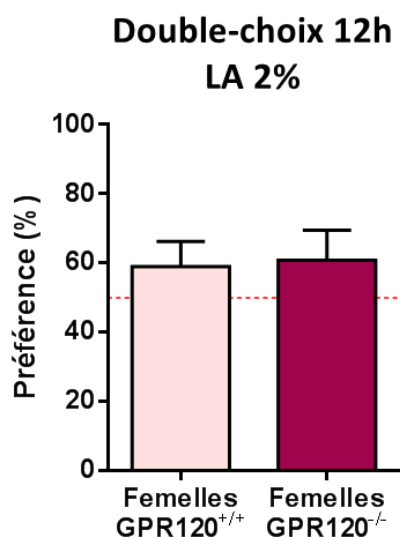


Figure 41 : Test de double-choix 12h réalisé sur des souris GPR120^{+/+} et GPR120^{-/-} femelles.

Solution test : LA 2% (m/V) dans 0.3% XG vs. solution contrôle : 0.3% XG. N = 12.

LA : acide linoléique ; XG : gomme de xanthane.

1.3.2. Le GPR120 joue-t-il un rôle dans la détection orosensorielle des lipides lors d'un régime obésogène ?

Le GPR120 ne jouant pas de rôle visible sur le comportement alimentaire chez les souris en conditions normales contrairement à ce qui avait été montré précédemment, il semblait intéressant de challenger les souris GPR120^{-/-} au moyen d'un régime obésogène (HF). En effet, un régime HF entraîne une augmentation des taux de GPR120 dans différents tissus comme l'intestin proximal (Duca et al., 2013), les muscles cardiaques et squelettiques chez le rat (Cornall et al., 2011), les tissus adipeux sous-cutané, mésentérique et épидидymal (Gotoh et al., 2007) et l'estomac (Widmayer et al., 2015) chez la souris. De plus, le GPR120 régule de nombreux processus physiologiques en lien avec l'obésité (Mo et al., 2013) : dont la sécrétion d'hormones gastro-intestinales (GLP-1 (Hirasawa et al., 2005), CCK (Tanaka et al., 2008a), ghréline (Gong et al., 2014), GIP (Iwasaki et al., 2015)), le contrôle de l'appétit (Cintra et al., 2012), l'inflammation (Oh et al., 2010), l'adipogenèse (Gotoh et al., 2007), la sensibilité à l'insuline (Ichimura et al., 2012) et l'homéostasie énergétique de manière globale (Ichimura et al., 2014). La question du rôle du GPR120 dans les préférences alimentaires lors de l'obésité pouvait donc se poser.

a. Phénotypage des souris $GPR120^{-/-}$ en régime high-fat

Des souris $GPR120^{+/+}$ et $GPR120^{-/-}$ ont été placées en régime HF riche en acides gras saturés (tableau 3) pendant 13 semaines au total. L'évolution de la composition corporelle a été suivie par EchoMRI™ (figure 42).

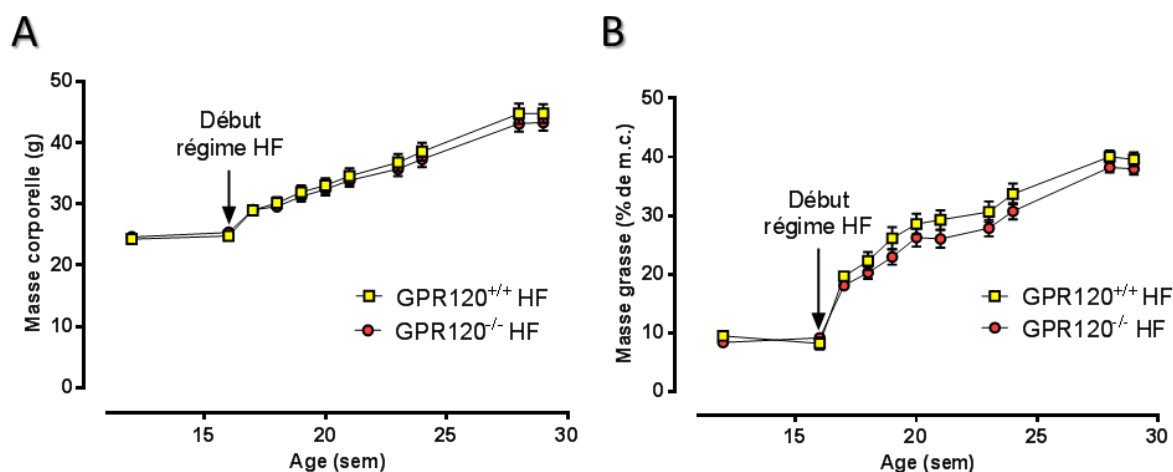


Figure 42 : Evolution de la composition corporelle des souris $GPR120^{+/+}$ et $GPR120^{-/-}$ en régime HF. Analyses par EchoMRI™ : masse corporelle (A), masse grasse (B). N = 10-13. HF : High-fat.

Dans nos conditions d'animalerie, le régime HF utilisé ne permet pas d'observer de différence de prise de masse corporelle et notamment de masse grasse entre les souris $GPR120^{+/+}$ et $GPR120^{-/-}$; il est à noter que les 2 groupes de souris ont une consommation de nourriture équivalente (figure 43). Les données de la littérature au sujet de la prise de masse des souris $GPR120$ KO en régime HF ne sont pas consensuelles (tableau 6).

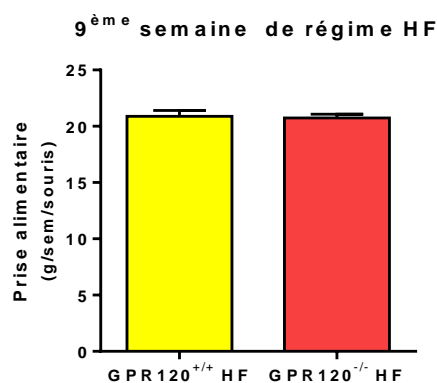


Figure 43 : Prise alimentaire des souris $GPR120^{+/+}$ et $GPR120^{-/-}$ à la 9ème semaine de régime HF. HF : high-fat. N = 10-13.

Un test de tolérance à l'insuline a également été réalisé, pour observer l'état d'insulino-résistance des souris GPR120^{-/-} par rapport aux souris GPR120^{+/+} en régime HF (figure 44). Là encore, aucune différence n'a pu être observée entre les 2 groupes, contrairement aux résultats d'Ichimura et collaborateurs qui observent une insulino-résistance plus marquée chez les souris GPR120^{-/-} en régime HF (Ichimura et al., 2012). Il est à noter que nos 2 équipes utilisent la même souche de souris KO.

Tableau 6 : Comparaison des phénotypes des souris en régime hyperlipidique (acides gras saturés) de différentes équipes.

Référence	GPR120 KO : construction génétique	Souche	Masse corporelle		% de lipides du régime HF	Sources lipidiques majoritaires
			Régime STD	Régime HF		
Bjursell 2014	Interruption de l'exon 1 par ATG-LacZ	C57bl/6N	WT = KO	WT = KO	45%	Huile de palme et saindoux
Ichimura 2012	Exon 1 remplacé par marqueur de sélection néomycine	129Sv / C57Bl/6	WT = KO	KO > WT	60%	Saindoux
Ancel 2015	Exon 1 remplacé par marqueur de sélection néomycine	C57Bl/6	WT > KO	WT = KO	60%	Huile de palme
Suckow 2012	Exon 2 remplacé par marqueur de sélection néomycine (Taconic)	129Sv / C57Bl/6 puis C57Bl/6	WT < KO	WT = KO	60%	Saindoux
Oh 2010	Exon 2 remplacé par marqueur de sélection néomycine (Taconic)	129Sv / C57Bl/6	WT = KO	?	60%	Saindoux

Les régimes HF utilisés pour les études évoquées contiennent pour la plupart environ 60% de calories apportées par les lipides, mais ces lipides proviennent de sources différentes (tableau 6). La composition en AG étant variable en fonction des sources lipidiques, elle peut expliquer les divergences de prises de masse (Hariri and Thibault, 2010). De plus, des différences de phénotypes ne sont pas rares : par exemple, de nettes divergences ont été observées sur des lignées de souris GPR40^{-/-} (Lan et al., 2008; Steneberg et al., 2005). Les fonds génétiques ou encore les conditions d'hébergement des animaux, qui peuvent avoir une grande influence notamment sur le microbiote intestinal qui contrôle de nombreuses fonctions métaboliques peuvent expliquer ces différences.

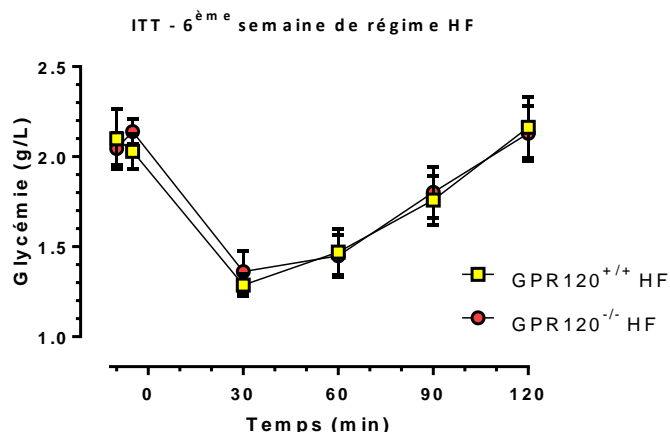


Figure 44 : Test de tolérance à l'insuline réalisé sur les souris GPR120^{-/-} et GPR120^{+/+} en régime HF. Injection d'insuline : 0.45U/kg m.c. après 6h de jeûne. Réalisé à la 6^{ème} semaine de régime HF. N = 10-13. HF : high-fat ; ITT : insulin tolerance test.

b. Tests de préférence en double-choix long terme

Des tests de double-choix sur 12h ont été réalisés sur les deux groupes de souris en régime HF, avec une concentration d'huile de colza de 2%. Cette concentration a été choisie car elle provoque généralement une différence de préférence très visible entre les souris WT en régime STD et celles en régime HF (voir article n°2). Un premier double-choix (figure 45-A) effectué avant la mise en place du régime a permis de confirmer l'absence d'effet de l'inactivation de GPR120 en régime STD sur la préférence pour la solution d'huile de colza (voir article n°1). Des double-choix ont ensuite été réalisés à partir de la 5^{ème} semaine de régime HF. La moyenne des résultats de ces double-choix est présentée sur la figure 45-B. En accord avec des données déjà publiées (article n°2), le régime HF a entraîné une forte diminution de la préférence pour la solution lipidique. Les souris GPR120^{-/-} et GPR120^{+/+} ont cependant là encore un comportement similaire vis-à-vis des lipides.

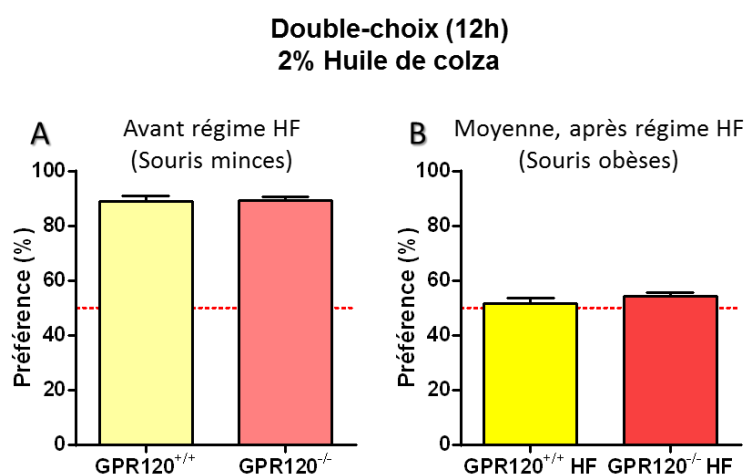


Figure 45 : Test de double-choix (12h) sur des souris GPR120^{-/-} et GPR120^{+/+} avant et après régime high-fat. Solution test : huile de colza 2% (m/V) dans 0.3% XG vs. solution contrôle : 0.3% XG. N = 10-13. HF : high-fat ; XG : gomme de xanthane.

I.4. Discussion

L'ensemble des données présentées sur le GPR120 oral montre que celui-ci ne joue pas de rôle prépondérant dans la détection gustative primaire des lipides, contrairement à ce qui était suggéré précédemment (Cartoni et al., 2010). L'article n°1 présente différents tests morphologiques, comportementaux et fonctionnels, tous concordants sur le fait que l'activation du GPR120 lingual et la préférence pour les lipides ne sont pas liées, suggérant que le GPR120 exprimé dans les papilles gustatives n'est pas indispensable à la détection des lipides. Les données récentes de la littérature vont dans le même sens, quelle que soit la souche de souris GPR120^{-/-} utilisée : nos travaux ont été effectués sur un modèle différent de celui des autres équipes ayant étudié les préférences des souris GPR120^{-/-} vis-à-vis des lipides (Cartoni et al., 2010; Godinot et al., 2013; Sclafani et al., 2013). L'équipe d'Anthony Sclafani a montré que les souris GPR120^{-/-} se comportent de la même façon que les souris sauvages par rapport à différentes concentrations d'Intralipide sur des double-choix de 24h (Sclafani et al., 2013). Une autre équipe (Godinot et al., 2013) a montré que l'utilisation d'agonistes spécifiques du GPR120 lors de tests de double-choix n'entraîne pas de préférence chez la souris, alors même que ces agonistes sont capables d'activer le nerf glossopharyngien. Ces auteurs suggèrent cependant que les agonistes pourraient activer des cellules non-gustatives exprimant le GPR120 et innervées par le nerf glossopharyngien. De plus, chez l'Homme, la méthode du double-choix forcé (variante du 3-AFC, réalisé avec 2 choix, voir encart n°2) montre que les agonistes du GPR120 ne provoquent pas de goût « LIN » (c'est-à-dire un goût « gras » avec pour référence le LA). Contrairement au CD36 qui est situé majoritairement au pôle apical des cellules gustatives (Laugerette et al., 2005), le GPR120 semble localisé sur toute la membrane de la cellule (Cartoni et al., 2010), ce qui est cohérent avec le fait que l'activation du GPR120 n'est pas un événement primaire dans la transduction du goût du gras. Même le fait de challenger les souris GPR120^{-/-} avec un régime HF, connaissant les nombreuses fonctions régulatrices du GPR120 contre la mise en place de l'obésité, n'a pas permis de mettre en évidence une implication du récepteur dans la détection des lipides.

Ainsi, parmi les 3 hypothèses proposées au début de cette partie (figure 35) pour expliquer les rôles respectifs du CD36 et du GPR120 dans les bourgeons du goût, les résultats obtenus sur les souris GPR120^{-/-} nous permettent d'éliminer le 2nd scénario (coopération directe). En effet, le GPR120 n'étant pas indispensable à la détection des lipides, une coopération directe entre les 2 récepteurs semble peu plausible. Le 1^{er} scénario (spécificités de liaison) ayant également été éliminé, le 3^{ème} scénario (coopération indirecte) apparaît alors comme le plus probable et est appuyé par plusieurs constatations.

Premièrement, dans l'intestin, le CD36 disparaît de la membrane apicale des entérocytes suite à la consommation de lipides. Il est ensuite dégradé par la voie de l'ubiquitine-protéasome (Tran et al., 2011). Ce rétrocontrôle négatif par l'intermédiaire des ligands lipidiques semble constituer un mécanisme de désensibilisation qui diminue progressivement la signalisation induite par les AGLC *via* le CD36 pendant la période postprandiale. Dans la papille caliciforme également, les taux de CD36 sont plus faibles lors de

la période nocturne (période de consommation alimentaire des souris), et cette diminution dépend de présence de lipides dans la nourriture (Martin et al., 2011b). Pour appuyer ce résultat, il a été montré qu'un dépôt lingual de lipides suffit à provoquer une diminution des niveaux de la protéine CD36 dans les papilles caliciformes. Il semblerait donc que le CD36 lingual subisse une régulation négative en période postprandiale dans les papilles gustatives, qu'il est tentant de rapprocher de la satiété sensorielle spécifique observée chez l'Homme (Cabanac, 1971; Rolls et al., 1981). En effet, une diminution de moitié des taux de CD36 (chez les souris hétérozygotes) suffit à faire perdre la préférence de ces souris pour les lipides (Martin et al., 2012). Ainsi, la régulation négative du CD36 pourrait entraîner une diminution progressive de la motivation à ingérer des aliments gras au cours du repas. Contrairement au CD36, les taux de GPR120 restent stable au cours de la journée dans les bourgeons du goût et ne semblent pas dépendre du contenu en lipides du régime (Martin et al., 2011b). Ces deux régulations différentes vont dans le sens de l'hypothèse de fonctions distinctes de ces récepteurs au niveau oral.

Deuxièmement, nous avons montré au Laboratoire (Martin et al., 2012) que le GLP-1 et le GPR120 sont colocalisés dans les cellules gustatives de souris. La stimulation d'explants de papilles gustatives par des AGLC résulte également en une augmentation de la sécrétion de GLP-1. Ce phénomène semble se produire par l'intermédiaire de l'activation du GPR120 puisque la stimulation de ces mêmes explants par un agoniste spécifique du GPR120 provoque également une augmentation de GLP-1 (Martin et al., 2012). Un tel mécanisme a lieu dans l'intestin, où la stimulation de GPR120 par les AGLC entraîne la sécrétion de GLP-1 par les cellules entéroendocrines (Hirasawa et al., 2005). Une preuve directe de l'implication du GPR120 pourrait être apportée par l'utilisation d'explants de papilles caliciformes provenant de souris GPR120^{-/-}.

Troisièmement, de très faibles quantités d'ALA – ligand préférentiel du GPR120 (Hirasawa et al., 2005) – ajoutées à une solution de saccharose, sont capables d'augmenter la préférence pour cette solution chez des souris sauvages (confirmant des résultats obtenus chez le rat (Pittman et al., 2006)) mais pas chez des souris GLP-1R KO (Martin et al., 2012). Les quantités d'ALA utilisées dans ce cas ne peuvent être détectées seules (Yoneda et al., 2009), et ce phénomène a lieu indépendamment du CD36 (Martin et al., 2012). Il semble donc que les AGLC peuvent influencer la perception de la saveur sucré *via* la signalisation de GLP-1, probablement par l'intermédiaire du GPR120 pour les raisons évoquées plus haut, même si, encore une fois, il n'existe aucune preuve directe. Des résultats préliminaires obtenus chez les souris GPR120^{-/-} vont dans ce sens (figure 46). En effet, tout comme chez les souris GLP-1R^{-/-}, de faibles quantités d'ALA (dont nous confirmons qu'elles ne sont pas détectées en tant que telles, figure 46-B) n'induisent pas d'augmentation de la préférence pour une solution de sucrose chez les souris GPR120^{-/-} (figure 46-C). Ces résultats doivent être confirmés car les expériences n'ont été réalisées que sur une seule série de souris. Les expériences de *licking* réalisées en court terme limitent les influences post-ingestives et laissent penser que l'hormone GLP-1 a une action locale de type autocrine ou paracrine,

d'autant plus que le GLP-1R est trouvé dans les fibres nerveuses adjacentes aux cellules gustatives (Shin et al., 2008). Ces données pourraient expliquer en partie la palatabilité des aliments à la fois gras et sucré.

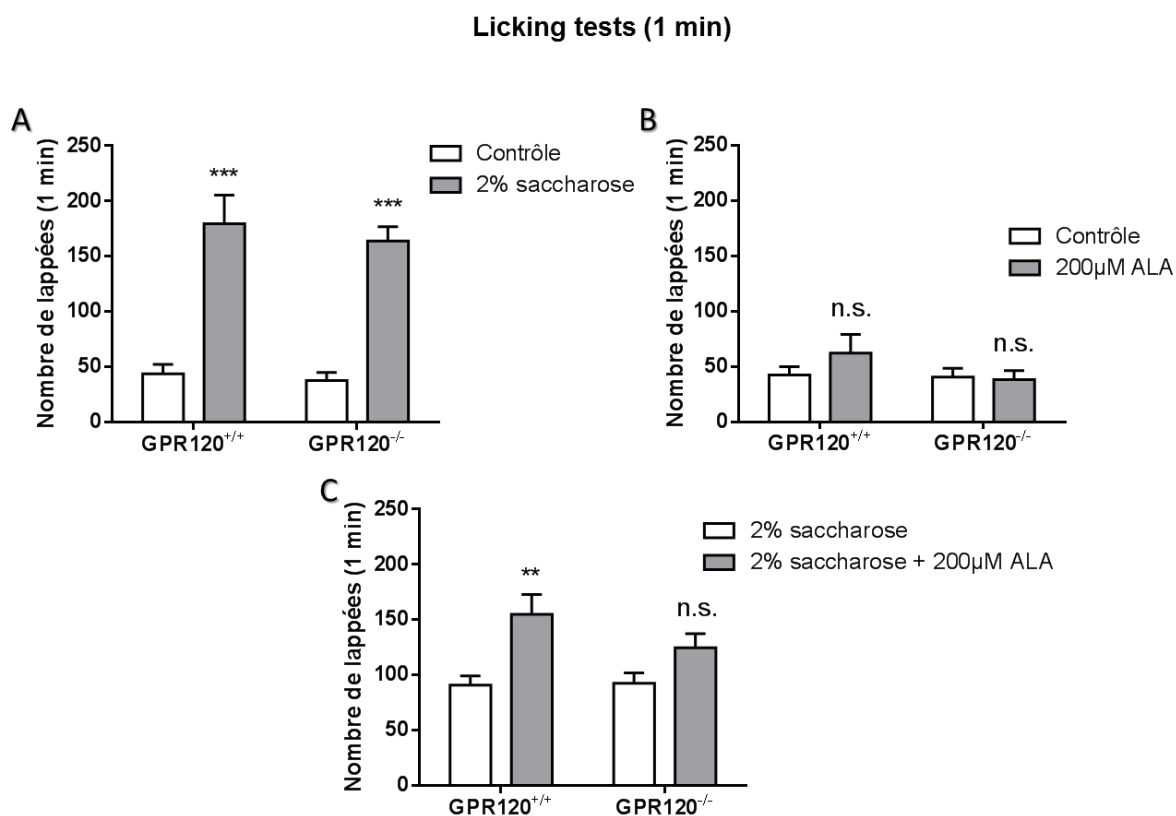


Figure 46 : Tests en lickomètres (1 min) sur des souris GPR120^{+/+} et GPR120^{-/-}.

Solution contrôle : paraffine (A et B) ou paraffine + 2% sucrose (m/V) (C), solutions test : paraffine + A – 2% sucrose, B – 200µM ALA, C – 2% sucrose + 200µM ALA. n.s. : non significatif ; ** P < 0.01 ; *** P < 0.001.

ALA : acide alpha-linolénique.

Enfin, le GLP-1 est capable de moduler la sensibilité aux goûts umami, sucré et acide (Martin et al., 2009; Martin et al., 2012; Shin et al., 2008). Il est notable que cette hormone affecte également le « goût du gras ». En effet, les souris GLP-1R KO sont moins capables de détecter de faibles concentrations d'huile de colza que les souris sauvages (Martin et al., 2012). Les mécanismes impliqués restent à élucider. Cependant, il est possible d'imaginer qu'un dysfonctionnement de la boucle de régulation du CD36 soit en cause. En effet, la régulation négative du CD36 après consommation de lipides n'est pas observée chez les souris GLP-1R KO. Dans les myocytes, la localisation du CD36 à la membrane est également régulée par une hormone : l'insuline (Smith et al., 2008). Il est donc raisonnable d'imaginer que GLP-1 pourrait avoir une action sur le CD36 suite à l'activation du GPR120 par les AGLC, ce qui entraînerait la disparition progressive du CD36 de la membrane des cellules gustatives. L'absence de régulation observée chez les souris GLP-1R^{-/-} impacterait la sensibilité aux lipides en augmentant le seuil de détection (les souris GLP-1R^{-/-} sont capables de détecter des concentrations d'huile de colza élevées (Martin et al., 2012)).

De nombreuses autres hormones sont exprimées dans les papilles gustatives par les cellules de type II et influencent la perception des saveurs (Shin and Egan, 2010). L'une d'entre elle, la CCK, est notamment sécrétée par l'intermédiaire du GPR120 en réponse aux lipides dans les cellules entéroendocrines STC-1 (Tanaka et al., 2008a). Au niveau des papilles, cette hormone et son récepteur ont un profil d'expression similaire, suggérant une action autocrine, majoritairement dans les cellules sensibles à l'amer (Herness and Zhao, 2009). La CCK augmente l'excitabilité des cellules gustatives en inhibant les courants potassiques, ce qui aurait pour effet d'accentuer le goût amer (Shin and Egan, 2010). De manière intéressante, chez le rat, l'ajout de faibles quantités d'AGLC à une solution amère entraîne une diminution des lapées pour cette solution (Pittman et al., 2006). On peut donc émettre l'hypothèse que le renforcement de l'aversion pour l'amer pourrait se faire grâce à la CCK produite dans les papilles gustatives en réponse aux AGLC. Cependant, même si le GPR120 est capable de médier la sécrétion de CCK dans l'intestin (Tanaka et al., 2008a), des enregistrements de nerfs gustatifs de souris GPR120^{-/-} stimulés avec une substance amère (benzoate de dénatonium) additionnée d'AG montrent que le GPR120 n'intervient pas dans ce mécanisme (Cartoni et al., 2010).

On constate donc que le CD36 joue un rôle majeur dans la détection gustative des lipides alimentaires, contrairement au GPR120. Cette détection gustative permet d'effectuer des choix (consommation ou non de tel ou tel aliment) en fonction des besoins énergétiques de l'organisme et en fonction de la valeur hédonique des aliments. Cependant, chez les individus obèses, le comportement alimentaire semble dérégulé. Qu'en est-il de la détection gustative périphérique des lipides ?

Partie II : La détection orosensorielle des lipides est-elle perturbée lors de l'obésité induite par un régime hyperlipidique ?

II.1. Introduction

Les Hommes en général montrent une préférence pour les aliments riches en lipides (Drewnowski and Greenwood, 1983). Cette tendance à surconsommer des aliments gras contribue au développement de l'obésité (Bray et al., 2004; Bray and Popkin, 1998). Les mécanismes aboutissant à ce comportement semblent complexes. En effet, si les stimuli environnementaux (abondance de nourriture dense en énergie) poussent la population à une prise alimentaire plus élevée avec un moindre effort à fournir, tout le monde n'est pas équivalent face à la prise de poids et à l'obésité (Shin and Berthoud, 2011). Ainsi, l'altération du comportement alimentaire lors de l'obésité pourrait avoir à la fois une origine génétique, et une origine acquise par la surconsommation d'aliments denses en énergie. Une piste émergente laisse penser que l'obésité est associée à une dérégulation des circuits de la récompense liés à la consommation d'aliments palatables. Ainsi, une des hypothèses proposées est que l'augmentation de la consommation d'aliments riches en lipides et en sucres chez les individus obèses serait un moyen d'atteindre un seuil de récompense satisfaisant en compensation d'un défaut d'activité du circuit cortico-limbique (impliquant une signalisation dépendante de la dopamine et des opiacés) ou « cerveau émotionnel » (Berthoud et al., 2011). Il est donc légitime de penser que les personnes obèses vivent dans un « monde orosensoriel et oro-hédonique » différent des sujets minces (Bartoshuk et al., 2006). Certaines études montrent d'ailleurs une corrélation positive entre l'IMC et le seuil de détection des lipides (Stewart et al., 2010; Stewart et al., 2011a; Stewart et al., 2011b).

Chez le rongeur également, la surconsommation d'aliments riches en lipides mène à l'obésité. Par exemple, une source optionnelle d'huile de maïs conduit les souris à ingérer un excès de calories jusqu'à devenir obèses (Takeda et al., 2001a). Une étude très intéressante (Shin et al., 2011a) a plus récemment été conduite sur trois groupes de rats : témoins Sprague-Dawley (SD), susceptibles à l'obésité (obesity-prone : OP) et résistant à l'obésité (obesity-resistant : OR). Ces 3 groupes ont été placés en régime HF afin d'induire une obésité et des tests de *licking* court terme avec différentes concentrations d'huile de maïs et de sucrose ont été réalisés. Un des principaux intérêts de cette étude est de pouvoir différencier les effets du régime HF (chez les rats SD) des effets de l'obésité en elle-même (rats OP). Globalement, les rats SD rendus obèses par le régime HF voient leur seuil de détection de l'huile de maïs et du sucrose augmenté (la courbe concentration-réponse est déplacée vers la droite, ce qui correspond à une diminution de la sensibilité) par rapport aux rats en régime STD. De plus, ces mêmes rats placés en restriction calorique (induisant environ 20% de perte de poids) retrouvent une sensibilité comparable à celle des rats restés en régime STD. Chez les rats OP et OR, les mêmes tests ont été réalisés avant et après 8 semaines de régime HF. La comparaison des 2 lignées montre que les rats OP, tout comme les SD en régime HF, ont un seuil

de détection de l'huile de maïs et du sucrose plus élevé que les rats OR, avant comme après le régime HF. Cependant, le régime HF en lui-même n'a que peu changé les réponses de chaque lignée. L'ensemble de ces résultats montre qu'il existe une altération de la sensibilité aux lipides et au saccharose, à la fois prédéterminée et acquise par l'obésité.

Des expériences d'approches opérantes, dans lesquelles la souris doit effectuer des tâches pour obtenir la récompense (par exemple des lipides) suggèrent une implication du système de récompense au niveau central (Sakamoto et al., 2015; Shin et al., 2011a). Cependant, les expériences de *licking* réalisées en très court terme (10s) laissent penser qu'une altération des mécanismes de perception du goût au niveau périphérique pourrait aussi jouer un rôle (Shin et al., 2011a).

Afin d'explorer plus en détail l'impact de l'obésité sur la détection orale des lipides et les mécanismes impliqués, nous avons réalisé des tests sur des souris rendues obèses par deux régimes différents : un régime HF, et un régime HFHS (*high-fat high-sucrose*). Les deux régimes sont riches en AGS, et diffèrent essentiellement par leur composition en glucides : le régime HF contient de l'amidon alors que le régime HFHS contient du saccharose. Ainsi, la comparaison des effets de ces deux régimes peut permettre de différencier l'effet « calories » de l'effet « composition du régime ». Des tests de comportement long et court terme ont été réalisés avec les lipides, montrant une altération de la détection oro-sensorielle des lipides chez les souris rendues obèses. Puis ces souris ont été placées en restriction calorique afin d'observer la réversibilité des effets de l'obésité induite par un régime. Des analyses des taux de CD36 par western-blot et des expériences de signalisation calcique ont également été effectuées pour explorer les mécanismes mis en jeu. Ces travaux ont donné lieu à un article paru en 2013 dans le *Journal of Lipid Research*.

Article n°2 : Obesity alters the gustatory perception of lipids in the mouse: plausible involvement of lingual CD36

Michael Chevrot*, Arnaud Bernard*, Déborah Ance, Marjorie Buttet, Céline Martin, Souleymane Abdoul-Azize, Jean-François Merlin, Hélène Poirier, Isabelle Niot, Naim Akhtar Khan, Patricia Passilly-Degrace, and Philippe Besnard.

J Lipid Res. 2013 Sep;54(9):2485-94

* Co-auteurs

Supplemental Material can be found at:
<http://www.jlr.org/content/suppl/2013/07/09/jlr.M039446.DC1.html>

✦ Author's Choice

Obesity alters the gustatory perception of lipids in the mouse: plausible involvement of lingual CD36[§]

Michael Chevrot,¹ Arnaud Bernard,¹ Déborah Ancel, Marjorie Buttet, Céline Martin, Souleymane Abdoul-Azize, Jean-François Merlin, Hélène Poirier, Isabelle Niot, Naim Akhtar Khan, Patricia Passilly-Degrace, and Philippe Besnard²

Physiologie de la Nutrition et Toxicologie (NUTox), UMR U866 INSERM/Université de Bourgogne/AgroSup Dijon, F-21000 Dijon, France

Abstract A relationship between orosensory detection of dietary lipids, regulation of fat intake, and body mass index was recently suggested. However, involved mechanisms are poorly understood. Moreover, whether obesity can directly modulate preference for fatty foods remains unknown. To address this question, exploration of the oral lipid sensing system was undertaken in diet-induced obese (DIO) mice. By using a combination of biochemical, physiological, and behavioral approaches, we found that *i*) the attraction for lipids is decreased in obese mice, *ii*) this behavioral change has an orosensory origin, *iii*) it is reversed in calorie-restricted DIO mice, revealing an inverse correlation between fat preference and adipose tissue size, *iv*) obesity suppresses the lipid-mediated downregulation of the lipid-sensor CD36 in circumvallate papillae, usually found during the refeeding of lean mice, and *v*) the CD36-dependent signaling cascade controlling the intracellular calcium levels ($[Ca^{2+}]_i$) in taste bud cells is decreased in obese mice. **Therefore, obesity alters the lipid-sensing system responsible for the oral perception of dietary lipids. This phenomenon seems to take place through a CD36-mediated mechanism, leading to changes in eating behavior.**—Chevrot, M., A. Bernard, D. Ancel, M. Buttet, C. Martin, S. Abdoul-Azize, J.-F. Merlin, H. Poirier, I. Niot, N. A. Khan, P. Passilly-Degrace, and P. Besnard. **Obesity alters the gustatory perception of lipids in the mouse: plausible involvement of lingual CD36.** *J. Lipid Res.* 2013. 54: 2485–2494.

Supplementary key words long-chain fatty acids • taste sensitivity • calcium imaging • health

Existence of an attraction for dietary lipids is observed in both rodents (1–3) and humans (4, 5). Over the last decade, mechanisms leading to this stereotyped behavior have been actively studied, and compelling evidence supports the implication of a taste component in the detection of lipids [i.e., long-chain fatty acids (LCFAs)], in addition to textural, olfactory and postingestive cues. In mice, it was shown that *i*) gene inactivation of two

unrelated LCFA receptors specifically expressed in taste buds (i.e., CD36 and GPR120) renders animals unable to properly detect lipids during behavioral tests (6, 7), *ii*) LCFAs trigger a signaling cascade in freshly isolated CD36-positive taste bud cells leading to a rise in $[Ca^{2+}]_i$ and to a neurotransmitter release (8, 9), and *iii*) the subsequent lipid signal uses peripheral and central nervous circuitry involved in gustation (7, 10). Recent data have highlighted important differences between lingual CD36 and GPR120 suggesting distinct, but complementary, functions in mouse taste buds. In contrast to GPR120, expression of CD36 protein in circumvallate papillae (CVP) is lipid sensitive (11). Indeed, lingual CD36 protein levels displayed a rapid decrease in CVP when fasted mice were re-fed a diet containing lipids. It was suggested that the lipid-mediated downregulation of CD36 in taste bud cells might modulate the motivation for fat consumption during a meal, initially high and then gradually decreasing secondary to the food intake, a phenomenon reminiscent of sensory-specific satiety (12). For GPR120, an implication in the glucagon-like peptide-1 (GLP-1) release by mouse CVP, producing a modulation of sweet and “fatty” taste sensitivity, was proposed (13).

Psychophysical experiments demonstrate that humans are also able to detect very low concentrations of LCFA in oral cavity under conditions in which textural and olfactory cues are minimized (14). Recent data suggest an implication of lingual CD36 in this phenomenon. Indeed, obese patients with the common single nucleotide polymorphism A/A genotype at rs1761667, known to reduce the CD36 gene expression (15), displayed a higher detection threshold (i.e., low fat perception sensitivity) for lipids than G/G controls (16) and showed a greater attraction for added fats and oils (17).

Abbreviations: CVP, circumvallate papillae; DIO, diet-induced obese; GLP-1, glucagon-like peptide-1; HF, high-fat; HFHS, high-fat/high-sucrose; LA, linoleic acid; LCFA, long-chain fatty acid; OLA, oleic acid.

¹M. Chevrot and A. Bernard contributed equally to this work.

²To whom correspondence should be addressed.

e-mail: pbesnard@u-bourgogne.fr

[§] The online version of this article (available at <http://www.jlr.org>) contains supplementary data in the form of one figure and four tables.

✦ Author's Choice—Final version full access.

Manuscript received 26 April 2013 and in revised form 5 July 2013.

Published, JLR Papers in Press, July 9, 2013

DOI 10.1194/jlr.M039446

Copyright © 2013 by the American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc.

This article is available online at <http://www.jlr.org>

Journal of Lipid Research Volume 54, 2013 2485



Supplemental Material can be found at:
<http://www.jlr.org/content/suppl/2013/07/09/jlr.M039446.DC1.html>

Therefore, genetic predispositions may affect the preference for fat, which might induce changes in eating behavior and obesity risk. Given the obesity epidemic, an important alternative issue is to determine whether obesity itself leads to changes in the orosensory perception of dietary fat. Interestingly, a relationship between orosensory sensitivity for lipids and body mass index has been recently reported in human (18). Moreover, a comparison of obese and nonobese children and adolescents for the detection of sweet, umami, bitter, salty, and sour tastes demonstrates that obesity affects taste sensitivity. Indeed, obese subjects display a low ability to correctly identify the different taste modalities (19). However, mechanisms involved in the modulation of taste sensitivity are poorly understood. To address this question, mice were subjected to nutritional challenges (obesogenic or calorie-restricted diets), and a combination of biochemical, physiological, and behavioral approaches was used to analyze the impact of obesity on fat preference.

MATERIALS AND METHODS

Animals and diets

French guidelines for the use and the care of laboratory animals were followed, and experimental protocols were approved by the Animal Ethics Committee of Burgundy University. Six week-old C57Bl/6 mice were purchased from Charles River Laboratories, France. Animals were housed in filtered cages in a controlled environment (constant temperature and humidity, dark period from 7 PM to 7 AM). The mice had free access to tap water during the experiment. After a 1 week acclimatization period, the mice were fed ad libitum either a standard laboratory chow (4RF21, Mucedola, Italy; containing 3% fat, w/w) or two different obesogenic diets: a high-fat (HF) diet, rich in saturated FAs and a high-fat/high-sucrose (HFHS) diet (Table 1). Some diet-induced obese (DIO) mice fed the HF diet were calorie restricted (= 60% energy of ad libitum energy intake). Body mass and food consumption were recorded weekly. Body composition (fat mass, lean mass, and total body water) was measured by EchoMRI (Echo Medical Systems; Houston, TX).

Tissues and blood samples

CVP from control and DIO mice were isolated according to the procedure described elsewhere (6). Briefly, lingual epithelium was separated from connective tissue by enzymatic dissociation (elastase and dispase mixture, 2 mg/ml each in Tyrode buffer: 140 mM NaCl, 5 mM KCl, 10 mM HEPES, 1 mM CaCl₂,

10 mM glucose, 1 mM MgCl₂, 10 mM Na pyruvate, pH 7.4), and the papilla was dissected under a binocular microscope. CVP were either used immediately for the calcium imaging assays or snap-frozen in liquid nitrogen then stored at -80°C until CD36 determination by Western blotting. Plasma was obtained after centrifugation of blood (5,000 g for 10 min, 4°C). Plasma insulin levels were assayed by using a commercial ELISA kit (Merckodia, Sweden), and plasma glucose and triglyceride levels were determined with enzymatic reaction kits (Biomerieux, France).

Behavioral experiments

Two different tests, consisting of offering simultaneously a control and an experimental solution (two-bottle preference test) or successively in a randomized manner (licking test) were used.

Two-bottle preference tests. Mice were offered two bottles at the beginning of the dark period for 12 h. Control and experimental bottles contained 0.3% xanthan gum (w/v; Sigma-Aldrich) in water in order to emulsify the oil and to minimize textural cues between the two solutions. Animals were subjected to a choice between control or oily solution containing 0.02%, 0.2%, and 2.0% rapeseed oil (w/v), successively. To avoid the development of side preference, position of each bottle was inverted at each test. At the end of the test, the consumption of each solution was analyzed by weighing the bottles, and the percent of preference for the experimental solution was calculated (ratio consumption of the experimental solution upon total consumption).

Licking tests. This test was performed to analyze the short-term (1–5 min) preference for an LCFA by using computer-controlled lickometers (Med Associates). Animals were successively subjected to the control or the experimental solution, and the number of licks given on each bottle by min was determined. Mice were food and water deprived 6 h before the test, which took place 6 h after the beginning of the dark period. After a training period required to learn the procedure, mice were randomly subjected to a bottle containing a control solution (mineral oil; Cooper, France) or a bottle containing an experimental one [mineral oil + 0.5% oleic acid (OLA); Sigma-Aldrich] for 15 min. Then mice were offered the other bottle for an additional 15 min session. In this experiment, data were analyzed for 1 or 5 min from the first lick to exclude postingestive signals. OLA was chosen because it is the main LCFA found in rapeseed oil.

Immunohistochemistry

CVP from fasted control and DIO mice were fixed for 3 h in ice-cold 4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.4. Samples were cryoprotected by incubation in 15% sucrose in 0.1 M phosphate buffer for 2 h, followed by overnight treatment

TABLE 1. Diet composition

Contents (% w/w)	HF		HFHS	
	Control (4RF21 Mucedola)	HF (4RF25 Mucedola + Palm oil)	Control (Research Diet)	HFHS (Research Diet)
Proteins	18.5	15.0	19	26.2
Carbohydrates				
Starch	53.5	34.41	63.1	—
Sucrose	—	—	—	26.1
Fats				
Soya oil	3	2.4	6.5	3.2
Palm	—	31.8	—	—
Lard	—	—	—	31.7
of which				
Saturated FA	0.5	16.7	1	16.3
Monounsaturated FA	0.5	13.0	1.6	13.4
Polyunsaturated FA	1.3	4.5	3.9	5.1
Energy (kcal/100g)	315	505.8	386.9	523.2

Supplemental Material can be found at:
<http://www.jlr.org/content/suppl/2013/07/09/jlr.M039446.DC1.html>

with 30% sucrose in phosphate buffer. CVP were then embedded in OCT medium (Tissue-Tek; Sakura Finetek) and stored at -80°C . Cryostat sections (10 μm) were air dried for 45 min at room temperature and rehydrated in 0.1 M PBS (pH 7.4) for 10 min. Rehydrated sections were blocked in 10% FA-free BSA and 0.2% Triton X-100 in PBS for 1 h at room temperature and incubated overnight at 4°C with a polyclonal anti-rabbit CD36 antibody (1:50; Abcam ab80978). After washing, sections were incubated for 3 h at room temperature with a fluorescent anti-rabbit secondary antibody (Alexa 568, 1:200 dilution; Invitrogen) and then counterstained with Hoechst reactive (0.05 mg/ml; Sigma-Aldrich) to stain the nuclei. Slices were analyzed under an epifluorescent microscope (Axiovert 200M). No fluorescent staining was observed when the primary antibody was omitted.

Western blotting

Freshly isolated mouse CVP were homogenized using a micro-potter in a TSE buffer [50 mM Tris HCl, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Igepal CA-630, 5 $\mu\text{l}/\text{ml}$ anti-protease cocktail (Sigma-Aldrich), and 100 $\mu\text{l}/10\text{ ml}$ antiphosphatase (Thermo Fischer)]. Samples were stored on ice for 30 min and then centrifuged (12,000 g, 15 min, 4°C). Lysates were used immediately or stored at -80°C until the assay. Protein concentrations in homogenates were assayed using a BCA kit (Thermo Fisher). Denatured proteins (4 μg) were separated by SDS-PAGE (10%) and transferred to a polyvinylidene difluoride membrane by electroblotting. After being blocked overnight using a TBS buffer containing 5% BSA and 0.05% Tween-20, membranes were incubated for 3 h with an anti-CD36 antibody (1:1,000 dilution; R and D Systems). After a set of washes, the appropriate peroxidase-conjugated secondary antibody was added. Antibody labeling was detected by chemiluminescence (ECL-plus reagent; Perkin Elmer). β -Actin (1:100 dilution; Santa Cruz) was used as an internal reference protein.

Each point corresponds to a pool of total proteins from three mice CVP. Each experiment was repeated three times.

Measurement of Ca^{2+} signaling

CD36-positive taste buds cells were freshly isolated from mouse CVP as described previously (8, 10) and further cultured for 24 h in Willco-Dish wells containing RPMI-1640 medium, supplemented with 10% fetal calf serum, 200 U/ml penicillin, and 0.2 mg/ml streptomycin. The following day, the CD36-positive taste bud cells were gently washed with a buffer containing the following: 3.5 mM KH_2PO_4 ; 17.02 mM Na_2HPO_4 ; 136 mM NaCl, pH 7.4. The cells were then incubated with Fura-2/AM (1 μM) for 60 min at 37°C in loading buffer that contained the following: 110 mM NaCl; 5.4 mM KCl; 25 mM NaHCO_3 ; 0.8 mM MgCl_2 ; 0.4 mM KH_2PO_4 ; 20 mM HEPES-Na; 0.33 mM Na_2HPO_4 ; 1.2 mM CaCl_2 , pH 7.4.

After loading, the cells ($2 \times 10^6/\text{ml}$) were washed three times and remained suspended in the identical buffer. The changes in intracellular Ca^{2+} (F_{340}/F_{380}) were monitored under the Nikon microscope (TiU) by using an S-fluor 40 \times oil immersion objective. The planes were taken at Z intervals of 0.3 μm , and NIS-Elements software was used to deconvolve the images. The microscope was equipped with an EM-CCD (Lucas) camera for real-time recording of 16 bit digital images. The dual excitation fluorescence imaging system was used for studies of individual cells. The changes in intracellular Ca^{2+} were expressed as ΔRatio , which was calculated as the difference between the peak F_{340}/F_{380} ratio. The data were summarized from the large number of individual cells (20–40 cells in a single run, with three to nine identical experiments done in at least three cell preparations). For experiments in Ca^{2+} -free medium, CaCl_2 was replaced by EGTA (2 mM).

Each point corresponds to a pool of total proteins from 25 mice CVP. Each experiment was repeated three times.

Statistics

Results are expressed as mean \pm SEM. The significance of differences between groups was evaluated with XLSTAT (Addinsoft; France). We first checked that the data for each group were normally distributed and that variances were equal. We then carried out two-tailed Student's *t*-tests, Mann-Whitney tests, or Pearson correlation.

RESULTS

Mice fed an HF diet display a lower preference for lipids

To explore whether the preference for lipid-rich foods might be affected by eating habits leading to obesity, mice were chronically fed obesogenic diets (Table 1). As expected, animals chronically subjected to the HF diet rapidly developed obesity (Fig. 1A). A 2- and 3-fold increase in fat mass was found after 4 and 23 weeks of diet, respectively. Fasted plasma glucose levels and insulinemia were also enhanced in DIO mice, suggesting the development of insulin resistance at only 4 weeks of treatment (Fig. 1B). Long-term (12 h) two-bottle preference tests performed in control mice subjected to different concentrations of rapeseed oil (0.01–2.0% w/v) established that animals were able to detect and prefer oily solution when lipid concentration reached 0.02% in emulsion, the maximal preference being observed with 2.0% oil (13). In contrast to controls, DIO mice were unable to properly detect a low concentration of oil (0.02%) whatever the duration of the treatment (4 and 23 weeks). Moreover, mice fed a HF diet for 4 or 23 weeks showed a lower attraction for 2.0% oily solution than controls (Fig. 1C). Altogether, these data indicate that the chronic consumption of HF diet increases the detection threshold (decreased sensitivity) for lipids. Similar results were obtained when mice were chronically fed another obesogenic diet [high-fat/high-sucrose (HFHS) diet, supplementary data I], suggesting that it is the induction of obesity, rather than the qualitative diet composition, that might be the major determinant of this behavioral change.

Preference for lipids is inversely correlated with the fat mass in the mouse

To explore whether this relative orosensory indifference to dietary lipids was related to the fat mass, mice fed the HF diet ad libitum for 4 weeks were then subjected to a caloric restriction [i.e., 60% (w/w) of the previous HF diet consumption] until their fat mass returned to control values (Fig. 2A). Comparative analysis of preference tests performed during the weight gain/weight loss sequence revealed that the preference for lipids was tightly related to fat mass in the mouse. Indeed, mice fed the calorie-restricted diet displayed a behavior similar to that of controls maintained on regular chow, with a greater preference for 0.2% and 2.0% oil than that found when they were obese (Fig. 2B). A significant inverse correlation between attraction for fat and adiposity was found (Fig. 2C). A similar

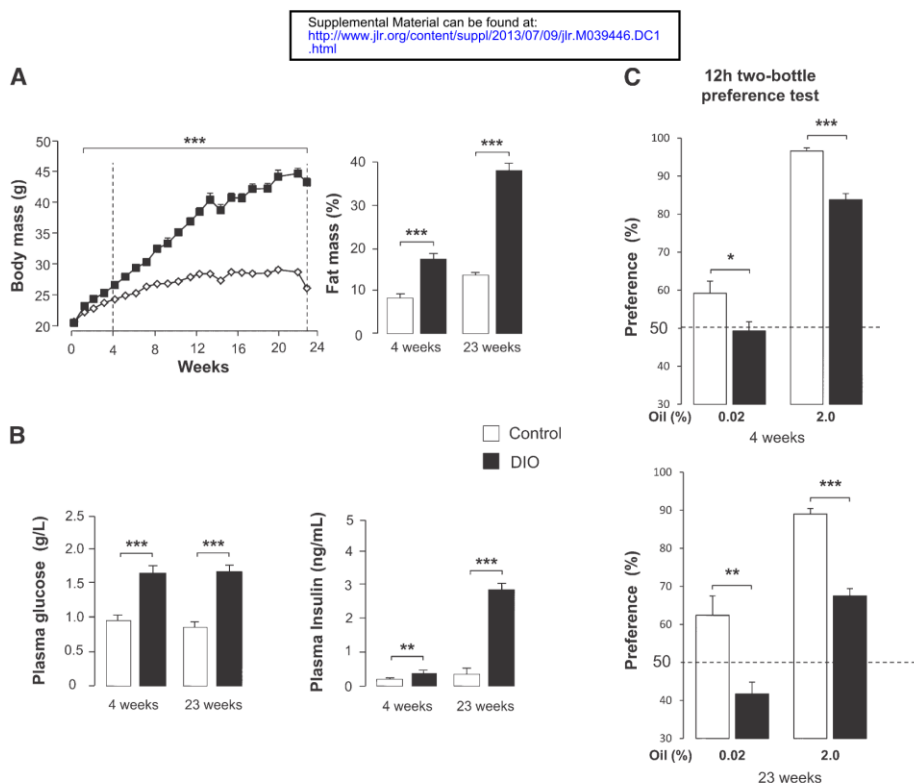


Fig. 1. Comparison of body composition, blood parameters, and preference for lipids in controls and mice subjected to DIO for 4 and 23 weeks. **A:** Evolution of body and fat mass in controls and DIO mice. Means \pm SEM, (n = 40). $P < 0.001$ (***). **B:** Plasma glucose and insulin levels in overnight fasted controls and DIO mice. Means \pm SEM (n = 20). $P < 0.01$ (**) and $P < 0.001$ (***). **C:** Long-term (12 h) two-bottle preference tests performed in controls and DIO mice. Animals were simultaneously subjected for 12 h to a control solution (0.3% xanthan gum in water, w/v) and to a test solution containing rapeseed oil (0.02 or 2.0%, w/v) in the control solution. Xanthan gum was used to minimize textural cues and to emulsify rapeseed oil. Dotted line represents the absence of preference. Means \pm SEM (n = 10–12). $P < 0.05$ (*), $P < 0.01$ (**), and $P < 0.001$ (***).

association was also found in HFHS-fed mice subjected to the licking paradigm. Indeed, the preference for OLA, determined using brief (5 min) computer-controlled licking tests and the fat mass accumulation assayed by echo-MRI, supports the fact that orosensory detection of lipids is dependent on adipose tissue size (Fig. 2D). Although most taste bud cells express insulin receptor (20), obesity-associated insulin resistance does not play a role in the preference for oily solution. Indeed, no correlation between plasma insulin levels and fat preference was found in controls, DIO, or DIO-restricted mice (Fig. 3).

Lipid-mediated regulation of CD36 protein levels in gustatory papillae is impaired by DIO

In gustatory mucosa, CD36 is thought to be a lipid receptor implicated in the orosensory detection of dietary lipids (i.e., LCFA). To determine whether the lower lipid preference found in obese mice was related to lingual CD36 protein, comparison of immunolocalization of CD36 was undertaken in CVP from overnight-fasted controls and DIO mice. As shown in Fig. 4A, CD36 displays the same expression pattern in obese as in control mice. To confirm

this observation, Western blotting analysis was performed in CVP. Similar expression levels of CD36 were found in control and obese mice, whatever the duration of HF diet (Fig. 4B) or the composition of obesogenic diet used (HFHS - supplementary data II). It was recently reported in mouse CVP that CD36 protein levels are downregulated by lipids during the postprandial period (11), and a disturbance in this regulation affects the spontaneous attraction for fat (13). Therefore, it was tempting to speculate that the lower attractive effect of oily solutions found in obese mice might be due to a dysfunction in this regulatory loop controlling the amounts of CD36 in CVP during a meal. To explore this hypothesis, CD36 protein levels in CVP were compared in fasted and refed controls and DIO mice. Because CD36 in CVP is lipid sensitive and its postprandial decrease is significant 60 min after the beginning of a meal (11), animals were refed the HF diet for 1 h. Consistent with data shown in Fig. 4B, fasted controls and DIO mice displayed similar CD36 expression levels in CVP. By contrast, the drop in CD36 content of CVP found 1 h after refeeding in controls was not retrieved in obese mice (Fig. 4C).



Supplemental Material can be found at:
<http://www.jlr.org/content/suppl/2013/07/09/jlr.M039446.DC1.html>

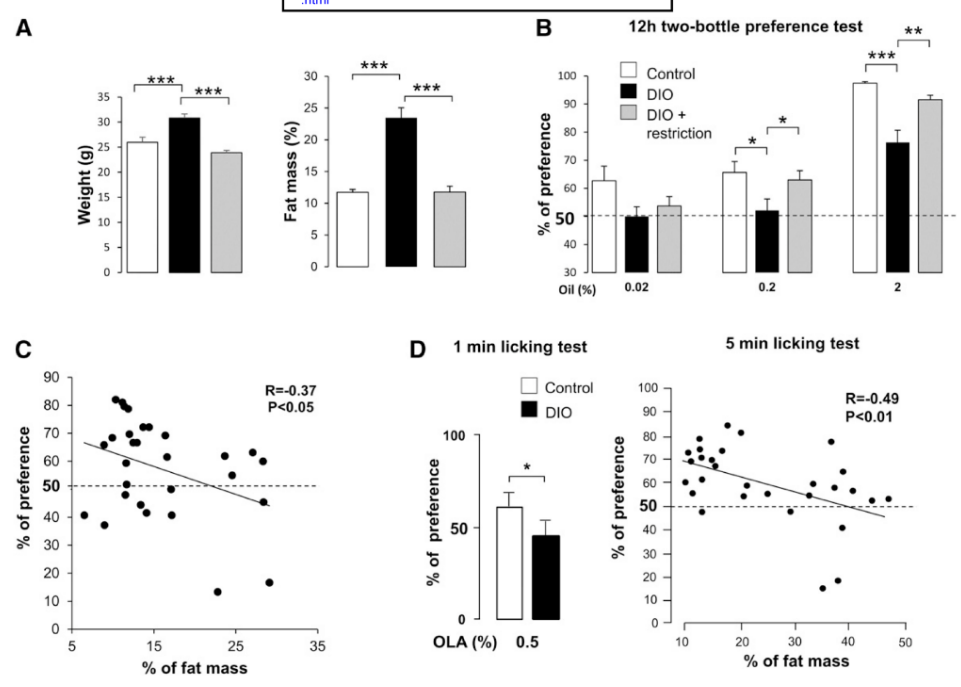


Fig. 2. Effects of fat mass on the preference for lipids in the mouse. A: Evolution of body mass and fat mass in controls, DIO, and energy-restricted DIO mice. Body fat mass was determined at 8 weeks using a quantitative echo-MRI. Means \pm SEM (n = 10). $P < 0.001$ (***). B: Long-term (12 h) two-bottle preference tests performed after 8 weeks of experiment in control, DIO, and energy-restricted DIO mice. Animals were simultaneously subjected, for 12 h, to a control solution (0.3% xanthan gum in water, w/v) and a test solution containing rapeseed oil (0.02, 0.2, or 2.0%, w/v) in the control solution. Xanthan gum was used to minimize textural cues and to emulsify rapeseed oil. Dotted line represents the absence of preference. Means \pm SEM (n = 9–10), $P < 0.05$ (*), $P < 0.01$ (**), and $P < 0.001$ (***). C: Correlation between fat mass (in percent of body mass) and preference for rapeseed oil (%) determined by using the two-bottle preference tests performed in controls, DIO, and energy-restricted DIO mice. Dotted line represents the absence of preference. D: Short-term (1 min) licking tests in controls and DIO (HFHS diet) mice. Animals were subjected successively in a randomized manner to a control solution (mineral oil) or to 0.5% OLA in the control solution. Dotted line represents the absence of taste preference. Means \pm SEM (n = 7–6), $P < 0.05$ (*). A correlation between the fat mass (in percent body mass) and the preference for OLA (%) determined using licking tests is also represented. Dotted line represents the absence of preference.

Obesity disturbs the calcium signaling in CD36-positive gustatory cells from CVP

In mouse CVP, LCFA-mediated activation of CD36 triggers a complex signaling cascade, producing a huge rise in intracellular free calcium concentrations ($[Ca^{2+}]_i$) at the

origin of neurotransmitters release (8–10). To assess whether obesity-mediated decrease in fat preference is due to a dysfunction in the CD36-dependent signaling, calcium imaging experiments were performed on freshly purified CD36-positive taste bud cells from control or from mice

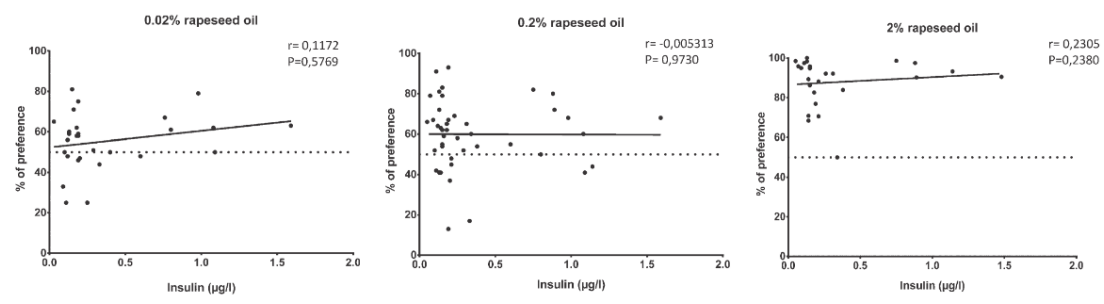


Fig. 3. Correlation between plasma insulin levels and preference for fat. Experiments were performed in controls, DIO, and energy-restricted DIO mice subjected to two-bottle preference tests in the presence of various concentrations of rapeseed oil. Dotted line represents the absence of preference. Plasma insulin levels were assayed using a commercial kit.

Supplemental Material can be found at:
<http://www.jlr.org/content/suppl/2013/07/09/jlr.M039446.DC1.html>

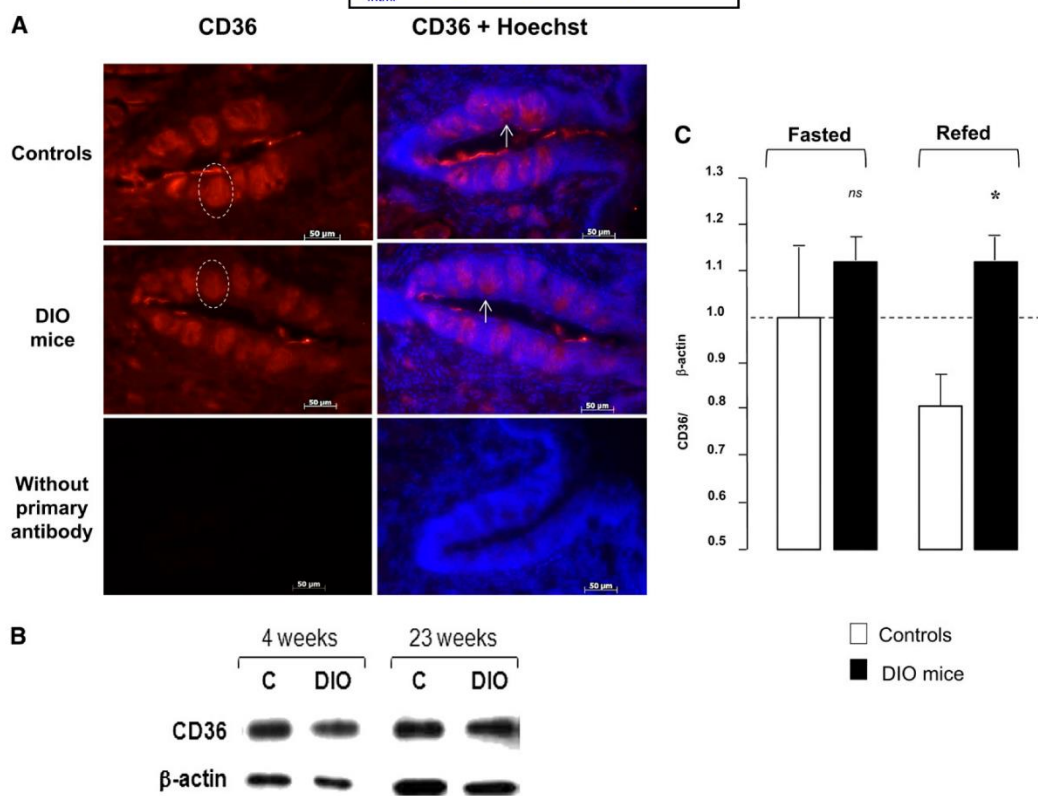


Fig. 4. Effect of DIO on the lipid-mediated regulation of CD36 protein levels in gustatory papillae in mice. **A:** Immunohistochemistry analysis of CD36 expression in CVP from overnight-fasted controls and DIO mice subjected to the HF diet for 4 weeks. Dotted circles show one of the taste buds in CVP. Arrows point to examples of apical location of CD36 in taste buds. No fluorescent staining was observed when the primary antibody was omitted. **B:** Relative CD36 protein levels determined by Western blotting in CVP from overnight-fasted controls and DIO mice subjected to the HF diet for 4 and 23 weeks. Each point corresponds to a pool of total proteins from three mice CVP. **C:** Relative CD36 protein levels determined by Western blotting in CVP from controls and DIO (HF diet for 4 weeks) mice fasted overnight or refed ad libitum the HF diet for 1 h. Each point corresponds to a pool of total proteins from five mice CVP. Means \pm SEM ($n = 3$), $P < 0.1$ (*). ns, nonsignificant.

fed the HF for 4 weeks. The effects of the two main LCFAs present in rapeseed oil, i.e., linoleic acid (LA) and OLA, were studied. Consistent with previously published data (8, 10), addition of LA or OLA led to a rapid rise in $[Ca^{2+}]_i$ in taste bud cells from control mice (Fig. 5A). LCFA-evoked rise in $[Ca^{2+}]_i$ in a medium containing calcium (100% Ca^{2+}) was found to be decreased, albeit to a lesser extent, in the absence of calcium (0% Ca^{2+}), suggesting that LCFA led to the recruitment of calcium from both extra- and intracellular pools (Fig. 5A). Although taste bud cells isolated from CVP of obese mice were responsive to LA or OLA (Fig. 5B), $[Ca^{2+}]_i$ rises were dramatically lower than those found in CVP from lean controls in 0 or 100% calcium media (Fig. 5C).

DISCUSSION

Obesity is one of the major public health challenges in the world by reason of the deleterious effects of its associated

diseases (i.e., type 2 diabetes, vascular disorders, hypertension, cancer). Although the origin of the obesity epidemic is clearly multi-factorial, eating habits, especially overconsumption of high-palatable energy-dense foods, are thought to play a significant role in this situation (4). Several lines of evidence indicate that laboratory rodents and humans display a preference for lipid-rich foods through poorly known mechanisms (21, 22). However, whether preference for fat is the cause and/or the consequence of obesity remains to be elucidated. The present report brings the first demonstration that DIO alters the gustatory pathway involved in the detection of dietary lipids in the mouse. Obese mice not only are unable to properly detect low concentrations of oil (0.02%), but also display a weaker preference for high concentrations (2.0% oil) than do controls, demonstrating that obesogenic diets enhance the oral detection threshold (i.e., decrease the sensitivity) for lipids. It is noteworthy that the composition of the energy-dense diets used, especially the addition of sucrose, does not seem to play a significant role in this

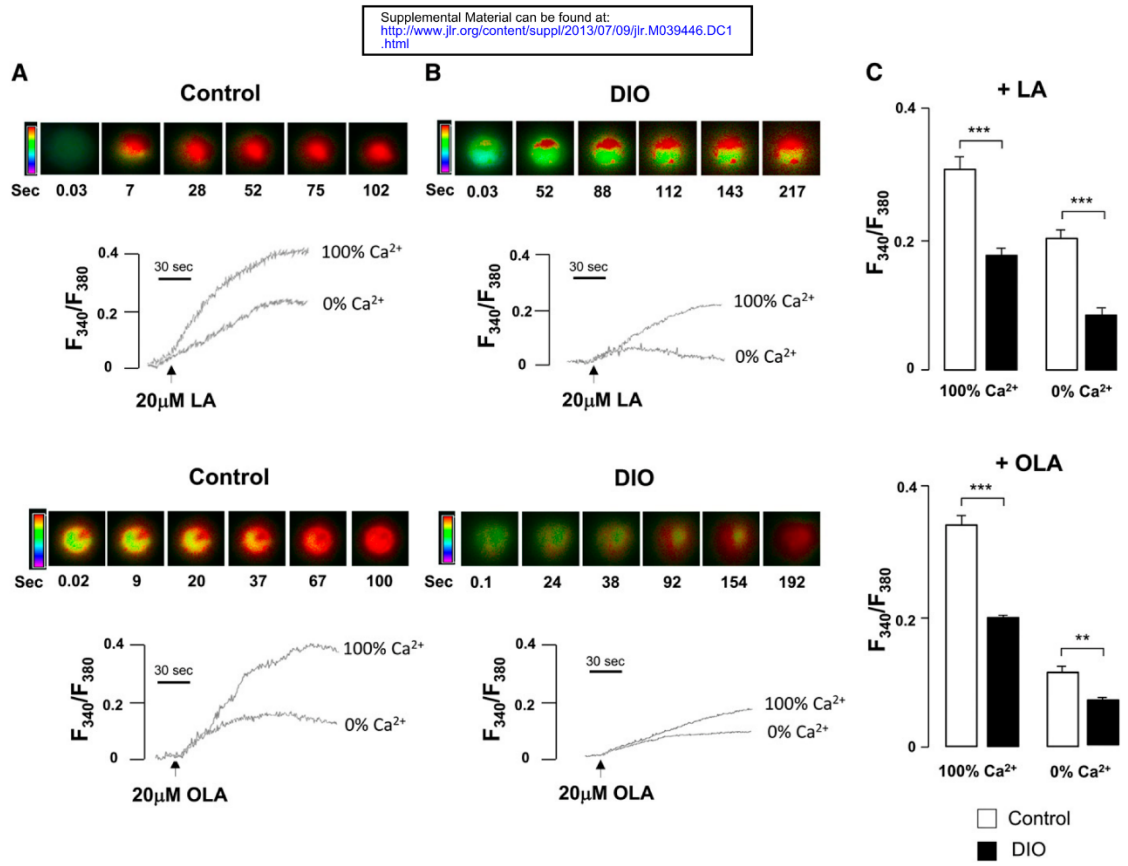


Fig. 5. Effects of DIO on the lipid-mediated regulation of the calcium signaling in CD36-positive taste bud cells. Ca^{2+} imaging studies were performed in Ca^{2+} -free (0% Ca^{2+}) or in calcium-containing (100% Ca^{2+}) media. The changes in intracellular Ca^{2+} (F_{340}/F_{380}) were monitored under the Nikon microscope (TiU) by using S-fluor 40× oil immersion objectives, as described in the Materials and Methods section. Colored time-lapse changes show the kinetics of the rise in $[Ca^{2+}]_i$ levels in a CD36-positive taste bud cell freshly isolated from CVP from controls and DIO (HF for 4 weeks) mice following addition of 20 μ M LA or OLA in the medium. The arrows indicate when LA or OLA was added into the cuvette without interruptions in the recording. Representative data found in controls (A) and DIO mice (B). C: Bar graphs showing the changes in $[Ca^{2+}]_i$ obtained by pooling data from three separate experiments. Means \pm SEM, (n = 7), $P < 0.01$ (**) and $P < 0.001$ (***).

behavioral change, because the two obesogenic diets used have produced similar results (Fig. 1 and SD 1).

A similar rightward shift in the dose response to oil was also observed in obesity-altering central reward functions in DIO rats (23). Our data strongly suggest that obesity also disturbs the function of the peripheral orosensory system, because a lower preference for lipids is reproduced in obese mice by the use of computer-controlled licking tests in conditions minimizing postingestive influences (1–5 min). Although oral lipase activity is especially efficient in the mouse (24) and is involved in the detection threshold of lipids in human (16), a decrease in the expression and/or activity of lingual lipase in obese mice seems unlikely. Indeed, DIO animals also displayed a low attraction for solutions containing a free FA (OLA). Our data support the fact that the size of fat mass is a major determinant for the modulation of oral fat sensitivity. Indeed, a reversal of obesity by a chronic food restriction corrects the detection thresholds and preference for oily

solutions. Moreover, lipid preference (explored by using short-term licking tests) is inversely correlated to fat mass (assayed by echo-MRI) (Fig. 2). The disturbance in the attraction for lipids found in DIO mice appears to be independent of obesity-associated insulin resistance because a correlation between preference for fat and plasma insulin levels is lacking (Fig. 3).

These findings prompted us to explore the mechanism responsible for the obesity-mediated decrease in oral fat detection. CD36 expression in CVP from lean and obese mice was investigated. Indeed, lingual CD36 is known to play a major role in the preference for fat. Furthermore, CD36 expression is lipid-sensitive in mouse CVP (11). Finally, a decrease in CD36 expression level was recently reported in the gustatory mucosa of DIO rats (25). We did not observe such a change in fasted DIO mice regardless of the obesogenic diets used (Fig. 4 and SD 2). This discrepancy might be due to experimental differences (e.g., duration of treatment, composition of diets) that might

Supplemental Material can be found at:
<http://www.jlr.org/content/suppl/2013/07/09/jlr.M039446.DC1.html>

lead to a different inflammatory status. Indeed, inflammation interferes with taste cell renewal (26). The fact that the number of taste buds is clearly decreased in CVP from obese rats (25), in contrast to that found in obese mice (Fig. 4A), is consistent with this assumption. By contrast, we have found that the dynamic downregulation of lingual CD36 protein levels, previously observed during the re-feeding of fasted lean mice (11, 13), was not retrieved in obese animals. A similar CD36 dysfunction in CVP had already been identified in GLP-1R-null mice in which attraction for oily solutions was also reduced (13). Direct evidence of a differential change in the cell surface expression of CD36 in CVP from lean and obese mice seems unrealistic by reason of the scarcity of the biological material (1 CVP per mouse, containing a few dozen taste buds constituted of a few dozen CD36-expressing cells). The recent development of a human fungiform taste cell line could be a good alternative approach to get more information on this aspect in the future (27). Altogether our data strongly suggest that the lack of preference of obese mice for fat might be due to alterations in the lipid-sensing system related to the lingual CD36. Consistent with this assumption, a reduction of the LCFA-mediated Ca^{2+} mobilization was observed using calcium imaging in CD36-positive taste bud cells freshly isolated from DIO mice, as compared with their lean counterparts (Fig. 5). This finding brings the first demonstration that obesity affects the

lipid-mediated calcium signaling in taste bud cells. Although CD36 and GPR120 may be coexpressed in taste bud cells (13), it is tempting to speculate that the lower calcium response to LCFA found in CVP of obese mice is mainly dependent on CD36. Indeed, calcium response to LA was deeply reduced when taste bud cells were previously treated with the specific and irreversible CD36 binding inhibitor sulfo-*N*-succinimidyl-oleate or in CD36-negative TBC (10).

The following working model, reconciling the present data with those of the literature, might explain the role played by the lingual CD36 in the decreased fat preference found in DIO mice. In lean animals (Fig. 6A), *i*) LCFA binding to lingual CD36 might induce its translocation in lipid-rafts, mostly found in the apical side of mature taste bud cells (1, 28); *ii*) by promoting the interaction of CD36 with Src-PTK (29), this event would trigger the signaling cascade (8); *iii*) this early event, which might contribute to the attraction for fatty foods at the beginning of a meal (11), would be followed by a progressive disappearance of CD36 from the plasma membrane which might occur via a caveolae-mediated endocytotic process (28); *iv*) once in the cell, CD36 might undergo a degradation by the ubiquitin/proteasome pathway, as previously demonstrated in the small intestine (30). This CD36 downregulation might lead to a progressive decrease in the preference for fatty foods during a meal by reason of a

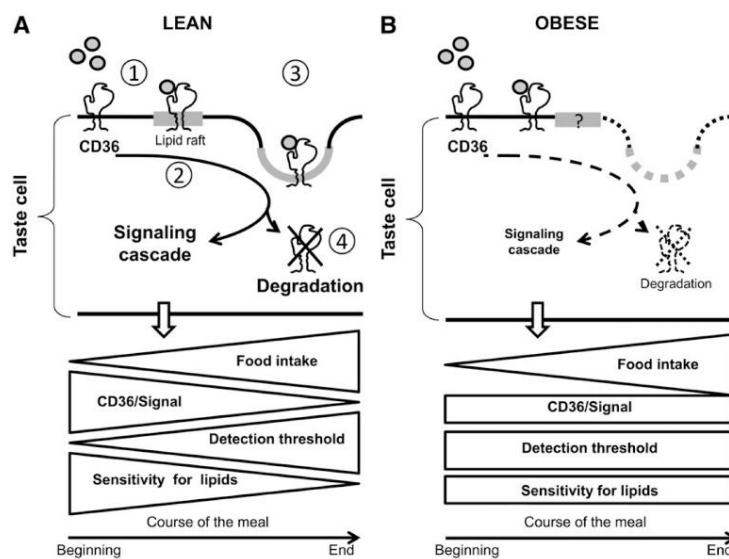


Fig. 6. Working hypothesis. A: The following scenario might explain the relationship between lingual CD36 and preference for lipids in control animals. At the beginning of a meal, the LCFA/CD36 complex in the lipid rafts (1) activates the lipid-dependent signaling cascade in taste bud cells (2). This event is followed by a progressive endocytosis (3) and the degradation of CD36 by the ubiquitin/proteasome pathway (4). This downregulation is responsible for a gradual enhancement of the orosensory detection threshold of lipids, leading to a progressive decrease of the preference for fat during a meal. B: Obesity might impair this regulatory cascade by limiting the amount of CD36 in lipid rafts and thus, the subsequent signaling and degradation of CD36. In consequence, the CD36 levels in the plasma membrane and the related signaling cascade remain relatively stable during a meal in obese mice, as the lipid detection threshold and preference for fat, in contrast to what occurs in lean animals.



Supplemental Material can be found at:
<http://www.jlr.org/content/suppl/2013/07/09/jlr.M039446.DC1.html>

gradual rise in the lipid detection threshold (i.e., a loss of sensitivity) (11). We postulate that obesity might impair this signaling machinery by limiting the CD36 amounts in lipid rafts, which might restrain the subsequent signaling cascade and CD36 degradation. In these conditions, plasma membrane CD36 levels, related signaling, lipid detection threshold, and preference for fat might remain relatively stable during a meal (Fig. 6B). The lower preference for lipids found in DIO mice is consistent with such a scenario. An abnormal cell surface CD36 location was also found in muscular cells derived from obese patients (31), suggesting that obesity affects the distribution of CD36 in different cell types. The origin of this dysfunction remains to be established. A decrease in plasma membrane fluidity due to chronic overconsumption of saturated fat, endocrine disturbances (e.g., insulin resistance, hyperleptinemia, drop in the plasma GLP-1 levels), and/or inflammation related to obesity are plausible candidates. Consistent with this idea, insulin, leptin, and GLP-1 receptors are found in TBC (20, 32, 33). Moreover, plasma membrane localization of CD36 is controlled by insulin in myocytes (34), whereas leptin acts as a modulator of sweet taste (32), and fat taste sensitivity is controlled by GLP-1 (13). Finally, it has recently been reported that a lipopolysaccharide-induced inflammation disturbs the physiology of gustatory papillae in the mouse (26).

Our results provide the first evidence that obesity may impair the orosensory detection of free LCFA via a mechanism in which the lingual CD36 plays a role in the mouse. This phenomenon seems to be tightly linked to the size of the fat mass. Because CD36 is also expressed in human taste buds (35), and because induced weight loss by bariatric surgery improves taste acuity, rendering energy-dense foods less pleasant (36), such a dysregulation might also exist in humans. Given that the peripheral gustatory system potentially influences food choice and, thus, eating behavior (37), a better understanding of the regulatory loops controlling the function of lipid receptors expressed in taste buds might open novel avenues in the pharmacological and/or nutritional treatment of obesity. **doi:10.1194/jlr.R130.024014**

This work was supported by the Burgundy Council and Centre National Interprofessionnel de l'Economie Laitière (CNIEL) (HumanFATaste program, to P.B.) and the FUI SYMPA (for the HFHS experiments). M.C. is a PhD fellow of the HumanFATaste program. The authors thank Jean-Christophe Blanchard for animal management and André Bouchot from CellimaP (Burgundy University) for cellular imagery.

REFERENCES

1. Tsuruta, M., T. Kawada, T. Fukuwatari, and T. Fushiki. 1999. The orosensory recognition of long-chain fatty acids in rats. *Physiol. Behav.* **66**: 285–288.
2. Takeda, M., M. Imaizumi, and T. Fushiki. 2000. Preference for vegetable oils in the two-bottle choice test in mice. *Life Sci.* **67**: 197–204.
3. Takeda, M., M. Imaizumi, S. Sawano, Y. Manabe, and T. Fushiki. 2001. Long-term optional ingestion of corn oil induces excessive caloric intake and obesity in mice. *Nutrition.* **17**: 117–120.

4. Drewnowski, A., and M. R. Greenwood. 1983. Cream and sugar: human preferences for high-fat foods. *Physiol. Behav.* **30**: 629–633.
5. Nysenbaum, A. N., and J. L. Smart. 1982. Sucking behaviour and milk intake of neonates in relation to milk fat content. *Early Hum. Dev.* **6**: 205–213.
6. Laugerette, F., P. Passilly-Degrace, B. Patris, I. Niot, M. Febbraio, J. P. Montmayeur, and P. Besnard. 2005. CD36 involvement in orosensory detection of dietary lipids, spontaneous fat preference, and digestive secretions. *J. Clin. Invest.* **115**: 3177–3184.
7. Cartoni, C., K. Yasumatsu, T. Ohkuri, N. Shigemura, R. Yoshida, N. Godinot, J. le Coutre, Y. Ninomiya, and S. Damak. 2010. Taste preference for fatty acids is mediated by GPR40 and GPR120. *J. Neurosci.* **30**: 8376–8382.
8. El-Yassimi, A., A. Hichami, P. Besnard, and N. A. Khan. 2008. Linoleic acid induces calcium signaling, Src kinase phosphorylation, and neurotransmitter release in mouse CD36-positive gustatory cells. *J. Biol. Chem.* **283**: 12949–12959.
9. Dramane, G., S. Abdoul-Azize, A. Hichami, T. Vogtle, S. Akpona, C. Chouabe, H. Sadou, B. Nieswandt, P. Besnard, and N. A. Khan. 2012. STIM1 regulates calcium signaling in taste bud cells and preference for fat in mice. *J. Clin. Invest.* **122**: 2267–2282.
10. Gaillard, D., F. Laugerette, N. Darcel, A. El-Yassimi, P. Passilly-Degrace, A. Hichami, N. A. Khan, J. P. Montmayeur, and P. Besnard. 2008. The gustatory pathway is involved in CD36-mediated orosensory perception of long-chain fatty acids in the mouse. *FASEB J.* **22**: 1458–1468.
11. Martin, C., P. Passilly-Degrace, D. Gaillard, J. F. Merlin, M. Chevrot, and P. Besnard. 2011. The lipid-sensor candidates CD36 and GPR120 are differentially regulated by dietary lipids in mouse taste buds: impact on spontaneous fat preference. *PLoS ONE.* **6**: e24014.
12. Rolls, E. T. 1984. The neurophysiology of feeding. *Int. J. Obes. 8 (Suppl.)*: 139–150.
13. Martin, C., P. Passilly-Degrace, M. Chevrot, D. Ancel, S. M. Sparks, D. J. Drucker, and P. Besnard. 2012. Lipid-mediated release of GLP-1 by mouse taste buds from circumvallate papillae: putative involvement of GPR120 and impact on taste sensitivity. *J. Lipid Res.* **53**: 2256–2265.
14. Chalé-Rush, A., J. R. Burgess, and R. D. Mattes. 2007. Evidence for human orosensory (taste?) sensitivity to free fatty acids. *Chem. Senses.* **32**: 423–431.
15. Love-Gregory, L., R. Sherva, T. Schappe, J. S. Qi, J. McCreary, S. Klein, M. A. Connelly, and N. A. Abumrad. 2011. Common CD36 SNPs reduce protein expression and may contribute to a protective atherogenic profile. *Hum. Mol. Genet.* **20**: 193–201.
16. Pepino, M. Y., L. Love-Gregory, S. Klein, and N. A. Abumrad. 2012. The fatty acid translocase gene CD36 and lingual lipase influence oral sensitivity to fat in obese subjects. *J. Lipid Res.* **53**: 561–566.
17. Keller, K. L., L. C. Liang, J. Sakimura, D. May, C. van Belle, C. Breen, E. Driggin, B. J. Tepper, P. C. Lanzano, L. Deng, et al. 2012. Common variants in the CD36 gene are associated with oral fat perception, fat preferences, and obesity in African Americans. *Obesity (Silver Spring).* **20**: 1066–1073.
18. Stewart, J. E., C. Feinle-Bisset, M. Golding, C. Delahunty, P. M. Clifton, and R. S. Keast. 2010. Oral sensitivity to fatty acids, food consumption and BMI in human subjects. *Br. J. Nutr.* **104**: 145–152.
19. Overberg, J., T. Hummel, H. Krude, and S. Wiegand. 2012. Differences in taste sensitivity between obese and non-obese children and adolescents. *Arch. Dis. Child.* **97**: 1048–1052.
20. Suzuki, Y., M. Takeda, Y. Sakakura, and N. Suzuki. 2005. Distinct expression pattern of insulin-like growth factor family in rodent taste buds. *J. Comp. Neurol.* **482**: 74–84.
21. Mattes, R. D. 2011. Accumulating evidence supports a taste component for free fatty acids in humans. *Physiol. Behav.* **104**: 624–631.
22. Gaillard, D., P. Passilly-Degrace, and P. Besnard. 2008. Molecular mechanisms of fat preference and overeating. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1141**: 163–175.
23. Shin, A. C., R. L. Townsend, L. M. Patterson, and H. R. Berthoud. 2011. "Liking" and "wanting" of sweet and oily food stimuli as affected by high-fat diet-induced obesity, weight loss, leptin, and genetic predisposition. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **301**: R1267–R1280.
24. Kawai, T., and T. Fushiki. 2003. Importance of lipolysis in oral cavity for orosensory detection of fat. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **285**: R447–R454.
25. Zhang, X. J., L. H. Zhou, X. Ban, D. X. Liu, W. Jiang, and X. M. Liu. 2011. Decreased expression of CD36 in circumvallate taste buds of high-fat diet induced obese rats. *Acta Histochem.* **113**: 663–667.

Supplemental Material can be found at:
<http://www.jlr.org/content/suppl/2013/07/09/jlr.M039446.DC1.html>

26. Cohn, Z. J., A. Kim, L. Huang, J. Brand, and H. Wang. 2010. Lipopolysaccharide-induced inflammation attenuates taste progenitor cell proliferation and shortens the life span of taste bud cells. *BMC Neurosci.* **11**: 72.
27. Ozdener, H., A. I. Spielman, and N. E. Rawson. 2012. Isolation and culture of human fungiform taste papillae cells. *J. Vis. Exp.* (63) e3730.
28. Ilegems, E., K. Iwatsuki, Z. Kokrashvili, O. Benard, Y. Ninomiya, and R. F. Margolskee. 2010. REEP2 enhances sweet receptor function by recruitment to lipid rafts. *J. Neurosci.* **30**: 13774–13783.
29. Thorne, R. F., E. G. Law, C. A. Elith, K. J. Ralston, R. C. Bates, and G. F. Burns. 2006. The association between CD36 and Lyn protein tyrosine kinase is mediated by lipid. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **351**: 51–56.
30. Tran, T. T., H. Poirier, L. Clement, F. Nassir, M. M. Pelsers, V. Petit, P. Degrace, M. C. Monnot, J. F. Glatz, N. A. Abumrad, et al. 2011. Luminal lipid regulates CD36 levels and downstream signaling to stimulate chylomicron synthesis. *J. Biol. Chem.* **286**: 25201–25210.
31. Aguer, C., J. Mercier, C. Y. Man, L. Metz, S. Bordenave, K. Lambert, E. Jean, L. Lantier, L. Bounoua, J. F. Brun, et al. 2010. Intramyocellular lipid accumulation is associated with permanent relocation ex vivo and in vitro of fatty acid translocase (FAT)/CD36 in obese patients. *Diabetologia.* **53**: 1151–1163.
32. Kawai, K., K. Sugimoto, K. Nakashima, H. Miura, and Y. Ninomiya. 2000. Leptin as a modulator of sweet taste sensitivities in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **97**: 11044–11049.
33. Shin, Y. K., B. Martin, E. Golden, C. D. Dotson, S. Maudsley, W. Kim, H. J. Jang, M. P. Mattson, D. J. Drucker, J. M. Egan, et al. 2008. Modulation of taste sensitivity by GLP-1 signaling. *J. Neurochem.* **106**: 455–463.
34. van Oort, M. M., J. M. van Doorn, A. Bonen, J. F. Glatz, D. J. van der Horst, K. W. Rodenburg, and J. J. Luiken. 2008. Insulin-induced translocation of CD36 to the plasma membrane is reversible and shows similarity to that of GLUT4. *Biochim. Biophys. Acta.* **1781**: 61–71.
35. Simons, P. J., J. A. Kummer, J. J. Luiken, and L. Boon. 2011. Apical CD36 immunolocalization in human and porcine taste buds from circumvallate and foliate papillae. *Acta Histochem.* **113**: 839–843.
36. Miras, A. D., and C. W. le Roux. 2010. Bariatric surgery and taste: novel mechanisms of weight loss. *Curr. Opin. Gastroenterol.* **26**: 140–145.
37. Stewart, J. E., C. Feinle-Bisset, and R. S. Keast. 2011. Fatty acid detection during food consumption and digestion: associations with ingestive behavior and obesity. *Prog. Lipid Res.* **50**: 225–233.

II.2. Discussion

II.2.1. *L'obésité altère la détection orosensorielle des lipides*

L'article n°2 montre que les souris rendues obèses par un régime, quelle que soit la composition de ce régime (HF ou HFHS), ont une préférence diminuée pour les lipides alimentaires, correspondant à une augmentation du seuil de détection, en comparaison des souris en régime STD. Cette diminution de la sensibilité pour les lipides a été confirmée par d'autres auteurs chez des souris (Ozdener et al., 2014) et des rats obèses (Chen et al., 2013), et peut avoir différentes origines.

Tout d'abord, les signaux post-ingestifs sont à prendre en considération (Sclafani et al., 2007a; Sclafani et al., 2013). Même si l'impact de l'obésité sur le conditionnement post-oral n'est pas connu, les perturbations hormonales liées à l'obésité (insulino-résistance, hyperleptinémie, réduction du GLP-1 plasmatique...) peuvent avoir des conséquences sur le comportement alimentaire. D'autre part, l'obésité induit une altération des circuits de récompense, avec notamment une diminution du « *wanting* » chez les rats obèses (Shin et al., 2011a). On constate que les souris HF consomment significativement moins de liquide (solutions contrôle + test) lors des tests, on peut donc supposer que, même si a priori les biberons sont faciles d'accès, le fait d'aller boire à ces biberons demande un effort que les souris obèses sont moins disposées à fournir. Associé à ces perturbations du circuit cortico- limbique, on peut penser que le système gustatif puisse également être altéré au niveau central (Besnard et al., 2016 (in press)), mais également au niveau périphérique, directement au niveau des bourgeons du goût, comme le suggèrent nos tests court terme en lickomètres, qui montrent là-aussi une diminution de la sensibilité aux lipides.

De manière intéressante, une étude réalisée chez des enfants et adolescents obèses montre que ceux-ci présentent une altération de la sensibilité aux goûts acide, amer, sucré, salé et umami (Overberg et al., 2012). Au laboratoire, contrairement à d'autres études (Stewart et al., 2010; Stewart et al., 2011a; Stewart et al., 2011b), nous n'avons trouvé aucun lien entre l'IMC et la sensibilité aux lipides chez l'Homme (Chevrot et al., 2014), tout comme (Stewart and Keast, 2012). Cependant, à l'aide de la méthode des 3-AFC, nous avons pu mettre en évidence un groupe d'individus minoritaires incapables de discriminer correctement des solutions de LA. De manière intéressante, ces individus appartiennent tous au groupe « obèse » ($IMC \geq 30 \text{ kg.m}^{-2}$) et l'analyse de leurs carnets de consommation révèle une prise calorique plus élevée que les autres groupes, avec une surconsommation de glucides et de lipides, notamment des AGS. Ainsi, l'obésité, que ce soit chez l'Homme ou chez le rongeur, semble être associée à une altération de la capacité à détecter les lipides.

Est-ce que l'obésité est la cause ou la conséquence de ce dysfonctionnement reste à déterminer, mais les données récentes de la littérature, dont les résultats de l'article n°2, tendent à montrer que l'obésité entraîne un effet délétère sur la perception du gras. En effet, le retour à un état « mince » par restriction calorique chez les rongeurs initialement rendus obèses restaure la sensibilité aux lipides (article n°2 et (Shin et al., 2011a)). Une corrélation inverse entre la sensibilité pour les lipides et la masse grasse

est d'ailleurs observée dans l'article n°2. La chirurgie bariatrique est un autre moyen d'observer les effets d'une perte de poids (qui implique de nombreux mécanismes tels qu'une modification du microbiote intestinal et du statut hormonal (Miras and le Roux, 2013)) sur les comportements alimentaires. Chez le rat, un bypass gastrique de type Roux-en-Y permet de corriger les effets de l'obésité sur la détection de l'huile de maïs et du sucrose (Shin et al., 2011b). Chez l'Homme, la chirurgie bariatrique entraîne une diminution du plaisir associé à la consommation d'aliments gras (Shin and Berthoud, 2011). Les effets d'une perte de poids sur la détection des lipides chez l'Homme sont cependant peu documentés. D'après l'ensemble de ces résultats, l'obésité entraîne non seulement une altération des circuits de récompense au niveau central mais aussi une altération de la détection orale des lipides au niveau périphérique. Les deux phénomènes peuvent être liés par une hypothèse : l'augmentation du seuil de détection chez les obèses entraînerait un besoin de consommer plus de lipides pour permettre d'atteindre un seuil hédonique satisfaisant. Ceci aboutirait donc à un cercle vicieux dans lequel les obèses auraient tendance à surconsommer des aliments denses en énergie.

II.2.2. Quels sont les mécanismes impliqués ?

Il apparaît donc important de comprendre les mécanismes impliqués dans cette perturbation périphérique de la détection des lipides lors de l'obésité. Pour cela, l'article n°2 apporte des éléments de réponse. Comme nous l'avons vu dans la partie précédente, le CD36 et le GPR120 sont deux lipido-récepteurs situés dans les papilles gustatives chez le rongeur (Cartoni et al., 2010; Fukuwatari et al., 1997; Laugurette et al., 2005; Matsumura et al., 2007) et chez l'Homme (Galindo et al., 2012b; Simons et al., 2011). L'article n°1 montre que seul le CD36 est indispensable à la détection orale des lipides, le GPR120 jouant probablement un rôle dans la modulation de la sensibilité aux goûts. Il a été montré au laboratoire que la présence de lipides dans l'alimentation entraîne une diminution de l'expression du CD36 dans les papilles gustatives (Martin et al., 2011b). Il est donc tentant d'imaginer que le fait de nourrir des souris avec un régime obésogène pourrait entraîner une altération des niveaux d'expression du CD36 dans les papilles. C'est bien ce qui a été trouvé chez le rat (Zhang et al., 2011) et plus récemment chez la souris (Ozdener et al., 2014). Les analyses effectuées pour l'article n°2 n'ont en revanche pas confirmé ces résultats. En effet, les niveaux de la protéine CD36 dans la papille caliciforme sont équivalents chez les souris contrôle et HF, ce qui est également le cas chez des rats OP et OR (Chen et al., 2013). Ces différences peuvent s'expliquer notamment par l'état des animaux lors du sacrifice : les souris de l'article n°2 ont été sacrifiées à jeun, alors que pour les autres études, l'état des animaux lors du sacrifice n'a pas été précisé, laissant la possibilité d'un sacrifice à l'état nourri.

D'autre part, le récepteur subit une régulation négative – mesurée 1h après une prise alimentaire suite à un jeûne – de manière dépendante de la présence de lipides dans le repas, suivi d'un retour progressif au niveau basal (Martin et al., 2011b). Ceci pourrait constituer un mécanisme de désensibilisation, comme dans l'intestin (Tran et al., 2011). Or, cette diminution de l'expression du CD36

suite à une reprise alimentaire est retrouvée chez les souris contrôles dans l'article n°2, mais pas chez les souris HF. Ainsi, l'obésité semble perturber la dynamique de régulation du CD36 dans les cellules gustatives, comme c'est le cas chez les souris GLP-1R KO qui montrent également une diminution de la sensibilité aux lipides (Martin et al., 2012).

Un autre mécanisme, qui peut être relié à CD36, est également perturbé lors de l'obésité. L'augmentation de $[Ca^{2+}]_i$ en présence d'AG est en effet fortement limitée chez les souris obèses dans les cellules gustatives CD36-positives, résultats confirmés par (Ozden et al., 2014). Il a également été montré une moindre augmentation du $[Ca^{2+}]_i$ dans les cellules gustatives de souris obèses en réponse à du saccharose ou un édulcorant (acésulfame K) (Maliphol et al., 2013). On peut supposer que, comme c'est le cas dans l'intestin (Tran et al., 2011), l'induction d'une signalisation calcique dépend de la liaison du CD36 avec les AG, qui est suivie d'une disparition du CD36 de la membrane des cellules gustatives (Ozden et al., 2014) et de sa dégradation par le système ubiquitine-protéasome. Ainsi, chez les souris obèses, ces phénomènes seraient limités, aboutissant à une moindre signalisation calcique et donc à une diminution de la sensibilité pour les lipides.

Notre hypothèse quant aux mécanismes intervenant dans la détection des lipides au niveau de la cellule gustative est donc la suivante (voir figure 6 de l'article n°2). Chez la souris contrôle, la liaison des AGLC avec le CD36 induit son association, dans les radeaux lipidiques (Pohl et al., 2005), avec différentes protéines impliquées dans la signalisation et l'internalisation du complexe CD36-AGLC (Heit et al., 2013). En effet, la liaison avec les Src-PTK (Huang et al., 1991) induit une cascade de signalisation qui passe par une augmentation de $[Ca^{2+}]_i$ et abouti à la sécrétion de neurotransmetteurs. Ceux-ci envoient un signal au cerveau (El-Yassimi et al., 2008). Parallèlement, le CD36 peut être internalisé (Su and Abumrad, 2009), probablement par la voie des cavéoles (petites invaginations intracellulaires). En effet, dans les fibroblastes embryonnaires de souris, l'absence de caveoline-1, marqueur des cavéoles, entraîne une localisation altérée du CD36 dans la cellule (Ring et al., 2006). Les mécanismes d'internalisation du CD36 induits par les AGLC pourraient se rapprocher de ceux des TLR4 induits par le LPS, où les cavéoles sont également impliquées (Shuto et al., 2005). Ce phénomène semble être dépendant de l'ubiquitination du CD36, et serait suivi de sa dégradation partielle par le protéasome (Tran et al., 2011) aboutissant ainsi à une diminution progressive du signal calcique CD36-dépendant.

Ces événements expliqueraient une moindre motivation à consommer des lipides au fur et à mesure du repas, ce qui n'est pas sans rappeler le phénomène de satiété sensorielle spécifique (Cabanac, 1971). Une diminution de moitié de l'expression du CD36, comme c'est le cas chez les souris CD36 hétérozygotes ($CD36^{+/-}$), suffit en effet à abolir la préférence pour les AGLC (Martin et al., 2011b). Dans ce schéma, l'obésité impacterait le signal calcique intracellulaire en limitant la liaison du CD36 avec les protéines qui vont permettre l'induction du signal au niveau des radeaux lipidiques. Bien que ce scénario soit un modèle de travail, il a le mérite d'apporter une explication plausible à la moindre sensibilité aux lipides observée chez les souris rendues obèses par un régime.

Au vu de ces résultats, il reste une question importante : quels sont les mécanismes impliqués dans la perturbation de la dynamique de régulation du CD36 au niveau de la membrane des cellules gustatives chez les souris obèses ? Plusieurs hypothèses peuvent être émises. La première concerne la composition de la bicouche lipidique des membranes, qui est influencée par la composition en lipides du régime (Pan and Storlien, 1993). La teneur en AG et en cholestérol de la membrane module la fluidité et les fonctions métaboliques de celle-ci (Clamp et al., 1997). On peut donc imaginer qu'une modification de la structure des membranes, consécutivement à un régime gras saturé, pourrait perturber l'association du CD36 avec les Src-PTK dans les radeaux lipidiques (Thorne et al., 2006), limitant ainsi la cascade de signalisation.

La deuxième hypothèse se base sur le statut endocrine altéré des souris HF. De nombreuses hormones et/ou leur récepteurs sont exprimés dans les papilles gustatives : insuline, leptine, GLP-1, CCK, ghréline etc. (Kawai et al., 2000; Shin and Egan, 2010; Shin et al., 2008; Shin et al., 2010; Suzuki et al., 2005). Au cours de l'obésité, la modification hormonale la plus connue est celle de l'insulino-résistance (figure 1 de l'article n°2). L'insuline contrôle la re-localisation du CD36 à la membrane des myocytes chez le rat (Luiken et al., 2002) et dans des cellules CHO (lignée cellulaire issue d'ovaires de hamster de Chine) (van Oort et al., 2008). Elle exerce donc une action opposée à celle des AGLC (Smith et al., 2008). L'hypothèse d'une implication de l'insuline est cependant peu probable. En effet, l'article n°2 montre qu'il n'y a pas de corrélation entre le taux d'insuline plasmatique et le pourcentage de préférence pour l'huile de colza. Ceci n'exclue cependant pas une modification du taux d'insuline au niveau de la papille gustative, qui pourrait altérer la régulation du CD36 chez les souris obèses.

La leptine est également une hormone très importante dans la pathogenèse de l'obésité (Friedman and Halaas, 1998). Les animaux obèses montrent généralement une augmentation des taux plasmatiques de leptine, caractéristique d'une leptino-résistance. Cette hormone, produite par le tissu adipeux, agit sur le système nerveux central pour réguler la prise alimentaire. Elle agit également à la périphérie, notamment sur le système gustatif, où elle module le goût sucré. En effet, chez la souris, l'injection de leptine inhibe la réponse des cellules gustatives aux substances sucrées (Kawai et al., 2000). Les souris *ob/ob* (qui ne produisent pas de leptine) montrent quant à elles une augmentation de la sensibilité au sucré, réversible *via* une injection de leptine (Shigemura et al., 2004). Plus récemment, il a été montré que l'injection de leptine à des rats ayant perdu du poids après une obésité induite par un régime hyperlipidique, entraîne une diminution de la sensibilité pour le sucrose et l'huile de maïs, se rapprochant des seuils de détection trouvés chez les rats obèses (Shin et al., 2011a).

Compte tenu de ces résultats préliminaires, nous nous sommes intéressés à la détection des lipides chez les souris *ob/ob*. Nous avons réalisé des tests de double-choix long terme et de *licking* court terme. Les résultats obtenus sont malheureusement difficilement interprétables car peu reproductibles. Sur l'ensemble des double-choix (0.02, 0.2 et 2% d'huile de colza) et tests de *licking* (0.5, 0.75 et 2% de LA) effectués, les résultats vont dans le sens soit d'une détection équivalente à celle des souris sauvages,

soit d'une légère diminution de la détection, sans réelle cohérence entre les différentes expériences (résultats non présentés). Il est possible d'imaginer qu'au moins deux facteurs entrent en compte : d'un côté, l'obésité des souris ob/ob pourrait faire pencher la balance du côté d'une moins bonne détection des lipides. D'un autre côté, l'absence de leptine pourrait améliorer la sensibilité aux lipides, comme c'est le cas pour le sucré. Cette étude ayant été réalisée sur un nombre limité d'animaux, elle doit être reproduite, en réalisant en plus des tests comportementaux après injection de leptine chez les souris ob/ob et contrôles.

Enfin, le GLP-1 apparaît comme un candidat plausible pour agir sur le CD36 lors de l'obésité. Les taux de GLP-1 plasmatiques sont diminués chez les Hommes et les souris obèses (Hwang et al., 2015; Ranganath et al., 1996). Nous avons vu précédemment que le GLP-1 est capable de moduler la sensibilité au « gras » (Martin et al., 2012) et au sucré (Shin et al., 2008). De plus, le GLP-1 joue un rôle dans la dynamique de régulation du CD36 dans les bourgeons du goût après stimulation par des AGLC (Martin et al., 2012). Il a récemment été montré une augmentation de la sécrétion de GLP-1 par les papilles gustatives chez des souris HF (Ozdener et al., 2014), couplée à une augmentation du GPR120 dans les radeaux lipidiques suite à une stimulation par du LA. Les auteurs suggèrent que la sécrétion augmentée du GLP-1 par les bourgeons du goût se fait par l'intermédiaire du recrutement du GPR120 dans les radeaux lipidiques chez les souris obèses. Or, lors de nos expériences sur les souris GPR120^{-/-} en régime HF, nous n'avons constaté aucune différence de comportement entre les souris KO et les souris WT. On pourrait conclure hâtivement de ce dernier résultat que, si le GLP-1 joue un rôle sur la diminution de la détection des lipides chez les souris obèses, ce ne serait *à priori* pas par l'intermédiaire du GPR120. Ceci serait sans compter les résultats *ex vivo* obtenus précédemment avec des papilles calciformes isolées. En effet, un agoniste spécifique du GPR120 entraîne la sécrétion du GLP-1 par les papilles (Martin et al., 2012). On sait d'autre part que l'effet du GLP-1 sur la sensibilité au sucré (Shin et al., 2008) et au gras (Martin et al., 2012) est relativement modéré et nécessite donc une approche comportementale plus sensible (par exemple les gustomètres) que celles utilisées jusqu'à présent (double-choix et *licking tests*). D'autres études sont donc nécessaires pour mieux comprendre les rôles et mécanismes d'action du GLP-1 dans les papilles gustatives.

Outre un statut endocrine altéré, l'obésité s'accompagne de nombreux autres phénomènes, avec parmi les plus importants une inflammation bas-bruit provoquée en partie par une modification du microbiote intestinal (Cani et al., 2008). Or, le turn-over des cellules gustatives des bourgeons du goût est sensible au statut inflammatoire, ce qui pourrait être à l'origine de troubles gustatifs (Cohn et al., 2010; Wang et al., 2009). Quels sont alors les impacts de l'inflammation bas-bruit d'une part, et des modifications du microbiote intestinal d'autre part, tous deux observés lors de l'obésité, sur la détection des lipides chez la souris ?

Partie III : L'origine de l'altération de la détection orosensorielle des lipides lors de l'obésité est-elle liée à l'endotoxémie métabolique ?

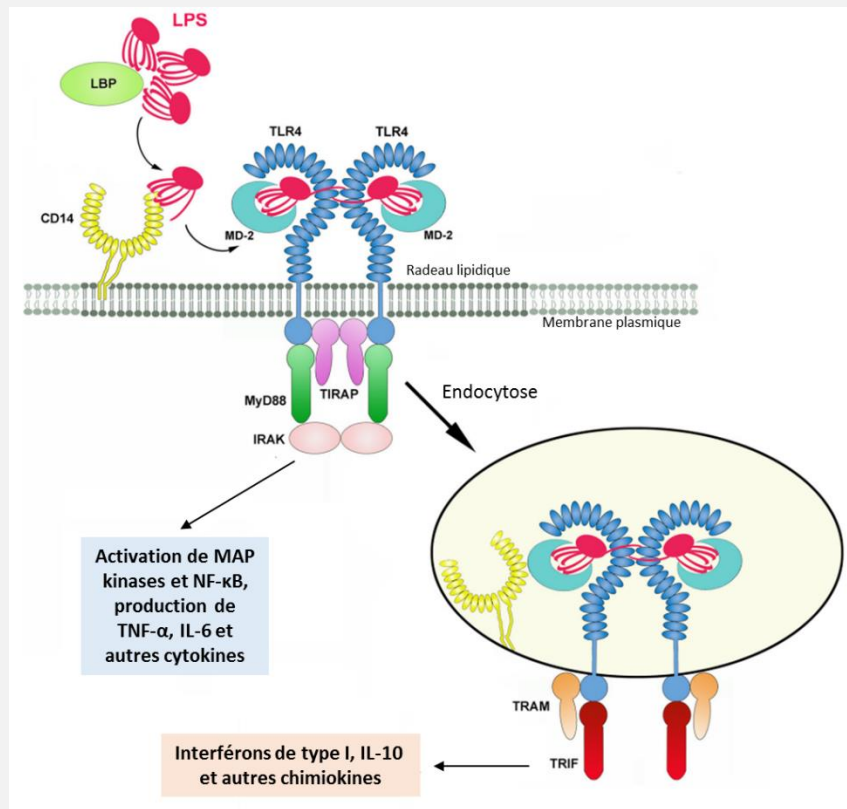
L'obésité est associée à un état d'inflammation bas-bruit chronique, caractérisé notamment par une augmentation systémique de cytokines pro-inflammatoires et une infiltration de cellules immunitaires dans les tissus (Gregor and Hotamisligil, 2011). La cause de cet état inflammatoire est en partie l'augmentation de la masse des tissus adipeux, particulièrement le tissu adipeux viscéral, qui produit des cytokines pro-inflammatoires (TNF- α et IL-6 notamment) et des facteurs chimiotactiques comme le MCP-1 (*monocyte chemoattractant protein-1*). Le MCP-1 recrute et active des monocytes de la circulation qui deviennent des macrophages (M1) qui à leur tour augmentent l'inflammation en produisant des cytokines (TNF- α IL-1 β et IL-6). L'ensemble de ces cytokines compromettent la signalisation de l'insuline, entraînant des complications métaboliques telles que l'insulino-résistance et le diabète de type II (Ding and Lund, 2011). En plus du tissu adipeux, de récents travaux montrent qu'une endotoxémie métabolique provoquée par des lipopolysaccharides (LPS = endotoxine), provenant des bactéries à Gram négatif présentes dans l'intestin, joue également un rôle dans l'inflammation bas-bruit caractéristique de l'obésité (Cani et al., 2007a). Par ailleurs, au niveau des papilles gustatives, les bourgeons du goût ont également la capacité de produire des cytokines inflammatoires en réponse au LPS, ce qui suggère un lien possible entre l'endotoxémie métabolique et le système gustatif périphérique.

III.1. Mécanismes de l'endotoxémie métabolique

L'endotoxémie métabolique est caractérisée par une élévation faible (≈ 2 à 5 fois) mais chronique des taux de LPS plasmatiques (Everard and Cani, 2013). Le LPS est ancré dans la membrane externe des bactéries à Gram négatif grâce au lipide A qui est également responsable de son activité pro-inflammatoire (Plociennikowska et al., 2015). Il est continuellement produit dans l'intestin avec la mort des bactéries Gram-négatives (Everard and Cani, 2013). Il est capable de passer la barrière intestinale et est transporté par la LBP (*LPS binding protein*) dans le plasma. Les mécanismes d'action du LPS au niveau cellulaire nécessitent le CD14 (cluster de Différenciation 14) et le TLR4 (Cani et al., 2007a), et sont décrits dans l'encart n°4 et la figure 47.

Encart n°4 : Activation du TLR4 par le LPS.

Les TLR (*toll-like receptors*) reconnaissent divers composants microbiens et induisent la production de médiateurs pro-inflammatoires qui jouent un rôle dans l'éradication de l'infection. Parmi eux, le TLR4 est activé par le LPS. Cette activation nécessite une interaction entre le LPS et la LBP, qui facilite le transfert du LPS au CD14. Puis, le CD14 bascule le LPS au complexe TLR4/MD-2. La dimérisation du TLR4 entraîne le recrutement de TIRAP/MyD88 d'une part, et de TRAM/TRIF d'autre part. Dans un premier temps, MyD88 recrute les kinases IRAK, ce qui permet une cascade de signalisation aboutissant à l'activation de NF- κ B et des MAP kinases et à la production de cytokines pro-inflammatoires telles que TNF- α et IL-6. Après l'endocytose du récepteur, TRIF initie une voie de signalisation qui active le facteur de transcription IRF3, entraînant l'expression d'IFN (interférons) de type I et de chimiokines telles que IL-10. Des données récentes indiquent que, en plus du CD14, d'autres protéines (comme par exemple le CD36) participent à la signalisation LPS-TLR4-dépendante, et que l'association du TLR4 et ces protéines s'effectue dans des radeaux lipidiques (Plociennikowska et al., 2015).

**Figure 47 : Activation du TLR4 par le LPS.**

Adapté de (Plociennikowska et al., 2015)

CD14 : Cluster de Differentiation 14 ; IL : interleukine ; IRAK : *interleukin 1 receptor associated kinase* ; LBP : *LPS binding protein* ; LPS : lipopolysaccharide ; MD-2 : *lymphocyte antigen 96* ; MyD88 : *myeloid differentiation primary response gene 88* ; NF- κ B : *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells* ; TIRAP : *toll-interleukin 1 receptor domain containing adaptor protein* ; TLR4 : *toll-like receptor 4* ; TNF- α : *tumor necrosis factor- α* ; TRAM : *toll-like receptor adaptor molecule 2* ; TRIF : *toll-interleukin 1 receptor domain-containing adapter-inducing interferon- β* .

Les travaux de l'équipe de Patrice Cani ont montré une élévation faible d'endotoxine chez des souris en régime HF pendant 4 semaines (Cani et al., 2007a; Cani et al., 2008). De manière intéressante, la composition du régime influence le taux d'augmentation du LPS : il est plus élevé avec un régime riche en lipides saturés qu'avec un régime riche en glucides (Amar et al., 2008). Chez l'Homme également, le LPS est associé à l'obésité (Kallio et al., 2015) et à la consommation de lipides (Amar et al., 2008). Le rôle de l'endotoxine dans les désordres métaboliques a été confirmé grâce à des mini-pompes osmotiques implantées en sous-cutané (et reliées à la cavité péritonéale) chez des souris et qui délivrent une faible dose de LPS en continu (300µg/kg/jour) pendant 4 semaines. Les niveaux circulants de LPS engendrés étaient globalement similaires à ceux observés lors d'un régime HF de même durée, ainsi que les effets métaboliques : augmentation du tissu adipeux, hyperglycémie, hyperinsulinémie etc. (Cani et al., 2007a; Nguyen et al., 2014).

Le microbiote intestinal est mis en place dès la naissance et joue un rôle fondamental dans le bien-être et la santé de l'hôte. Il est maintenant admis que l'obésité est associée à des changements au niveau des populations microbiennes de l'intestin, dans leur diversité et dans leur composition. On parle alors de dysbiose intestinale. Le microbiote des modèles de souris obèses est globalement caractérisé par une augmentation des Firmicutes et une diminution des Bacteroidetes, qui sont les deux *phyla* dominants dans l'intestin (Ley et al., 2005; Turnbaugh et al., 2006). De plus, une diminution du genre *Bifidobacterium*, qui est inversement corrélée à l'inflammation (Cani et al., 2007b), a été rapportée de manière assez constante, chez l'animal ainsi que chez l'Homme obèse (Cani et al., 2007a; Million et al., 2012). Chez l'Homme, une moindre diversité de la population bactérienne apparaît comme un facteur de risque pour l'obésité et l'insulino-résistance (Le Chatelier et al., 2013; Turnbaugh et al., 2009).

L'intestin représente une barrière physique entre le microbiote et l'hôte, permettant à la fois la relation symbiotique entre les deux, mais aussi d'empêcher l'invasion des tissus par les bactéries ou les endotoxines qui en sont dérivées telles que le LPS. La fonction barrière est un système complexe incluant plusieurs facteurs : des facteurs physiques (épaisseur du mucus, jonctions serrées etc.), des facteurs d'immunité innée (TLR, peptides antimicrobiens etc.) et même des bactéries spécifiques ayant une action bénéfique (comme *Bifidobacterium* spp et *Akkermansia muciniphila*) (Cani and Everard, 2015). Dans certains cas, cette barrière peut être altérée. Un régime HF augmente la perméabilité intestinale, par exemple en modifiant l'expression et la localisation des protéines de jonctions serrées qui lient les cellules intestinales entre-elles (Cani et al., 2008). La modification du microbiote par antibiotiques permet d'améliorer les fonctions de barrière de l'intestin, montrant l'implication du microbiote (Cani et al., 2008). Notons que la modification de la perméabilité dépend de la présence d'AGS dans le régime (Lam et al., 2015). Les mécanismes impliqués dans la perturbation des fonctions barrière de l'intestin ne sont pas totalement élucidés. Parmi eux, le système endocannabinoïde (eCB) semble jouer un rôle important : les antagonistes de CB1R diminuent la perméabilité intestinale. Un traitement par antibiotiques diminue

l'expression de CB1R dans le côlon, montrant encore une fois l'importance du microbiote dans la fonction barrière de l'intestin (Muccioli et al., 2010).

L'ensemble de ces données montre un lien très important entre le microbiote intestinal et le métabolisme de l'hôte. Une altération du microbiote par un régime HF entraîne une augmentation de la perméabilité intestinale, ce qui facilite le passage du LPS, induisant une inflammation bas-bruit systémique. De manière intéressante, les bourgeons du goût sont capables d'induire une réponse inflammatoire suite à une injection de LPS, avec des conséquences notamment sur leur structure.

III.2. Lien entre inflammation et détection des saveurs

Certains patients souffrant de maladies inflammatoires chroniques montrent un dysfonctionnement gustatif (Mann, 2002). De plus, l'utilisation à long terme de certaines substances dans le traitement des cancers ou des infections virales, dont les interférons (IFN) qui sont des cytokines inflammatoires, entraîne des perturbations du goût et de l'odorat (Abdollahi and Radfar, 2003).

Les bourgeons du goût sont exposés aux agressions externes au niveau de la cavité orale. Ils doivent donc posséder des moyens de défense contre les pathogènes. L'inflammation est initiée lorsque les TLR sont activés par des stimuli inflammatoires dérivés de pathogènes, de tissus endommagés ou d'un stress. La signalisation par les TLR induit l'expression de facteurs de transcription tels que NF- κ B ou IRF (*interferon regulatory factor*) et d'un grand nombre de cytokines, incluant les IFN. En tant que protéines de signalisation extra-cellulaire, les cytokines dirigent les réactions immunitaires en régulant les activités, la survie et la mort cellulaires (Wang et al., 2009). L'équipe de Hong Wang du *Monell Center* aux Etats-Unis a été la première à montrer que les bourgeons du goût expriment des cytokines inflammatoires de manière plus importantes que le tissu épithélial environnant. Ces cytokines incluent les molécules de la voie de signalisation des interférons, notamment des récepteurs aux IFN de type I et II, le TNF- α , l'IL-6 (interleukin-6) et également des TLR, dont TLR2 et TLR4 (Cohn et al., 2010; Feng et al., 2012; Wang et al., 2007, 2009).

L'induction d'une inflammation aigüe par une injection systémique de LPS (5mg/kg) chez la souris entraîne une augmentation de l'expression des cytokines exprimées par les bourgeons du goût : IFN- γ , TNF- α , IL-6, IL-12, IL-1 β et MCP-1. L'inflammation atténue la prolifération des cellules progénitrices et diminue le nombre de nouvelles cellules entrant dans les bourgeons du goût des papilles caliciformes et foliées, probablement à travers la suppression de l'expression de certains régulateurs du cycle cellulaire (cyclin B2 et E2F1) (Cohn et al., 2010). De plus, l'injection systémique de LPS chez la souris diminue la durée de vie des cellules gustatives, probablement à travers l'augmentation de l'IFN- γ qui stimule l'activation de la caspase-3 (indicateur de la mort cellulaire) et augmente ainsi l'apoptose dans les bourgeons du goût (Cohn et al., 2010; Wang et al., 2007). Il est probable que l'augmentation de l'IFN- γ

soit médiée par l'activation des TLR par le LPS (Wang et al., 2009). D'autre part, l'activation du TLR4 par le LPS entraîne l'augmentation de la sécrétion de TNF- α (Feng et al., 2012).

Cependant, la production excessive de cytokines pro-inflammatoires peut à terme causer des dommages aux bourgeons du goût ; des mécanismes capables de réguler cette inflammation sont donc nécessaires. Parmi eux, la production d'IL-10, cytokine anti-inflammatoire, semble jouer un rôle important dans le maintien de l'intégrité structurale des bourgeons du goût : sans son effet inhibiteur, le TNF- α entraînerait l'expression de cytokines pro-inflammatoires qui diminueraient le renouvellement et accélèrerait la mort cellulaire (Feng et al., 2014a).

De manière intéressante, des tests de comportement à court et long terme ainsi que des enregistrements de l'activité des nerfs gustatifs montrent que les souris TNF^{-/-} sont moins sensibles à la saveur amer, sans modification pour les saveurs acide, salé, sucré et umami (Feng et al., 2015). Ceci indique que le TNF- α module la réponse au goût amer. Le fait que les souris TNF KO ne présentent aucune modification de la morphologie des bourgeons du goût suggère qu'un autre mécanisme est impliqué, comme par exemple la régulation de l'expression de gènes *via* l'activation de facteurs de transcription tels que le NF- κ B. Il est à noter qu'une communication intercellulaire est probablement impliquée dans les mécanismes de régulation de l'inflammation dans les bourgeons du goût, car les différentes cellules n'expriment pas les mêmes molécules et leurs récepteurs (figure 48).

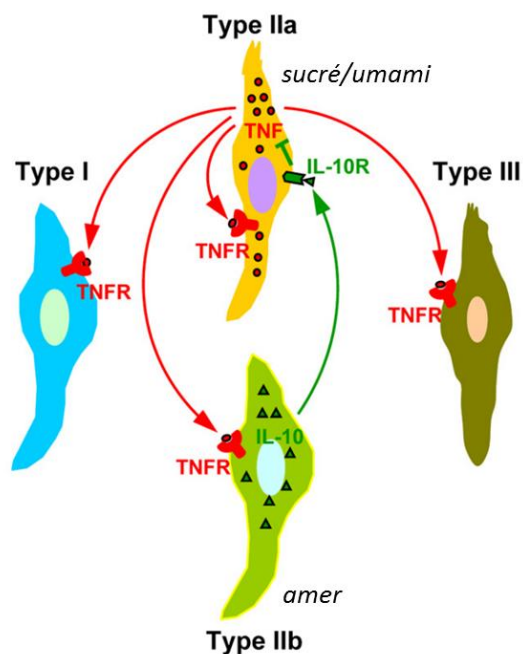


Figure 48 : Voies de signalisation de TNF- α et IL-10 au sein des bourgeons du goût des papilles caliciformes et foliées.

Adapté de (Feng et al., 2014a).

IL-10 : interleukine 10 ; IL-10R : récepteur à l'IL-10 ; TNF : *tumor necrosis factor* ; TNFR : récepteur au TNF- α .

Par ailleurs, chez le rat, une injection systémique aiguë de LPS (250µg/kg) entraîne une diminution de la prise alimentaire, ainsi qu'une modification des comportements hédoniques ou aversifs. Les rats montrent par exemple plus de réactions aversives et une réponse hédonique diminuée envers des solutions sucrées et amères à la fois comparé aux rats contrôle, ce qui semble être une réponse adaptative. En effet, les rats malades suite à l'injection de LPS éviteraient de consommer des substances qui pourraient potentiellement altérer le processus de rétablissement (Aubert and Dantzer, 2005).

Ainsi, ces quelques notions sur les mécanismes inflammatoires dans les bourgeons du goût et les conséquences sur le comportement suggèrent qu'une altération du goût est possible, par une modification de la structure des bourgeons, associée à une action des cytokines sur les voies de signalisation gustatives. L'ensemble des expériences réalisées pour induire une inflammation et observer ses effets sur les bourgeons du goût ou le comportement alimentaire que nous venons de citer utilisent une injection élevée de LPS qui entraîne une inflammation aiguë. Les conséquences d'une endotoxémie bas-bruit comme celle retrouvée lors de l'obésité ne sont pas connues, ce qui représente une piste d'investigation intéressante.

Partant de ces constats, nous nous sommes interrogés sur un lien possible entre l'endotoxémie métabolique et la diminution de la sensibilité gustative pour les lipides associées à l'obésité. Pour explorer cette piste, dans la continuité de l'article n°2, des souris ont été rendues obèses grâce à un régime HF riche en graisses saturées et une partie de ces souris a subi une restriction calorique afin de retrouver un poids normal. Dans un 1^{er} temps, une recherche de marqueurs d'inflammation différenciellement exprimés dans les papilles caliciformes entre les trois groupes de souris a été effectuée au moyen de puces à ADN. Puis, des tests de double-choix long terme ont été réalisés et mis en relation avec les taux de LPS plasmatiques, et des analyses de marqueurs d'inflammation ont été faites par qPCR. Dans un 2^{ème} temps, une endotoxémie a été mimée à l'aide de mini-pompes osmotiques Alzet® (model 2004, DURECT Corporation, CA, USA). Ces pompes étaient installées au niveau de la cavité intra-péritonéale afin de délivrer une dose faible et continue de LPS (300µg/kg/jour, (Cani et al., 2007a)) pendant 4 semaines. L'objectif était de déterminer si le LPS, à des taux observés lors d'une endotoxémie métabolique, était responsable de l'altération de la détection orosensorielle des lipides. Ces expériences font l'objet d'un projet d'article présenté ci-après.

Projet d'article n°3 :

Does the inflammation of gustatory papillae explain the impairment of oral fat
detection in obese mice?

Arnaud Bernard*, Déborah Ancel*, Michael Chevrot, Jean-Paul Pais-de-Barros, Laurent Lagrost, Patricia
Passilly-Degrace, and Philippe Besnard.

* Co-auteurs

Does the inflammation of gustatory papillae explain the impairment of oral fat detection in obese mice?

Arnaud Bernard^{1#}, Déborah Ancel^{1#}, Michael Chevrot¹, Jean-Paul Pais-de-Barros², Laurent Lagrost², Patricia Passilly-Degrace¹, Philippe Besnard^{1*}.

¹ NUTox, UMR U866 INSERM/Université de Bourgogne/AgroSup Dijon, F21000 Dijon, France.

² Lipness, UMR U866 INSERM/Université de Bourgogne, F-21000 Dijon, France

Running title: LPS and oral fat detection

* Corresponding author: P. Besnard, Physiologie de la Nutrition et Toxicologie (NUTox), AgroSup Dijon, 1, Esplanade Erasme, F-21000 Dijon (France). Tel: (+33) 380 77 40 91. E-mail: pbesnard@u-bourgogne.fr.

Have equally contributed to this study

Abstract

Diet-induced obesity (DIO) is associated with a decreased oral fat detection in rodents. This blunted gustatory detection has been explained by an impairment of the lipid-mediated signaling in taste bud cells (TBC). However, factors responsible for this defect remain elusive. It is known that DIO elicits a metabolic inflammation by promoting intestinal permeation to lipopolysaccharides (LPS), a Gram-negative bacteria-derived endotoxin. To determine whether a local inflammation of gustatory tissue might explain the DIO-impairment of orosensory detection of dietary lipids, mice were subjected to a DIO protocol. Using a combination of transcriptomic approach, biochemical assays and behavioral tests, we have found that *i)* DIO generates a pro-inflammatory genic profile in the circumvallate papillae (CVP), *ii)* plasma LPS levels are positively correlated with fat mass and, thus, negatively correlated with the oral fat detection, and *iii)* a chronic infusion of LPS at a level similar to that found in obesity is not sufficient to alter the oro-sensory fat detection in lean mice. Taken together these data bring the demonstration that the low-grade endotoxemia induced by LPS alone does not explain the inflammation of gustatory papillae found in DIO mice. Therefore, the change in the taste sensitivity observed during obesity is likely the result of more complex systemic dysregulations.

Introduction

Recent literature strongly suggests that obesity is associated with a dysfunction of the gustatory pathway promoting harmful food choices for health both in human and rodents [1-3]. During prandial period, integration of peripheral taste signals occurs in a set of brain areas responsible for the emotional representation of foods (*i.e.* corticomesolimbic system) [4]. Neuroimaging studies have highlighted an abnormal pattern of activation of this neural network in obese subjects. For instance, presentation of high palatable food pictures triggers a greater neural activation in regions responsible for motivation/reward (*i.e.* ventral tegmental area, accumbens nucleus) and emotion/memory (*i.e.* amygdala, hippocampus) in obese women than in normal weight controls [5]. It was postulated that this central obesity-mediated neuro-vulnerability might play a role in the preferential consumption of high palatable energy-dense foods (rich in fat and sugar) usually observed in obese individuals [6]. Interestingly, a significant weight loss corrects these dysfunctions. Indeed, neuroimaging studies before and after bariatric surgery revealed a reduced activation of the “emotional brain” and a healthier foods option in formerly obese patients [7].

Obesity can also disturb the taste function in periphery. In rodents, diet-induced obesity (*DIO*) shifts preference for oily solutions towards higher concentrations, compared to lean controls in rats and mice subjected to brief-access (*10-60 sec*) licking paradigm, known to determine the affective value of taste [2, 3]. An impairment of the lipid-mediated signaling in taste bud cells seems to explain this blunted gustatory detection. Indeed, calcium response to lipid stimulations is reduced in taste bud cells (TBC) from *DIO* mice as compared to lean controls, leading to a decrease in neurotransmitter release [3]. As reported for the central gustatory areas, sensitivity of the oral fat detection system is deeply improved after a weight loss induced by caloric restriction or bariatric surgery [3, 4, 8]. However, mechanism by which obesity affects the oral fat detection remains poorly known. Since recent data suggest that taste buds are sensitive to inflammatory stress [9], the purpose of this study was to explore whether the chronic low-grade inflammatory environment found during obesity might explain the impairment of oral fat detection in *DIO* mice.

Materials and Methods

Animals and diets

French guidelines for the use and the care of laboratory animals were followed and experimental protocols were approved by the Animal Ethic Committee of the University of Bourgogne-Franche-Comté. Six-week-old male C57Bl/6 mice were purchased from Charles River Laboratories, France. Animals were individually housed in a controlled environment (constant temperature and humidity, dark period from 7 p.m. to 7 a.m.). The mice had free access to tap water during the experiment. After a one-week acclimatization period, the mice were *fed ad libitum* either a standard laboratory chow (4RF21, Mucedola, Italy; containing 3% fat, w/w) or an obesogenic diet high fat (HF) diet, rich in saturated fatty acids described in [3] and in table 1. A group of the diet-induced obese (DIO) mice were calorie restricted (= 60% energy of *ad libitum* energy intake). Body mass and food consumption were recorded weekly. Body composition (fat mass, lean mass and total body water) was measured by EchoMRI (Echo Medical Systems, Houston, Texas, USA). A separate group of mice fed with standard chow were implanted with an osmotic pump as described below.

Infusions of LPS and surgical procedures

The mice had a mini-osmotic pump (Alzet mini-osmotic pump, model 2004; Durect Corporation, Cupertino CA, USA) implanted subcutaneously and linked to the peritoneal cavity. The pumps were filled either with pyrogen-free NaCl (0.9% in water) or with LPS from *Escherichia coli* 055:B5 (Sigma Aldrich, ST. Louis, MO) diluted in pyrogen-free NaCl. The experiment was designed so that the pump infused continuously 300 µg/kg/day of LPS during 4 weeks [10].

Tissues and blood samples

CVP from control and DIO mice were isolated according to the procedure described in [11]. Briefly, lingual epithelium was separated from connective tissue by enzymatic dissociation (elastase and dispase mixture, 2 mg/ml each in Tyrode buffer: 140 mM NaCl, 5 mM KCl, 10 mM HEPES, 1 mM CaCl₂, 10 mM glucose, 1 mM MgCl₂, 10 mM Na pyruvate, pH 7.4) and the papilla was dissected under a binocular microscope. CVP were snap-frozen in liquid nitrogen then stored at -80°C. Plasmas were obtained after centrifugation of blood (5000 g for 10 min, 4°C).

Two-bottle preference tests

Mice were offered simultaneously two bottles for 12 h at the beginning of the dark period [12]. Control and experimental bottles contained 0.3% xanthan gum (w/v, Sigma-Aldrich, USA) in water in order to produce an oil suspension and to minimize textural cues between the two bottles. Animals were subjected to a choice between control or oily solution containing, in addition to xanthan gum, either 0.02%, 0.2% or 2.0% rapeseed oil (w/v, Fleur de Colza, Lesieur, France), successively, with a rest period of at least 48 h between each test. To avoid the development of side preference, the position of each bottle was randomized and reversed for each test. At the end of the test, the consumption of each solution was analyzed by weighing the bottles and the percentage of preference for the experimental solution was calculated (ratio of the consumption of the experimental solution relative to total consumption).

Blood LPS assay

LPS concentrations in plasmas were measured following the method of (Gautier T, J Biol Chem 2008), using the direct quantitation of 3-hydroxymyristic acid by gas chromatography-mass spectrometry, as previously described [13] except that 3-hydroxypentadecanoic acid was used as an internal standard in the present study.

Real-time RT-PCR

Total RNAs from CVP were extracted using the Total RNA Purification Kit (Norgen Biotek, Canada) according to the manufacturer's instructions. Briefly, nitrogen-frozen CVP were homogenized in the lysing buffer with an RNase free piston pellet. After homogenization, RNA were bound on purification columns and treated with an amplification grade DNase (RNase-Free DNase I kit, Norgen Biotek, Canada) to ensure genomic DNA removal. After purification RNA were re-suspended in RNase free water. RNA concentrations were measured with a Nanodrop® (Thermo Fisher Scientific) spectrophotometer. Reverse transcription reactions were carried out using the High Capacity cDNA Reverse Transcription kit (LifeTechnology, USA) according to the manufacturer's recommendations with 50ng of total RNA from CVP and random primers. Real time PCR reactions were performed with a StepOne Plus (LifeTechnology, USA) device with the use of TaqMan Gene Expression Master Mix (LifeTechnology, USA) according to the manufacturer's instructions. To assay transcripts quantities, commercially available Taqman Gene Expression Assays (LifeTechnology, USA) were used: CD68 (Mm 00838636_g1), Il1 β (Mm 00464228_m1), Rplp0 as housekeeper (F: GCC-ACC-TGG-AGA-ACA-ACC-C, R: GCC-AAC-AGC-ATA-TCC-CGA-ATC, PROBE: AGG-TCC-TCC-TTG-GTG-AAC-ACG-AAG-CC). The comparative 2- $\Delta\Delta$ CT method was used for relative quantification.

Gene Expression Studies

Gene expression profiles were performed at the GeT-TRiX facility using Agilent Sureprint G3 Mouse microarrays (8x60K, design 028005) following the manufacturer's instructions. For each sample, Cyanine-3 (Cy3) labeled cRNA was prepared from 25 ng of total RNA using the One-Color Quick Amp Labeling kit (Agilent) according to the manufacturer's instructions, followed by Agencourt RNAClean XP (Agencourt Bioscience Corporation, Beverly, Massachusetts). 600ng of Cy3-labelled cRNA were hybridized on the microarray slides following the manufacturer's instructions. Immediately after washing, the slides were scanned on Agilent G2505C Microarray Scanner using Agilent Scan Control A.8.5.1 software and fluorescence signal extracted using Agilent Feature Extraction software v10.10.1.1 with default parameters. Microarray data and experimental details are available in the Gene Expression Omnibus (GEO) database (accession GSEXXXXX).

Statistical Analysis

Results are expressed as Means \pm SEM. The significance of differences between groups was evaluated with Graph-Pad Prism (GraphPad Software). We first checked that the data for each group were normally distributed and that variances were equal. We then carried out two-tailed Student's t-test or one-way ANOVA corrected for multiple comparison with the Tukey post-hoc test, or Pearson correlation.

Microarray data were analyzed using R (www.r-project.org, R v. 3.1.2), using Bioconductor packages (www.bioconductor.org, v 3.0, [14]), as described in GEO entry GSEXXXXX. Raw data (median of pixels intensity) were log₂ transformed and normalized using quantile method [15]. A model was fitted using the limma lmFit function [16]. A correction for multiple testing was then applied using False Discovery Rate [17]. Probes with adjusted p-value ≤ 0.05 were considered differentially expressed between conditions. Hierarchical clustering was applied to the samples and the differentially expressed probes using 1-Pearson correlation coefficient as distance and Ward's criterion for agglomeration. The enrichment of Gene Ontology (GO) Biological Processes was evaluated using a conditional hypergeometric test [18].

Results

DIO promotes the expression of inflammatory genes in circumvallate papillae.

To explore the putative inflammatory effect of diet-induced obesity on taste tissue, a systematic transcriptomic analysis of circumvallate papillae (CVP) isolated from lean and DIO mice was undertaken using micro-arrays. Among the 64 genes differentially expressed, 9 are directly related with inflammation, 7 encoding for pro-inflammatory proteins (Aif1, Tlr12, Slamf9, Ptger1, Ccl3, C2cd4b, Cxcl5), and 2 for molecules with anti-inflammatory properties (Nfil3, ppp2Ca) (Fig. 1). Most of the identified genes are tightly related with immune cells, especially the monocytes/macrophages lineage (Table 2). As shown in Fig. 1-B, gustatory papillae from DIO mice displayed a pro-inflammatory genic profile as compared to lean controls.

There are associations between fat mass, plasma LPS levels and preference for fat.

Lipopolysaccharides (LPS) are known to be inflammatory endotoxins released from the dying gram-negative bacteria cell wall. Since *i)* High-fat DIO and metabolic endotoxemia-induced inflammation are tightly linked [19], and *ii)* mouse TBC are able to release pro-inflammatory cytokines in a TLR4-dependent manner (Feng PloS One 2012), the putative influence of blood LPS on the oro-sensory sensitivity to dietary lipids was compared in lean and DIO mice. Mice fed high fat diet (DIO) displayed a 2.5 fold more fat mass than lean controls (C). This change was corrected when formerly obese animals were subjected to a caloric restriction (DIO+R) (Fig. 2-A). Interestingly, a similar profile was found for plasma LPS levels, the higher value being found in DIO mice. Although the increase in LPS concentrations remained modest, as compared to control values, it was significant, suggesting a chronic low-grade inflammatory state in our DIO mouse model (Fig. 2-A). A close positive correlation was evidenced between adiposity and systemic LPS concentration (Fig. 2-B). To explore whether the decreased performance of oro-sensory detection of dietary lipids previously found in DIO mice [3] might be related to their inflammatory status, C and DIO mice were subjected to two-bottle preference tests and their systemic LPS concentrations were assayed. A negative association between plasma LPS levels and preference for oily solutions was found whatever the concentrations used (0.02, 0.2 or 2% rapeseed oil, m/m – Fig. 2-C).

Gustatory epithelium expresses inflammatory markers in DIO mice.

To determine whether the peripheral taste system might be challenged by the low-grade inflammation environment observed in obese mice, expression of genes encoding for 2 prototypical inflammatory markers was assayed in CVP from C, DIO and DIO+R mice. As shown in Fig. 3-A, DIO mice displayed greater IL1 β and CD68 mRNA levels than lean controls or DIO restricted animals. A positive association between the expression level of genes encoding for

pro-inflammatory cytokine IL1 β or macrophage marker CD68 gene and systemic LPS levels was found (Fig. 3-B).

Induction of a chronic low-grade endotoxemia is not sufficient to alter oral fat detection in lean mice.

To determine whether alterations of orosensory detection of lipids observed in DIO animals might be explained by the low-grade metabolic endotoxemia, lean mice were subjected to a chronic LPS load by using intra-peritoneal osmotic mini-pumps. Despite a 2-fold increase in the plasma LPS levels (Fig. 4-A), evolution of body mass (Fig. 4-B), IL1 β and CD68 mRNA levels (Fig. 4-C) and preference for fat (Fig. 4-D) remained similar in controls and LPS treated mice.

Discussion

DIO rodents are unable to detect properly low concentrations of lipids in oral cavity during brief-access licking tests [2, 3]. Origin of this oro-sensory defect remains elusive. The fact that *i*) obesity is an inflammatory disease [19] and *ii*) a fat mass loss induced by dietary restriction [3] or bariatric surgery [20] improved the oral fat detection performance in formerly obese rodents, has prompted us to explore the possible role of inflammation in the modulation of the oro-sensory sensitivity to lipids. The comparative transcriptomic analysis of CVP between lean and obese mice reported herein brings the first demonstration that obesity is associated with a local inflammation of the peripheral gustatory tissue. Among the 64 genes differentially expressed in CVP, 9 encode for pro-, or conversely, anti-inflammatory transcripts. Overall, our data reveal that DIO mice display a pro-inflammatory gene profile in CVP, as compared to lean controls. Most of these genes are known to be expressed by immune cells, especially from monocyte/macrophage lineage, suggesting that obesity induces an immune cell mobilization in the gustatory tissue. Interestingly, 2 of these genes, previously identified as being highly expressed in primate taste buds [21], encode for chemokines from CCL (Ccl3) and CXCL (Cxcl5) families known to be responsible for monocyte/macrophage attraction. Therefore, it is tempting to speculate that secretion of chemokines by TBC contributes to the local inflammation of the gustatory epithelium during obesity by promoting a defensive cellular remodeling. According to this assumption, several inflammatory cytokines, including $\text{INF}\gamma$, IL6 [22], $\text{TNF}\alpha$ [23] and IL10 [24], are known to be secreted by murine TBC. Moreover, immune cells have been identified in peripheral taste system in human [25].

DIO-mediated inflammation of the peripheral taste system was substantiated by using a cohort of mice independent of those represented Fig. 1. Indeed, the expression of both the prototypical inflammatory cytokine IL1 β and macrophage infiltration marker CD68, which was found to be increased in CVP from DIO mice, returned to control value in formerly obese mice subjected to a caloric restriction. Interestingly, IL1 β and CD68 regulate most of the pro-inflammatory genes identified by our transcriptomic study as being up-regulated in CVP from DIO mice (i.e. Ptger1, Aif1 and Ccl3) [26-28]. Altogether, these data raise the question of the nature of the triggering factor which might promote cytokine release by TBC during obesity.

It is admitted that a saturated HFD induces an intestinal dysbiosis leading to a rise in blood LPS levels [19]. Likewise, it was reported that an acute LPS intraperitoneal boost triggers an inflammation of gustatory tissue in the mouse [29]. Therefore, the hypothesis of an involvement of LPS in dysfunction of gustatory papillae was explored. As expected, the plasma LPS levels were slightly, but significantly greater in DIO mice than in lean controls, demonstrating that our DIO mouse model reproduces the metabolic endotoxemia usually found during obesity. Interestingly, this change was corrected in obese mice subjected to caloric

restriction, highlighting that plasma LPS levels were tightly related to adiposity. In line with this observation, the preference for fat was decreased when plasma LPS was increased, as previously found for fat mass. A positive correlation between systemic LPS concentration and IL1 β or CD68 mRNA levels was also found in CVP. Taken together, these data strongly suggest that LPS contributes to the inflammatory environment of the taste tissue observed during obesity in the mouse. To determine whether the LPS *per se* is sufficient to disturb the orosensory fat detection, a chronic low-grade endotoxemia, similar to those associated with DIO, was induced by delivering LPS using intra-peritoneally implanted osmotic mini-pump in lean mice. Surprisingly, no change in IL1 β or CD68 mRNA was elicited in CVP by the chronic rise in plasma LPS levels. Similarly, the oro-sensory detection of lipids was not affected in LPS-treated mice during behavioral tests. These unexpected results suggest that a systemic LPS level similar to that found in obesity is insufficient to reproduce the dysfunction in oral fat detection in lean animals. Therefore, the change in the taste sensitivity observed during obesity is likely the result of more complex systemic dysregulations.

By producing multiple surface receptors, TBC are both sensitive to endogenous (i.e. hormones, endocannabinoids, neurotransmitters) and exogenous (e.g. LCFA, LPS) factors. Integration of this information by gustatory papillae modulates not only the neuro-sensory messages sent to the brain, contributing to the construction of eating behavior, but also participates in the communication with their local environment by secreting informative molecules (hormones, cytokines, neurotransmitters ; for review, see [30]). It is well known that obesity is also associated with deep endocrine modifications some of which directly affect the functioning of TBC (e.g. hyperleptinemia). Therefore, the obesity-associated defect of oral fat detection is likely due to a combination of multiple systemic disturbances (LPS, hormones...) leading to an impairment of gustatory communication network. Identification of these disrupting factors of gustatory function might lead to new therapeutics to help fight against obesity.

Acknowledgements

This study was supported by grants from the French National Research Agency: ANR-12-BSV1-0027-01, SensoFAT-2 project (to P.B.) and ANR-11-LABX-0021-LipSTIC (to L.L.). AB was a post-doctoral fellow from ANR-11-LABX-0021-LipSTIC. The authors thank Jean-Christophe Blanchard for the animal management, Guillaume Maquart and Jean-François Merlin for the technical assistance.

References

1. Bartoshuk, L.M., et al., *Psychophysics of sweet and fat perception in obesity: problems, solutions and new perspectives*. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2006. **361**(1471): p. 1137-48.
2. Shin, A.C., et al., *"Liking" and "wanting" of sweet and oily food stimuli as affected by high-fat diet-induced obesity, weight loss, leptin, and genetic predisposition*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2011. **301**(5): p. R1267-80.
3. Chevrot, M., et al., *Obesity alters the gustatory perception of lipids in the mouse: plausible involvement of lingual CD36*. J Lipid Res, 2013. **54**(9): p. 2485-94.
4. Berthoud, H.R. and H. Zheng, *Modulation of taste responsiveness and food preference by obesity and weight loss*. Physiol Behav, 2012. **107**(4): p. 527-32.
5. Stoeckel, L.E., et al., *Widespread reward-system activation in obese women in response to pictures of high-calorie foods*. Neuroimage, 2008. **41**(2): p. 636-47.
6. Carnell, S., et al., *Neuroimaging and obesity: current knowledge and future directions*. Obes Rev, 2012. **13**(1): p. 43-56.
7. Behary, P. and A.D. Miras, *Food preferences and underlying mechanisms after bariatric surgery*. Proc Nutr Soc, 2015: p. 1-7.
8. Miras, A.D. and C.W. le Roux, *Bariatric surgery and taste: novel mechanisms of weight loss*. Curr Opin Gastroenterol, 2010. **26**(2): p. 140-5.
9. Wang, H., et al., *Inflammation and taste disorders: mechanisms in taste buds*. Ann N Y Acad Sci, 2009. **1170**: p. 596-603.
10. Cani, P.D., et al., *Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance*. Diabetes, 2007. **56**(7): p. 1761-72.
11. Laugerette, F., et al., *CD36 involvement in orosensory detection of dietary lipids, spontaneous fat preference, and digestive secretions*. J Clin Invest, 2005. **115**(11): p. 3177-84.
12. Martin, C., et al., *Lipid-mediated release of GLP-1 by mouse taste buds from circumvallate papillae: putative involvement of GPR120 and impact on taste sensitivity*. J Lipid Res, 2012. **53**(11): p. 2256-65.
13. Szponar, B., et al., *Distribution of 3-hydroxy fatty acids in tissues after intraperitoneal injection of endotoxin*. Clin Chem, 2003. **49**(7): p. 1149-53.
14. Gentleman, R.C., et al., *Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics*. Genome Biol, 2004. **5**(10): p. R80.
15. Bolstad, B.M., et al., *A comparison of normalization methods for high density oligonucleotide array data based on variance and bias*. Bioinformatics, 2003. **19**(2): p. 185-93.
16. Smyth, G.K., *Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments*. Stat Appl Genet Mol Biol, 2004. **3**: p. Article3.
17. Benjamini, Y. and Y. Hochberg, *Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing*. Journal of the Royal Statistical Society. , 1995. **57**(1): p. 289-300.
18. Falcon, S. and R. Gentleman, *Using GOstats to test gene lists for GO term association*. Bioinformatics, 2007. **23**(2): p. 257-8.
19. Cani, P.D., et al., *Changes in gut microbiota control metabolic endotoxemia-induced inflammation in high-fat diet-induced obesity and diabetes in mice*. Diabetes, 2008. **57**(6): p. 1470-81.
20. Shin, A.C. and H.R. Berthoud, *Food reward functions as affected by obesity and bariatric surgery*. Int J Obes (Lond), 2011. **35 Suppl 3**: p. S40-4.
21. Hevezi, P., et al., *Genome-wide analysis of gene expression in primate taste buds reveals links to diverse processes*. PLoS One, 2009. **4**(7): p. e6395.
22. Wang, H., et al., *Inflammation activates the interferon signaling pathways in taste bud cells*. J Neurosci, 2007. **27**(40): p. 10703-13.

23. Feng, P., et al., *Regulation of bitter taste responses by tumor necrosis factor*. Brain Behav Immun, 2015. **49**: p. 32-42.
24. Feng, P., et al., *Interleukin-10 is produced by a specific subset of taste receptor cells and critical for maintaining structural integrity of mouse taste buds*. J Neurosci, 2014. **34**(7): p. 2689-701.
25. Feng, P., et al., *Immune cells of the human peripheral taste system: dominant dendritic cells and CD4 T cells*. Brain Behav Immun, 2009. **23**(6): p. 760-6.
26. Wang, J., et al., *Tumor necrosis factor alpha- and interleukin-1beta-dependent induction of CCL3 expression by nucleus pulposus cells promotes macrophage migration through CCR1*. Arthritis Rheum, 2013. **65**(3): p. 832-42.
27. Alvarez-Soria, M.A., et al., *Prostaglandin E2 receptors EP1 and EP4 are up-regulated in rabbit chondrocytes by IL-1beta, but not by TNFalpha*. Rheumatol Int, 2007. **27**(10): p. 911-7.
28. Postler, E., et al., *"Allograft-inflammatory-factor-1 is upregulated in microglial cells in human cerebral infarctions"*. J Neuroimmunol, 2000. **108**(1-2): p. 244-50.
29. Cohn, Z.J., et al., *Lipopolysaccharide-induced inflammation attenuates taste progenitor cell proliferation and shortens the life span of taste bud cells*. BMC Neurosci, 2010. **11**: p. 72.
30. Besnard, P., P. Passilly-Degrace, and N.A. Khan, *Taste of fat, a sixth taste modality?* Physiol Rev, 2016 (in press). **96**.
31. Utans, U., et al., *Cloning and characterization of allograft inflammatory factor-1: a novel macrophage factor identified in rat cardiac allografts with chronic rejection*. J Clin Invest, 1995. **95**(6): p. 2954-62.
32. Koblansky, A.A., et al., *Recognition of profilin by Toll-like receptor 12 is critical for host resistance to Toxoplasma gondii*. Immunity, 2013. **38**(1): p. 119-30.
33. Wang, N., et al., *The cell surface receptor SLAM controls T cell and macrophage functions*. J Exp Med, 2004. **199**(9): p. 1255-64.
34. Brenner, C., et al., *Decoding cell death signals in liver inflammation*. J Hepatol, 2013. **59**(3): p. 583-94.
35. Maurer, M. and E. von Stebut, *Macrophage inflammatory protein-1*. Int J Biochem Cell Biol, 2004. **36**(10): p. 1882-6.
36. Warton, K., et al., *A novel gene family induced by acute inflammation in endothelial cells*. Gene, 2004. **342**(1): p. 85-95.
37. Sepuru, K.M., K.M. Poluri, and K. Rajarathnam, *Solution structure of CXCL5--a novel chemokine and adipokine implicated in inflammation and obesity*. PLoS One, 2014. **9**(4): p. e93228.
38. Kobayashi, T., et al., *NFIL3 is a regulator of IL-12 p40 in macrophages and mucosal immunity*. J Immunol, 2011. **186**(8): p. 4649-55.
39. Xie, L., et al., *Protein phosphatase 2A catalytic subunit alpha plays a MyD88-dependent, central role in the gene-specific regulation of endotoxin tolerance*. Cell Rep, 2013. **3**(3): p. 678-88.

Figures

Table 1 : Composition of the diets.

Content (% m/m)		Control (4RF21 Mucedola)	HF (4RF25 Mucedola + Palm oil)
Proteins		18.5	15
Carbohydrates	(starch)	53.5	34.4
Fats	Soya oil	3	2.4
	Palm oil	-	31.8
<i>of which</i>	<i>saturated fatty acids</i>	0.6	16.4
	<i>monounsaturated fatty acids</i>	0.7	12.6
	<i>polyunsaturated fatty acids</i>	1.7	5
Energy	kcal/100g	330	514

Table 2: *Inflammatory-related genes differentially expressed in circumvallate papillae of lean (control) and obese (DIO) mice.*

Genes	Functions	References
Aif1 Allograft Inflammatory Factor 1	Cytokine. Chronic inflammation process. Activation of macrophages.	[31]
Tlr12 Toll-Like Receptor 12,	Receptor. Host resistance. Promotes macrophage activation.	[32]
Slamf9 Signaling Lymphotic Activation Molecule Family Member 9	Receptor. Increases the production of inflammatory cytokines by macrophages.	[33]
Ptger1 Prostaglandin E Receptor 1 (Subtype EP1)	Receptor. Local inflammation mediated by PgE2. Activation of Th17.	[34]
Ccl3 Chemokine (C-C Motif) Ligand 3	Chemokine. Induces the chemotaxis of monocytes.	[35]
C2cd4b C2 Calcium-Dependent Domain Containing 4B	Pro-inflammatory cytokine.	[36]
Cxcl5 Chemokine (C-X-C motif) Ligand 5	Chemokine. Chemotaxis of neutrophils.	[37]
Nfil3 Nuclear Factor, Interleukin 3 Regulated	Nuclear receptor. Inhibits IL12 produced by macrophages. Decreases inflammation.	[38]
Ppp2ca Protein Phosphatase 2, Catalytic Subunit, Alpha Isozyme	Enzyme. Disrupts the signal promoting TLR4-MyD88 association. Decreases inflammation.	[39]

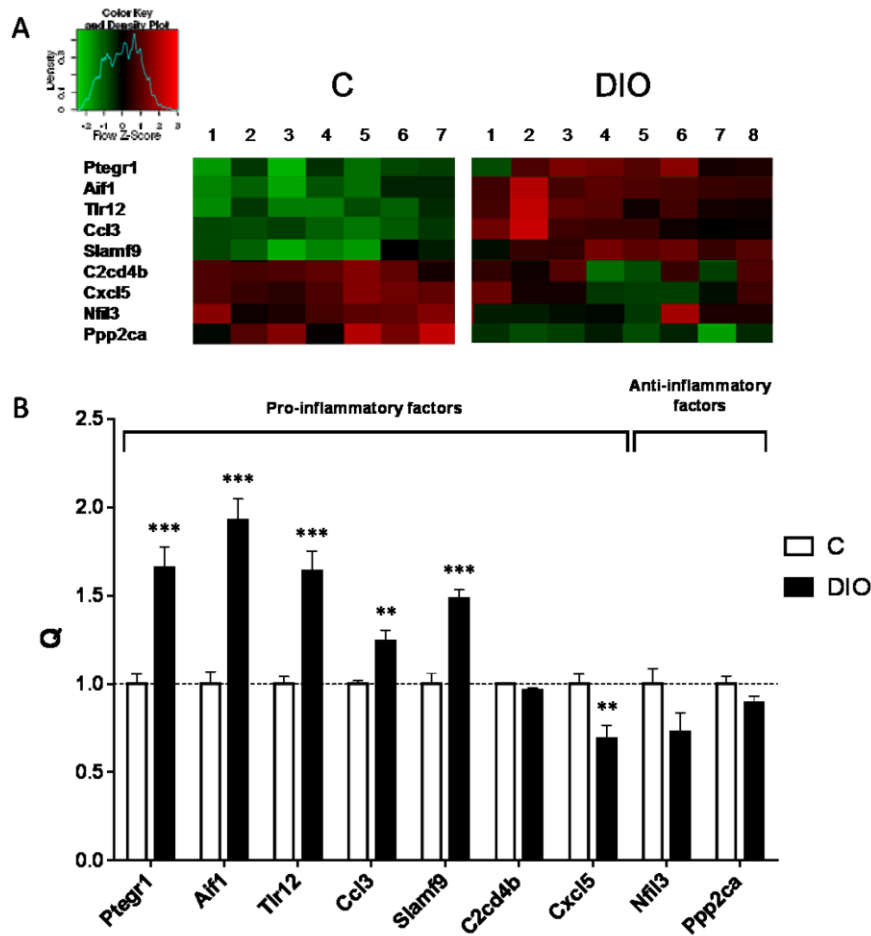


Fig.1: Transcriptomic analysis of circumvallate papillae (CVP) from control (C) and diet-induced obese (DIO) mice. A- Heat map representation of inflammatory-related genes. Increasing brightness indicates the relative fold-change rise (red) or drop (green) of gene expression. B- Relative expression of inflammatory genes in CVP from lean controls (C, n=7) and DIO (n=8) mice. Aif1, Allograph Inflammatory Factor 1; Tlr12, Toll-like receptor 12; Slamf9, signaling lymphotic activation molecule Family Member 9; Ptegr1, Prostaglandin E Receptor 1 (Subtype EP1); Ccl3 Chemokine (C-C Motif) Ligand 3; C2cd4b, C2 calcium-dependent domain containing4B; Cxcl5, Chemokine (C-X-C motif) ligand5; Nfil3, Nuclear factor interleukin 3 regulated; Ppp2ca, Protein Phosphatase 2, Catalytic Subunit, Alpha Isozyme. *, P<0.05; **, P<0.01; ***, P<0.001, n=7-8.

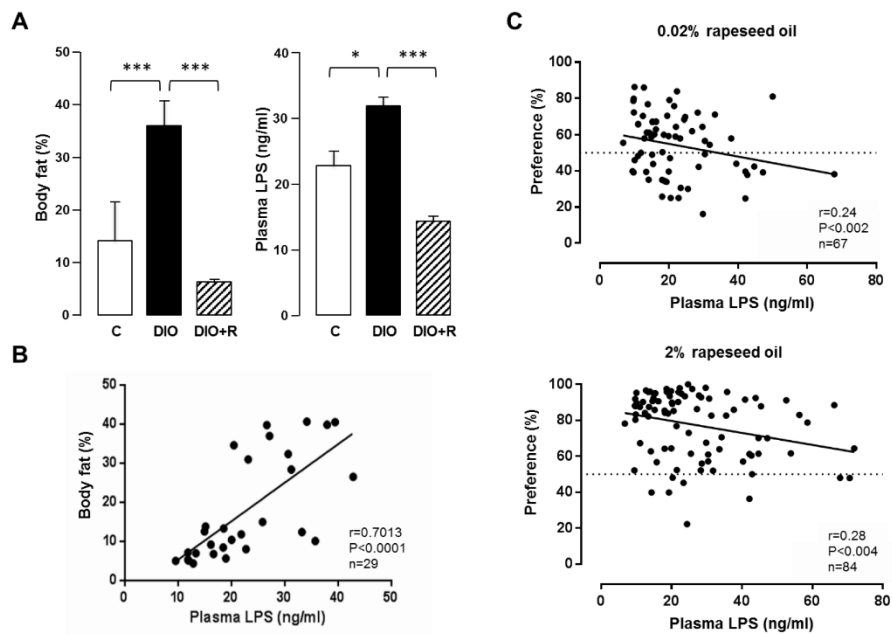


Fig. 2: Association between fat mass, plasma LPS levels and preference for fat. A- Body fat percentage and plasma LPS levels of chow-fed lean controls (C) and high fat fed obese mice before (DIO) and after a chronic caloric restriction (DIO+R). B- Positive correlation between body fat and plasma LPS levels. C- Negative correlation between plasma LPS levels and preference for oily solutions in lean controls (C) and obese (DIO) mice subjected to the two-bottle preference paradigm. *, $P<0.05$; **, $P<0.01$; ***, $P<0.001$, $n=9-10$.

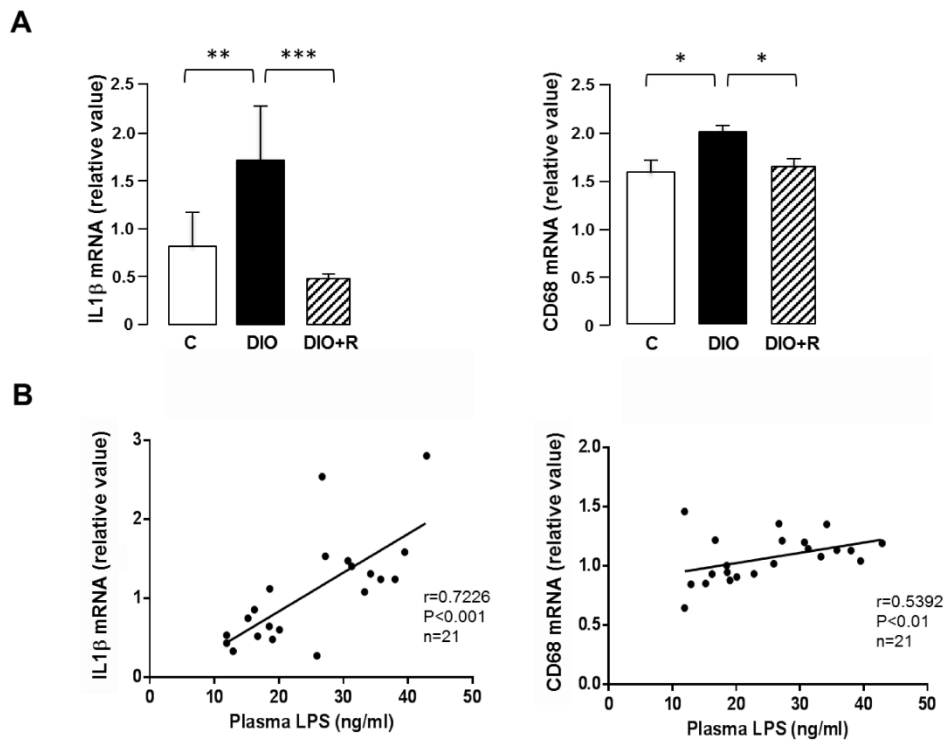


Fig. 3: Inflammatory markers expressed in the gustatory epithelium and relation with plasma LPS. A- Relative expression of genes encoding for 2 selective markers of inflammation and cells of macrophage lineage in the gustatory circumvallate papillae (CVP) from lean controls (C) and high fat-fed obese mice before (DIO) and after a chronic caloric restriction (DIO+R). B- Positive correlations between systemic LPS concentrations and expression of IL1β and CD68 in CVP from C, DIO and DIO+R mice. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$, $n = 9-10$.

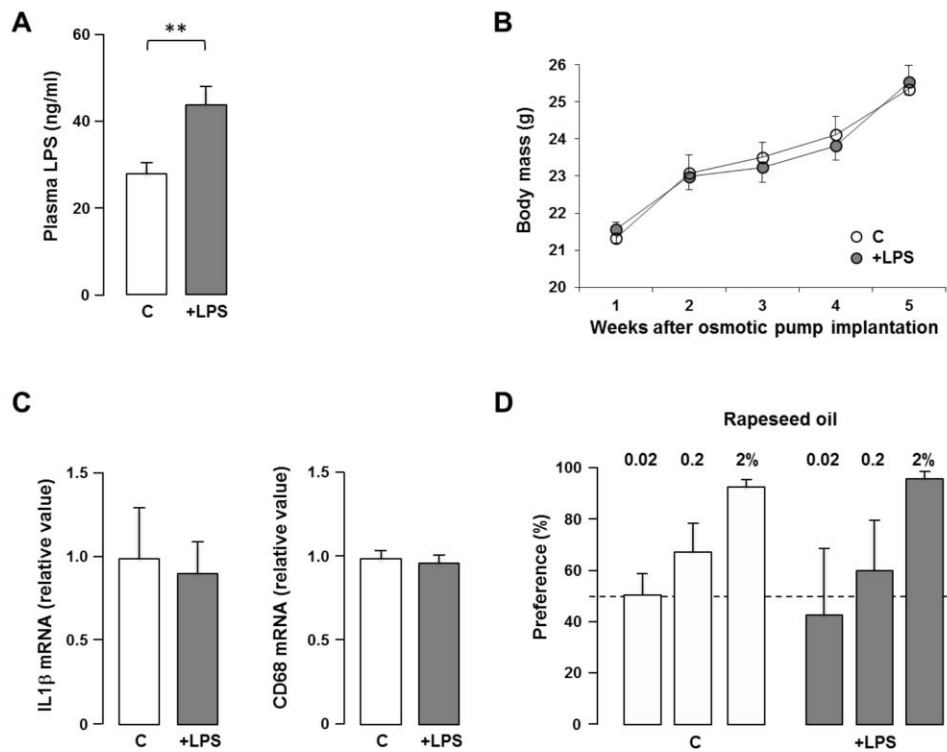


Fig.4: Chronic systemic infusion of saline (C) or LPS (+LPS, 300 µg/kg body mass/day) by an osmotic mini-pumps implanted subcutaneously in lean mice. A- Plasmas LPS concentrations in B- Evolution of the body mass. C- IL1β and CD68 mRNA levels. D- Preference for oily solutions in C and +LPS mice subjected to the two bottle preference paradigm. **, $P < 0.01$; $n = 10$.

III.3. Résultats complémentaires : effets des prébiotiques sur la détection gustative des lipides et du saccharose.

Le projet d'article n°3 indique que le LPS seul, à des niveaux d'endotoxémie bas bruit, n'est pas responsable de l'altération de la détection orosensorielle des lipides observée lors de l'obésité. Ceci ne signifie pas qu'il n'est pas malgré tout impliqué : le système s'avère en fait bien plus complexe. L'obésité étant une maladie multifactorielle, il est indispensable de considérer les causes possibles de la diminution de la sensibilité gustative à un niveau plus large. Or, il est connu qu'un régime HF entraîne une dysbiose intestinale, responsable d'une augmentation de la concentration plasmatique de LPS (Cani et al., 2007a; Cani et al., 2008).

Le lien entre le régime, le microbiote et l'obésité est illustré par une étude très intéressante datant de 2013 (Ridaura et al., 2013). Les auteurs montrent que la transplantation fécale du microbiote de jumeaux discordants en termes d'obésité à des souris axéniques transmet le phénotype « obèse » ou « non-obèse » aux souris. Par ailleurs, le régime alimentaire des souris receveuses joue un rôle prépondérant dans la composition du microbiote et le risque d'obésité. En effet, dans cette étude, les souris transplantées avec les microbiotes des jumeaux obèses ou non-obèses ont été placées ensemble dans les cages de vie. Lorsque les souris étaient nourries avec un régime riche en fibre et pauvre en AGS, elles étaient protégées contre l'obésité. Une invasion de bactéries, notamment des Bacteroidetes, des souris transplantées avec le microbiote des jumeaux minces vers les souris portant le microbiote des jumeaux obèses avait lieu. En revanche, lorsque les souris étaient nourries avec un régime riche en AGS et pauvre en fibres, il n'y avait pas de transfert de bactéries « protectrices » et les souris transplantées avec le microbiote des jumeaux obèses devenaient elle-même obèses. Le microbiote intestinal se situe donc à l'interface entre le régime alimentaire et le risque d'obésité.

De plus, il semble que le microbiote soit capable d'influencer les préférences alimentaires : des souris axéniques montrent en effet une préférence plus élevée que les souris conventionnelles pour une faible concentration d'Intralipide lors de tests de double-choix long-terme, associée à une expression plus élevée du CD36 lingual (Duca et al., 2012). Dans l'ensemble, il est donc possible d'imaginer qu'une action sur le microbiote puisse entraîner une régulation de la détection des saveurs.

Il existe différents moyens d'action sur le microbiote intestinal. Parmi les plus simples à mettre en place, les prébiotiques sont des composés fermentescibles qui permettent des modifications dans la composition et/ou l'activité du microbiote, dans le sens d'un bénéfice pour l'hôte. Ce sont des composés glucidiques de la famille des fibres : oligofructose ou inuline par exemple, qui résistent à la digestion dans l'intestin grêle et atteignent le colon où ils sont fermentés par le microbiote (Slavin, 2013). De nombreuses études montrent les bénéfices de l'utilisation de prébiotiques, notamment dans l'amélioration de la barrière intestinale et la prévention de l'obésité et de l'inflammation chronique (Cani and Everard, 2015; Everard and Cani, 2013).

III.3.1. Effet des prébiotiques sur le phénotype des souris

Une étude préliminaire a été mise en place en collaboration avec l'équipe de Nathalie Delzenne (Université catholique de Louvain, Belgique), dans le cadre du projet FOOD4GUT (financé par la Région Wallonne). L'objectif était d'étudier l'effet potentiel d'une modification du microbiote par des prébiotiques sur la détection orale des lipides et également du sucré qui sert de contrôle.



Figure 49 : Noms et codes couleur des groupes de souris pour l'étude de l'effet des prébiotiques sur la détection des lipides et du sucré.

STD-T : régime standard témoin ; STD-P : régime standard + prébiotiques ; HF-T : régime *high-fat* témoin ; HF-P : régime *high-fat* + prébiotiques.

Quatre groupes de souris C57Bl6 (n=9-10) du même âge ont été utilisés, avec 4 régimes différents (figure 49). Le prébiotique utilisé est de l'inuline (polymères de fructose), composée au minimum de 90% d'inuline, et au maximum de 10% de glucose, fructose et/ou saccharose. L'inuline a été administrée aux souris par le biais du régime, à raison de 10% en masse de celui-ci.

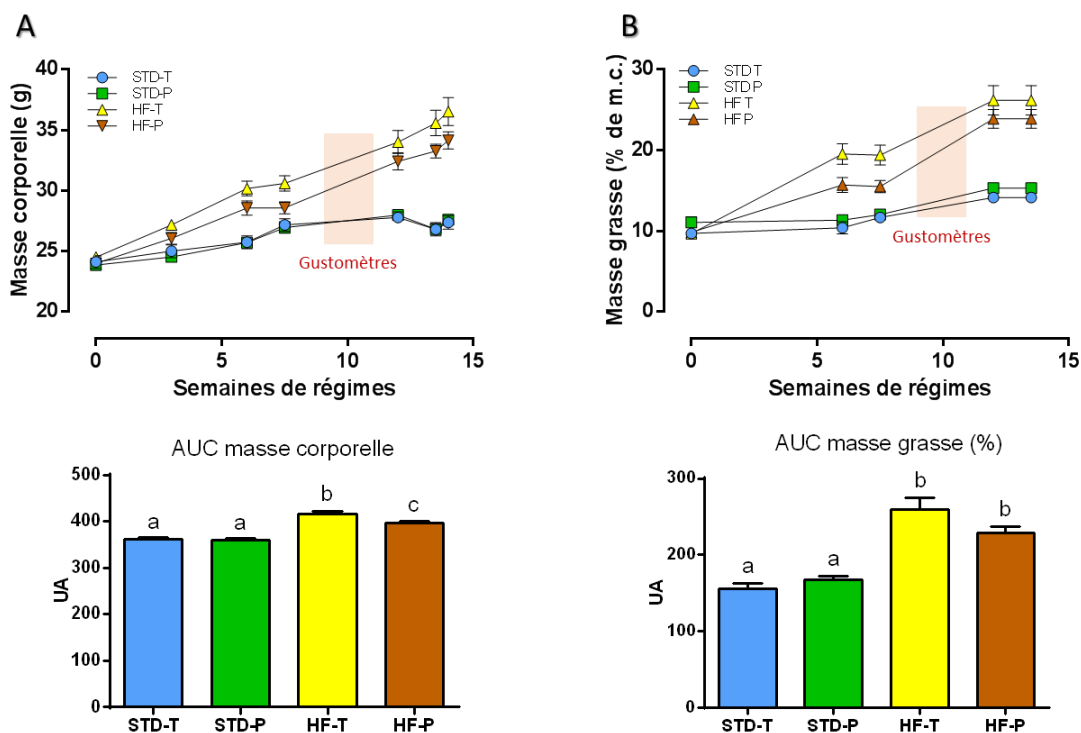


Figure 50 : Evolution de la masse corporelle (A) et de la masse grasse (B) des souris en régime standard ou *high-fat*, avec ou sans prébiotiques.

P < 0.05. N = 10.

AUC : aire sous courbe ; STD-T : régime standard témoin ; STD-P : régime standard + prébiotiques ; HF-T : régime *high-fat* témoin ; HF-P : régime *high-fat* + prébiotiques.

Le suivi de la composition corporelle des souris montre, comme attendu, une nette différence entre les souris en régime STD et les souris en régime HF (figure 50). Concernant l'effet des prébiotiques, il est visible chez les souris HF uniquement, avec une légère tendance à une moindre prise de poids chez les HF-P, comme déjà montré avec des quantités similaires de prébiotiques mais cette fois ajoutées à l'eau de boisson (Everard et al., 2011). Ces résultats coïncident avec les données de prise alimentaire en termes de calories ingérées (figure 51) et ne peuvent pas être attribuées à l'effet satiétogène des fibres car il n'y a pas de différence en termes de quantités consommées (Slavin, 2013).

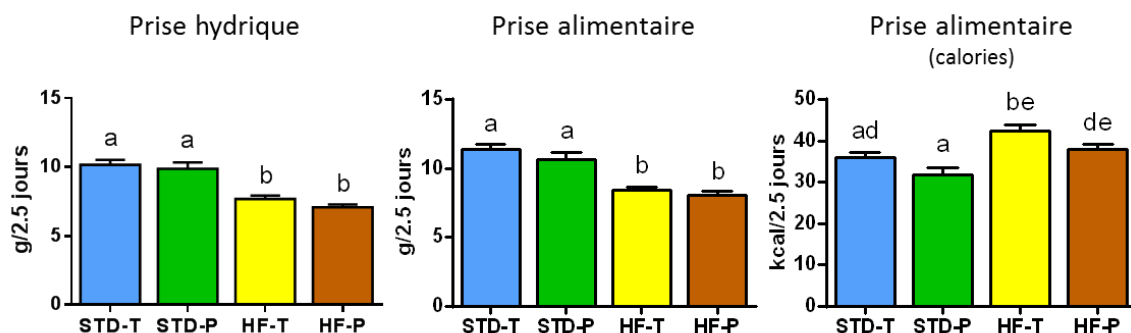


Figure 51 : Prise alimentaire et hydrique des souris en régime standard ou *high-fat*, avec ou sans prébiotiques.

13 semaines de régime. $P < 0.05$. $N = 9-10$.

STD-T : régime standard témoin ; STD-P : régime standard + prébiotiques ; HF-T : régime *high-fat* témoin ; HF-P : régime *high-fat* + prébiotiques.

Pour estimer de manière globale l'effet des prébiotiques sur les préférences, des tests de double-choix ont été réalisés (figure 52). Pour les deux concentrations d'huile de colza utilisées (0.2 et 2% m/V) ainsi que pour le saccharose (1% m/V), les souris en régime HF montrent une diminution de la préférence, confirmant les résultats obtenus dans l'article n°2 ainsi que par d'autres auteurs (Shin et al., 2011a). Les prébiotiques semblent entraîner une légère amélioration : la préférence des souris HF-P est très légèrement augmentée par rapport aux souris HF-T pour l'huile de colza (0.2% m/V).

Double-choix (12h)

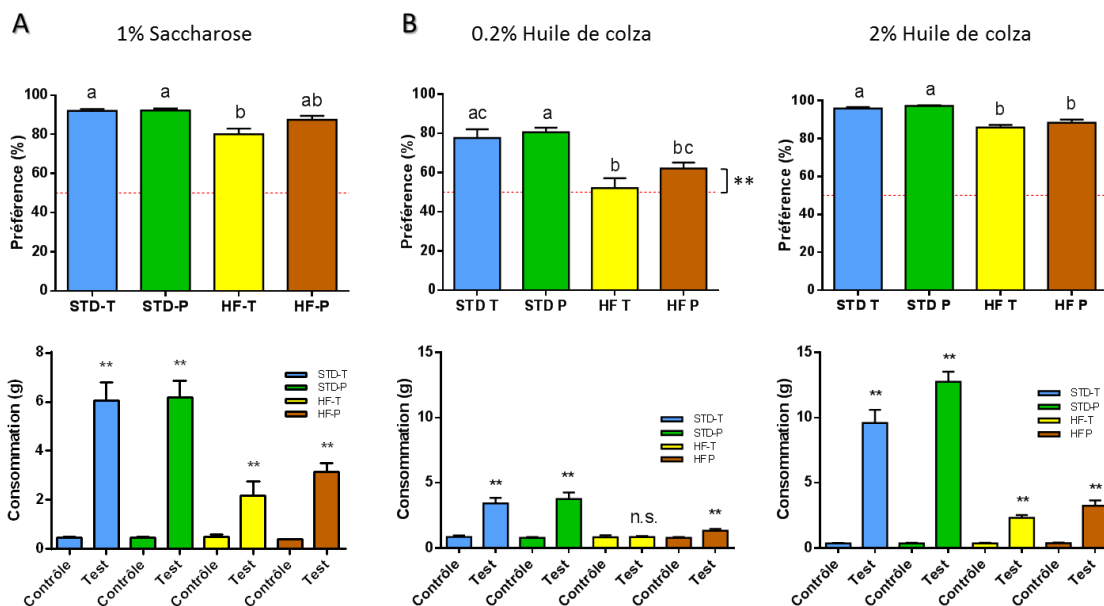


Figure 52 : Double-choix (12h) sur les souris en régime standard ou *high-fat*, avec ou sans prébiotiques.

Solution test : 1% saccharose (A) ou 0.2% et 2% (m/V) d’huile de colza (B) dans 0.3% XG vs. solution contrôle : 0.3% XG.

6-8 semaines de régime. $P < 0.05$. ** $P < 0.01$. n.s. : non significatif. $N = 10$.

STD-T : régime standard témoin ; STD-P : régime standard + prébiotiques ; HF-T : régime *high-fat* témoin ; HF-P : régime *high-fat* + prébiotiques ; XG : gomme de xanthane.

Afin de porter plus loin l’analyse des comportements alimentaires et d’observer les effets plus spécifiquement au niveau oral, des tests à court terme s’avéraient nécessaires. Ce projet a été l’occasion d’utiliser un nouvel appareillage de type gustomètre mis au point avec l’équipe du plateau technique du laboratoire, qui fait l’objet d’un dépôt de brevet en cours. De ce fait, le concept de l’appareil et les modalités de son utilisation ne peuvent pas être détaillées dans cette thèse. En dépit du fait qu’au moment où cette étude a été réalisée la mise au point n’était pas totalement finalisée, les résultats préliminaires obtenus sont intéressants.

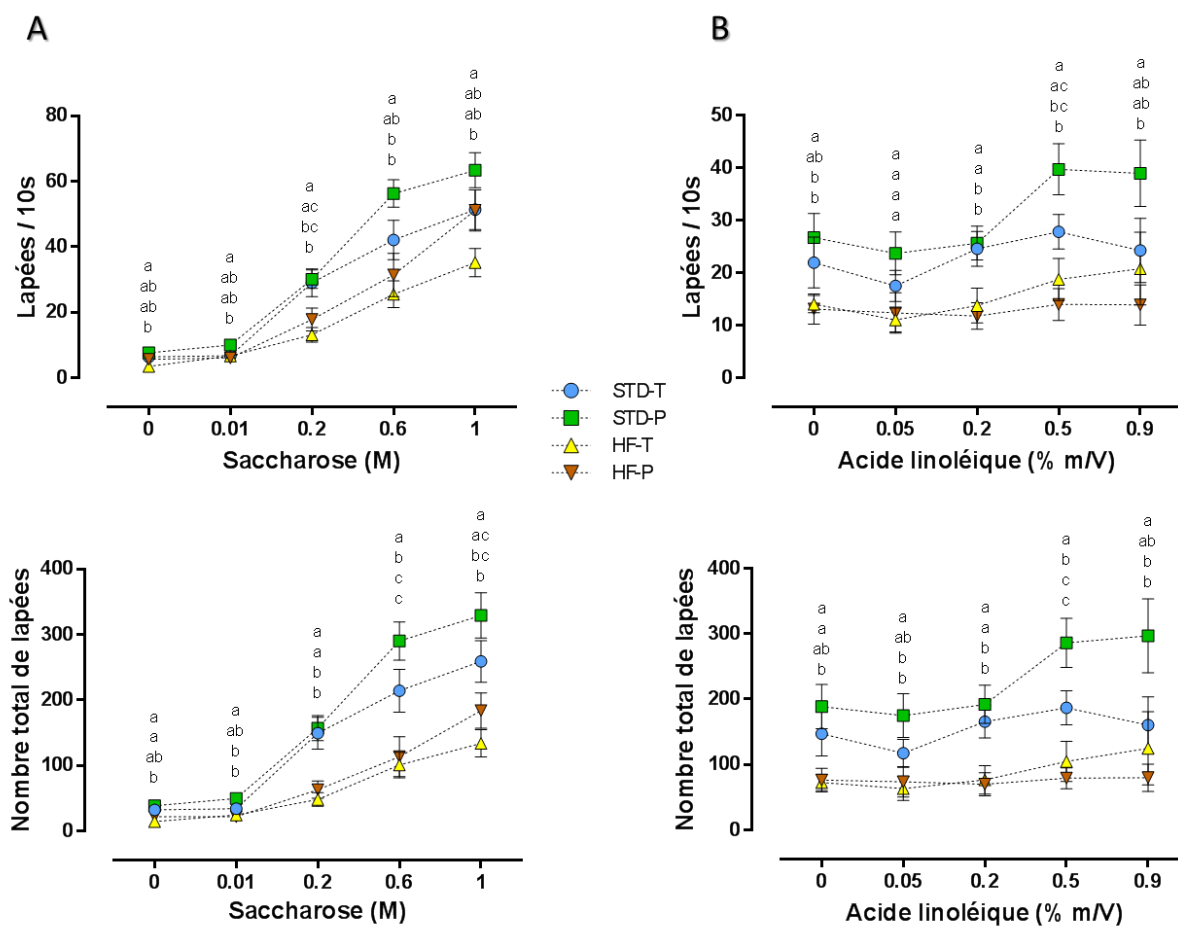


Figure 53 : Tests de *licking* en gustomètres, avec différentes concentrations de saccharose (A) ou d'acide linoléique (B) sur les souris en régime standard ou *high-fat*, avec ou sans prébiotiques.

9-10 semaines. $P < 0.05$. $N = 9-10$.

STD-T : régime standard témoin ; STD-P : régime standard + prébiotiques ; HF-T : régime *high-fat* témoin ; HF-P : régime *high-fat* + prébiotiques.

La figure 53 montre les résultats obtenus lors des tests en gustomètres, avec différentes concentrations de saccharose ou de LA. Les gustomètres permettent à la fois de déterminer des seuils de détection, mais également de comparer les réponses des souris par rapport à la valeur hédonique des stimuli. Les fenêtres de temps étudié sont extrêmement courtes (10s) et permettent de limiter les influences post-ingestives. Celles-ci ne peuvent toutefois pas être totalement éliminées car l'ensemble des concentrations est présenté plusieurs fois à la souris dans une même session de gustomètres. Les courbes obtenues pour le saccharose sont caractéristiques du lien entre la dose et la réponse observé dans ce type d'expérience (Shin et al., 2011a). Pour le LA, les courbes sont moins caractéristiques, mais on observe tout de même une légère augmentation du nombre de lapées en fonction de la concentration.

Les résultats obtenus confirment une fois de plus la moindre capacité des souris en régime HF à détecter les saveurs. Les courbes dose-réponse sont en effet décalées vers la droite. De manière surprenante, on observe cette fois-ci un effet très peu marqué des prébiotiques chez les souris en régime STD, alors qu'il n'y a aucune différence significative entre les HF-T et les HF-P.

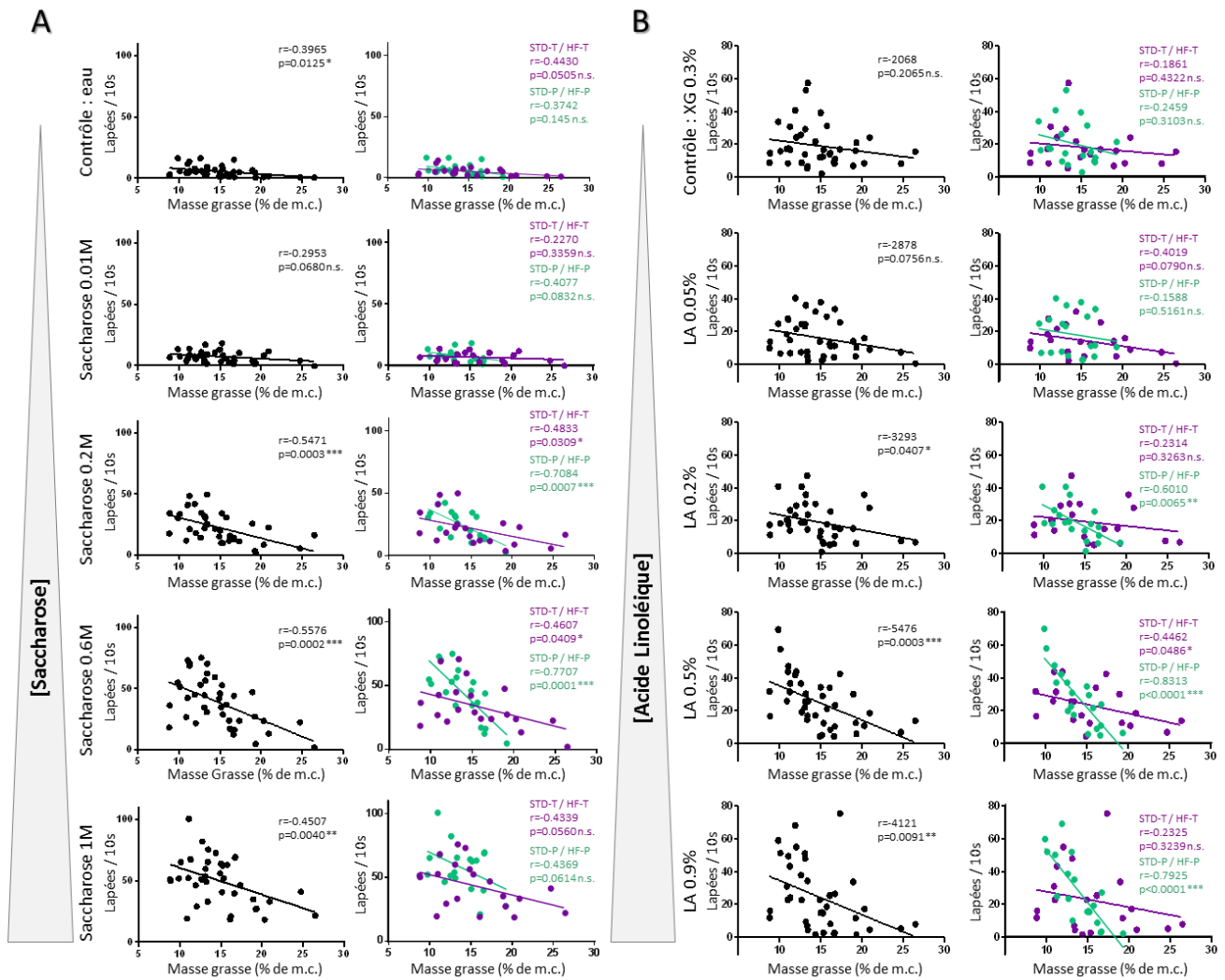


Figure 54 : Corrélations entre les résultats des gustomètres pour les différentes concentrations de saccharose (A) ou d'acide linoléique (B) et le pourcentage de masse grasse chez les souris en régime standard ou *high-fat*, avec ou sans prébiotiques.

9-10 semaines de régime. N = 9-10.

LA : acide linoléique ; STD-T : régime standard témoin ; STD-P : régime standard + prébiotiques ; HF-T : régime *high-fat* témoin ; HF-P : régime *high-fat* + prébiotiques.

La figure 54 met en évidence des corrélations inverses entre la capacité de détection du LA et du saccharose, et le pourcentage de masse grasse. Ceci va, là encore, dans le sens d'une altération de la détection des saveurs lorsque la masse corporelle augmente. La corrélation est de manière générale plus importante lorsque l'on considère les souris sous prébiotiques. Ceci est dû à deux facteurs : d'une part, les souris HF-P ont des plages de valeurs de masse grasse plus restreintes que les souris HF-T, et d'autre part, les souris STD-P ont une capacité de détection plus importante que les souris STD-T.

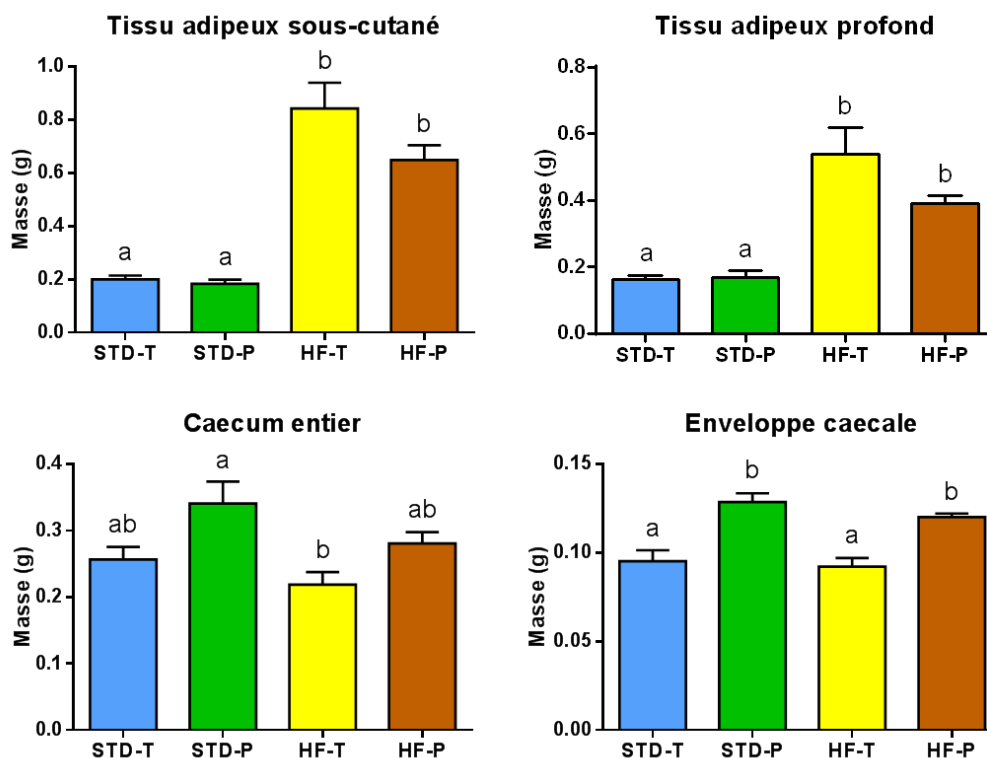


Figure 55 : Masses des organes prélevés lors du sacrifice des souris en régime standard ou *high-fat*, avec ou sans prébiotiques.

13 semaines de régime. $P < 0.05$. $N = 9-10$.

STD-T : régime standard témoin ; STD-P : régime standard + prébiotiques ; HF-T : régime *high-fat* témoin ; HF-P : régime *high-fat* + prébiotiques.

Après 13 semaines de régime, les masses des tissus adipeux sous-cutané et profond sont sans surprise plus élevées chez les souris en régime HF (figure 55). L'inuline a tendance à diminuer la masse du tissu adipeux, bien que la différence ne soit pas significative. De manière surprenante, la masse du caecum est semblable chez les souris HF par rapport aux STD contrairement à ce qui pouvait être attendu (Neyrinck et al., 2012). En revanche, les prébiotiques augmentent bien la masse totale du caecum et de son enveloppe, sans doute en raison d'un effet trophique lié à la production d'AGCC suite à la fermentation des fibres (Freitas Kde et al., 2012; Neyrinck et al., 2012).

III.4. Discussion

III.4.1. Le LPS est-il responsable de l'altération de la détection orosensorielle des lipides au cours de l'obésité ?

Par une approche intégrée sans à priori (puces à ADN - article n°3), nous avons constaté que les papilles caliciformes issues de souris obèses expriment de façon plus prononcée des gènes codant pour des marqueurs caractéristiques de cellules immunitaires connues pour être impliqués dans le processus inflammatoire, comme les cellules de la lignée monocytes/macrophages. Ce résultat inédit suggère l'existence d'une invasion macrophagique au niveau des papilles caliciformes chez la souris obèse. En accord avec cette hypothèse, une augmentation des ARNm codant pour un marqueur macrophagique, le CD68, a été constatée. De plus, le taux d'IL-1 β , médiateur de la réponse inflammatoire, est également augmenté. Toutefois, cette inflammation locale peut être corrigée si les souris obèses sont soumises à une restriction calorique. Le statut pro-inflammatoire des tissus gustatifs périphériques de la souris obèses est donc réversible.

Nous avons vu dans l'article n°2 que l'obésité entraîne une altération de la détection orosensorielle des lipides. Le fait que l'obésité soit associée à une augmentation des taux plasmatiques de LPS d'une part (Cani et al., 2007a), et que l'injection aiguë de LPS entraîne la production de cytokines inflammatoires et une altération du renouvellement cellulaire dans les papilles d'autre part (Cohn et al., 2010; Wang et al., 2009), suggérait que le LPS pouvait être responsable de la diminution de la détection gustative des lipides au cours de l'obésité.

Il est intéressant de noter que les taux de CD68 et d'IL-1 β sont corrélés à ceux du LPS plasmatique, qui lui-même est corrélé à la masse grasse. Le LPS est par ailleurs inversement corrélé à la préférence pour l'huile de colza, ce qui conforte encore l'hypothèse d'un rôle du LPS dans l'altération de la détection des lipides. Cependant, une corrélation n'indique pas une relation de cause à effet, c'est pourquoi nous avons choisi un modèle nous permettant d'étudier l'action du LPS seul, à des niveaux correspondant à une endotoxémie métabolique (Cani et al., 2007a).

Grâce à des pompes implantées en sous-cutané et reliées à la cavité intrapéritonéale, des doses faibles et continues de LPS ont été diffusées pendant 4 semaines chez des souris en régime STD. De manière surprenante, ces souris n'ont pas gagné plus de masse corporelle que les souris contrôles, contrairement à ce qu'a montré l'équipe de Patrice Cani (Cani et al., 2007a). Pourtant, les dosages plasmatiques montrent bien une augmentation des taux de LPS par rapport aux souris contrôles. Le microbiote joue un rôle important dans la prise de poids (Backhed et al., 2004), et sa composition est variable d'une animalerie à l'autre (Linnenbrink et al., 2013) ; il donc est possible que des variations de microbiote puissent expliquer les masses corporelles différentes entre les deux équipes. Contrairement à ce qui était attendu, aucune diminution de la préférence pour l'huile de colza et aucune différence d'expression de l'IL-1 β et du CD68 au niveau de la papille caliciforme n'ont pu être observées chez les

souris traitées au LPS. Ainsi, le LPS n'est pas responsable à lui seul de l'altération de la détection orosensorielle des lipides au cours de l'obésité. Ceci n'exclut pas un rôle de l'endotoxine, mais d'autres facteurs sont impliqués et agissent probablement de concert en réponse à l'augmentation de masse grasse d'une part (avec une modification du statut hormonal et une augmentation de cytokines inflammatoires produites par le tissu adipeux), mais également aux modifications du microbiote intestinal d'autre part.

III.4.2. L'utilisation de prébiotiques améliore-t-elle la détection orosensorielle des lipides ?

Le microbiote apparaît comme un « chef d'orchestre » de nombreuses fonctions physiologiques et joue un rôle important dans la mise en place de l'obésité (Boutagy et al., 2015; Everard and Cani, 2013). En intervenant sur ce microbiote grâce à l'utilisation de prébiotiques, il est possible d'améliorer les désordres métaboliques associés à l'obésité et au diabète de type II (Everard and Cani, 2013). Un certain nombre de bactéries « bénéfiques » sont augmentées lors d'une supplémentation en prébiotiques. Parmi elles, *Bifidobacterium* spp représente un groupe complexe de bactéries, qui est diminué lors d'un régime HF (Cani et al., 2007a) et augmenté par l'utilisation de prébiotiques de type inuline (Salazar et al., 2014). Les bifidobactéries permettent d'améliorer l'homéostasie du glucose et l'inflammation associée à l'obésité (Cani et al., 2007b). Les mécanismes d'action des prébiotiques sont multiples et impliquent notamment la modulation de la sécrétion de peptides gastro-intestinaux produits par les cellules entéroendocrines L, et impliqués dans le contrôle de la prise alimentaire, tels que le GLP-1 et le PYY (Everard and Cani, 2013). Un autre peptide, le GLP-2, également produit par les cellules intestinales L, est augmenté par l'action des prébiotiques sur le microbiote. Le GLP-2 est très important pour l'intégrité de la membrane intestinale (Cani et al., 2009). Ces peptides sont en partie sécrétés par l'intermédiaire de l'activation de certains récepteurs. GPR41 et GPR43 sont activés par les AGCC (acétate, butyrate, propionate) produits par la fermentation des fibres (Cani et al., 2013). GPR119 quant à lui, est activé par des endocannabinoïdes tels que le 2-OG qui est augmenté notamment par une bactérie spécifique : *Akkermansia muciniphila*, elle-même stimulée par les prébiotiques (Everard et al., 2011). Notons que l'augmentation de la production de ces peptides se fait également grâce à la multiplication des cellules L-intestinales sous l'action des prébiotiques (Everard et al., 2011). Au niveau des bourgeons du goût, différents récepteurs sont exprimés, qui pourraient potentiellement être influencés par les produits du microbiote intestinal ou leurs dérivés, par exemple le GLP-1R (Shin et al., 2008), le GPR41, le GPR43 (Gilbertson et al., 2010), ou encore le CB1R (Yoshida et al., 2010).

Partant de ces observations, nous avons supplémenté des souris en régime STD et HF avec de l'inuline, polysaccharide possédant un effet prébiotique (Slavin, 2013). Notre hypothèse était qu'une modification du microbiote par des prébiotiques, notamment chez les souris obèses, pourrait permettre d'améliorer les capacités de détection orosensorielle des lipides, et également du saccharose que nous

avons utilisé comme contrôle. Les double-choix effectués ne permettent pas de confirmer de manière convaincante cette hypothèse : on observe une très légère amélioration dans le groupe HF-P par rapport au groupe HF-T, mais uniquement pour l'huile de colza à 0.2%.

Pour étudier plus précisément la détection périphérique, un appareillage de type gustomètre a été mis au point afin de déterminer des seuils de détection. Dans ces expériences, la valeur hédonique des stimuli ou *liking*, relayée par le système gustatif, est évaluée en limitant fortement les influences post-ingestives. De manière globale, sans tenir compte des groupes, les courbes de réponse pour le saccharose sont caractéristiques du lien dose-réponse (Shin et al., 2011a). Elles le sont moins pour le LA : le mode de préparation des solutions est probablement en cause. En effet, la procédure et les solutions utilisées ne permettent pas une émulsion homogène et stable dans le temps. Or, il est connu que la taille des gouttelettes influence la perception du contenu en lipides d'une solution (Mela et al., 1994). De plus, aucun antioxydant n'a été ajouté au moment de la préparation des solutions. On voit donc que ces tests réalisés en gustomètre nécessitent encore des améliorations. L'utilisation d'un homogénéiseur à ultrasons pour émulsionner de façon stable les lipides, et l'ajout d'antioxydant serait une première étape nécessaire pour une comparaison efficace des différentes concentrations à différents temps d'expérimentation. Les résultats concernant le LA sont donc à prendre avec précaution.

Quoiqu'il en soit, à la fois pour le saccharose et pour le LA, les souris en régime HF répondent moins efficacement aux stimuli que les souris en régime STD, comme attendu. Il est en revanche surprenant de constater qu'il n'y a aucune différence entre les groupes HF-T et HF-P en termes de nombre de lapées pour les différentes concentrations utilisées, alors que les souris STD-P répondent légèrement mieux que les STD-T. Cependant, d'un point de vue statistique, cette différence n'est visible que si l'on considère le nombre total de lapées sur toute la durée de l'expérience. Or, ce facteur est très variable d'une souris à l'autre, et peut dépendre de différents paramètres : état de stress de la souris, état de faim et de soif, bruit dans l'animalerie etc. Même si les expériences ont été réalisées de manière à limiter au maximum ces variations (toujours le même manipulateur, décalage des mises à jeun etc.), elles ne peuvent pas être totalement exclues.

Ainsi, il est difficile de conclure sur ces expériences qui restent préliminaires. On peut en effet juger que les différents effets observés sont trop faibles pour pouvoir être considérés comme significatifs. Dans ce cas, les prébiotiques n'auraient aucun effet, et le microbiote n'influencerait pas non plus la détection du gras et du sucre chez les souris. L'altération de la détection orosensorielle des lipides au cours de l'obésité serait alors due uniquement à la masse grasse et potentiellement à l'inflammation associée. Cependant, cette hypothèse serait surprenante en regard de l'importance du microbiote dans l'ensemble des phénomènes liés à l'homéostasie énergétique (Cani and Everard, 2015). Un exemple probant est celui du by-pass gastrique. Réalisé en cas d'obésité sévère, le bypass permet d'induire une

perte de poids rapide, de réduire la masse grasse et d'améliorer le métabolisme du glucose, et donc le diabète de type II. En 2013, Liou et ses collaborateurs ont apporté une belle démonstration de l'impact du microbiote sur le métabolisme de l'hôte. Le transfert du microbiote de souris ayant subi un bypass gastrique chez des souris axéniques n'ayant pas eu d'intervention entraîne une diminution de la masse corporelle et de la masse grasse, comparé à des animaux qui ont reçu le microbiote de donneurs ayant subi une chirurgie placebo (Liou et al., 2013). D'autre part, après un bypass, les patients et les rats montrent une modification de la perception des aliments gras et sucré (Berthoud and Zheng, 2012). Il est donc raisonnable de penser que le microbiote joue un rôle à la fois dans la gestion de la masse corporelle, et à la fois dans les comportements alimentaires et la détection des saveurs, peut-être à travers la modulation de la production d'hormones gastro-intestinales comme c'est le cas après un bypass (Berthoud and Zheng, 2012). Dans le cadre de nos expériences, on peut alors considérer que l'effet des prébiotiques serait faible mais existant dans le cas des souris STD en gustomètres. Concernant les souris HF, on peut supposer que l'action des prébiotiques soit insuffisante, en tous cas dans nos conditions d'expérimentation, pour observer des effets au niveau orosensoriel. Les mécanismes modifiant la détection orale chez les souris obèses semblent en effet clairement multifactoriels et non mutuellement exclusifs (dysbiose, inflammation, hormones).

Des analyses suite au sacrifice des souris de cette expérience sont actuellement en cours pour tenter d'y voir plus clair, avec notamment un dosage plasmatique du LPS et une étude de la composition du microbiote des différents groupes de souris. Il est nécessaire de réaliser une 2nde étude, en améliorant les conditions d'expérimentation et en augmentant le nombre d'animaux afin de pouvoir observer un effet potentiellement faible des prébiotiques sur la détection orosensorielle des lipides et du sucré.

Discussion générale

Au cours de cette thèse, nous avons tenté de répondre à différentes interrogations concernant le concept émergent de « goût du gras » et le lien possible avec l'obésité. Des approches mécanistiques et comportementales ont été utilisées pour étudier :

- le fonctionnement du système gustatif périphérique de détection des lipides et notamment les rôles de deux lipido-récepteurs présents dans les bourgeons du goût : CD36 et GPR120,
- l'altération du système au cours de l'obésité et les mécanismes périphériques associés,
- l'origine potentiellement inflammatoire de cette altération.

Nous avons vu dans un premier temps que le GPR120 n'est pas indispensable à la détection orosensorielle des lipides. Mais comment expliquer sa présence concomitante à celle de CD36 dans les papilles gustatives ?

Comment réconcilier les rôles du CD36 et du GPR120 dans les papilles gustatives ?

Au vu des données présentées dans l'article n°1, il est possible d'imaginer le scénario suivant pour expliquer les rôles respectifs du CD36 et du GPR120 dans les bourgeons du goût : au début d'un repas, les AGLC vont se fixer en priorité sur le récepteur CD36 (figure 56-1) qui possède une plus forte affinité de liaison que le GPR120 (nM vs. μ M) (Baillie et al., 1996; Hirasawa et al., 2005), qui va lui-même lier les AGLC lorsque leur concentration sera suffisante. Les deux récepteurs étant localisés dans des radeaux lipidiques (Ozdener et al., 2014; Pohl et al., 2005), la liaison avec des AG va entraîner leur association avec des protéines responsables de la signalisation, à savoir les Src-PTK pour le CD36 (Huang et al., 1991) et une protéine G α q pour le GPR120 (Hirasawa et al., 2005). Ce phénomène va entraîner une signalisation cellulaire spécifique se traduisant par une augmentation de $[Ca^{2+}]_i$ (figure 56-2). Dans le cas du CD36, la sécrétion de neurotransmetteurs (figure 56-4) permettrait la transduction du message lipidique jusqu'au cerveau *via* les nerfs gustatifs (El-Yassimi et al., 2008; Gaillard et al., 2008). Dans le même temps, le CD36 serait progressivement internalisé (figure 56-3) suite à son ubiquitination (Su and Abumrad, 2009). Ce phénomène serait suivi de la dégradation partielle du CD36 par le protéasome (Tran et al., 2011), entraînant ainsi une diminution progressive de la motivation à consommer des aliments gras. Les mécanismes impliqués dans l'internalisation du CD36 ne sont pas encore élucidés au niveau des papilles gustatives contrairement aux cellules absorbante intestinales (Tran et al., 2011). Lorsque la teneur en AGL devient suffisante au niveau des papilles gustatives, le GPR120 serait activé entraînant la sécrétion de GLP-1 par les bourgeons du goût (figure 56-5 et 6). Il est possible que cette sécrétion de GLP-1 puisse jouer un rôle dans l'internalisation du CD36 (figure 56-7). En effet, la chute lipide-dépendante du CD36 n'est plus observée au niveau des papilles gustatives chez les souris GLP-1R^{-/-} (Martin et al., 2012). Pour vérifier cette hypothèse, il serait intéressant de réaliser des expériences de reprise alimentaire après un jeûne, puis d'étudier la cinétique d'expression du CD36 dans la papille caliciforme de souris GPR120^{-/-}. Quoi qu'il

en soit, le GLP-1 sécrété va pouvoir agir sur son récepteur situé sur les fibres nerveuses afférentes (Shin et al., 2008) pour moduler la sensibilité aux goûts gras et sucré notamment (figure 56-8).

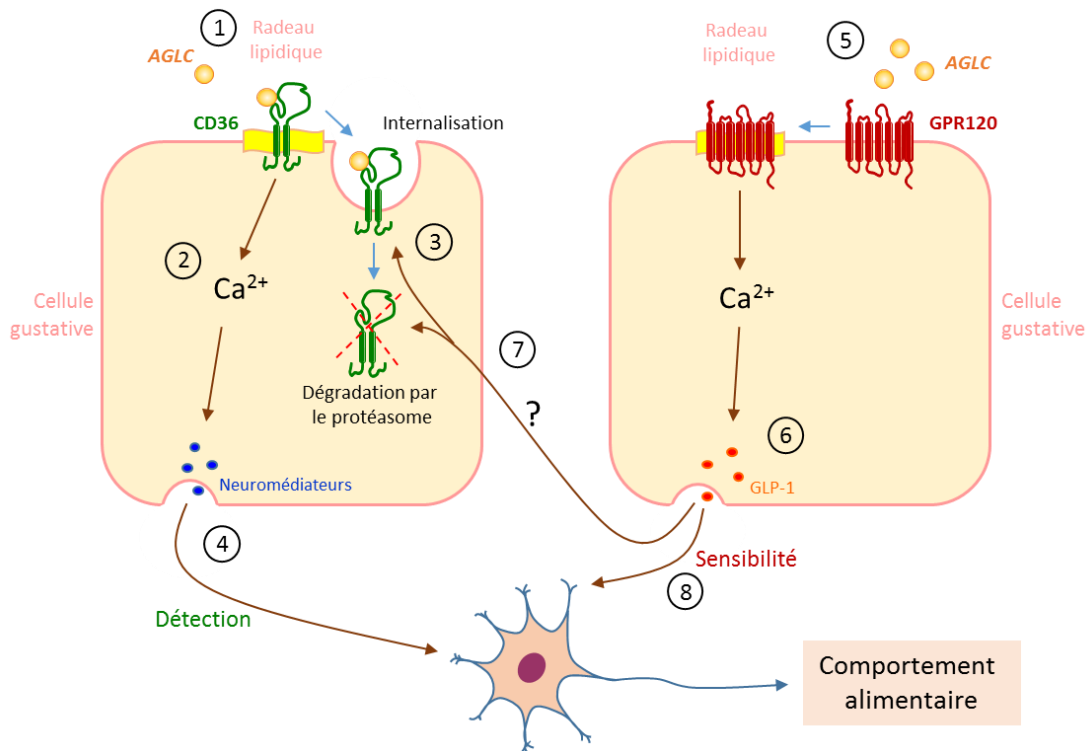


Figure 56 : Hypothèses concernant les rôles respectifs de CD36 et GPR120 dans la détection des lipides.

Remarque : les 2 récepteurs sont représentés sur des cellules différentes mais ils peuvent être localisés sur la même cellule.

Certaines des étapes de ce scénario restent encore spéculatives. Il est important de rappeler que les modèles de souris utilisés sont des KO totaux. Même si certaines expériences réalisées visent à limiter les influences post-ingestives, elles ne doivent pas pour autant être négligées dans l'interprétation finale des résultats. L'utilisation de KO spécifiques dans les papilles gustatives pourrait permettre d'éliminer ce biais. Malheureusement, à notre connaissance il n'existe actuellement pas de tel modèle, faute d'avoir identifié un gène spécifique des papilles gustatives permettant un ciblage tissulaire adéquat (souris CRE). Par ailleurs, l'absence simultanée de CD36 et de GPR120 grâce à un modèle de double-KO pourrait permettre de confirmer le rôle secondaire du GPR120. Ce modèle semble cependant difficilement viable : le CD36 et le GPR120 sont en effet des protéines multifonctionnelles exprimées dans de nombreux tissus. Le CD36 joue notamment un rôle dans les fonctions d'immunité, d'homéostasie énergétique, d'angiogenèse et de comportement (Martin et al., 2011a; Silverstein and Febbraio, 2009). Le GPR120 quant à lui joue également un rôle important, notamment dans l'homéostasie énergétique, la sensibilité à l'insuline, l'adipogenèse et l'effet anti-inflammatoire des AGPI ω 3 (Cornall et al., 2014; Halder et al., 2013; Ichimura et al., 2014; Mo et al., 2013). En outre, les souris CD36 KO se reproduisent difficilement, on comprend donc aisément qu'un double KO serait complexe à obtenir.

Quant aux méthodes *in vitro*, la plus utilisée actuellement est la culture d'explants de cellules de bourgeons du goût (humaines ou de rongeurs) (article n°1 et (Ozdener et al., 2014)). La génération de lignées cellulaires spécialisées, stables et à la fois prolifératives est problématique car les bourgeons du goût sont constitués de cellules très différenciées avec des fonctions spécifiques, et une durée de vie limitée (Hochheimer et al., 2014). De plus, les bourgeons du goût sont constitués de différents types cellulaires (type I, II, III) jouant des rôles complémentaires dans la génération et le transfert des saveurs vers le système nerveux central. Plusieurs tentatives ont eu lieu à partir de papilles fongiformes de souris *p53*^{-/-} (Sako et al., 2011) ou humaines (Ozdener et al., 2011), mais, à notre connaissance, aucune n'est utilisée actuellement en routine. Une lignée récemment mise au point semble cependant intéressante. Il s'agit de la lignée stable HTC-8, obtenue à partir de cellules de papilles fongiformes humaines isolées et immortalisées (Hochheimer et al., 2014). Elles expriment entre autres de nombreux récepteurs à l'amer, le récepteur à l'oxytocine (OXTR), le *transient receptor potential A1* (TRPA1) répondant à l'isoallyl isothiocyanate, molécule qui confère le « piquant » à la moutarde par exemple, et le CD36. Ces cellules, qui semblent constituer une sous-population de cellules de type II, sont capables de répondre aux molécules sapides amères et aux AG par une signalisation calcique, mais sont incapables de répondre aux autres saveurs primaires. Ceci confirme que l'expression des récepteurs aux saveurs primaires est confinée à des populations de cellules distinctes (Chandrashekar et al., 2006). Egalement, en plus de répondre à une saveur primaire (l'amer), ces cellules sont équipées pour recevoir des stimuli additionnel gustatifs (lipides), somatosensoriels et hormonaux. Ainsi, la détection des lipides pourrait s'effectuer dans la sous-population de cellules de type II réceptives à l'amer. Cette lignée cellulaire pourrait s'avérer utile pour une meilleure compréhension des mécanismes de signalisation des cellules gustatives, en dépit des limitations citées précédemment, notamment l'absence de coopération avec d'autres cellules gustatives (type I et III).

Par ailleurs, une équipe américaine (Chen et al., 2013) a récemment utilisé la technologie des siRNA afin de diminuer l'expression du CD36 dans les papilles caliciformes de rats. Les siRNA ont été appliqués directement sur la langue au niveau de la papille pendant 5 jours consécutifs, et ont induit une diminution significative de l'expression de CD36, au niveau des ARN (-65%) ainsi que des protéines (-35%), au 5^{ème} jour de dépôt. Il est à noter que les niveaux d'expression de CD36 dans les entérocytes du duodénum sont restés inchangés chez ces animaux. L'application de siRNA dirigés contre CD36 sur la langue des rats a entraîné une diminution de la préférence pour des solutions de LA lors de tests de double-choix sur 48h. Ce résultat coïncide avec le fait que les souris CD36 hétérozygotes, dont l'expression du CD36 est réduite de moitié, montrent également une perte de préférence pour le LA (Martin et al., 2011b).

En nous appuyant sur ces travaux, nous avons voulu effectuer une invalidation partielle et locale du CD36 au niveau de la langue chez des souris *GPR120*^{-/-}. Notre hypothèse était que l'invalidation du

CD36 au niveau des papilles gustatives, même de l'ordre de 50%, serait suffisante pour entraîner une diminution de la préférence pour les lipides (Martin et al., 2011b), que ce soit chez les souris GPR120^{+/+} ou GPR120^{-/-}, confirmant ainsi que le CD36 est indispensable à la détection orosensorielle des lipides contrairement au GPR120 (article n°1).

Le mélange commercial de siRNA utilisé (Thermo Scientific Accell siRNA, dirigés contre le CD36, le siRNA contrôle étant constitué de séquences inactives) ne nécessite pas de réactif de transfection ou d'électroporation. Ainsi, il devait permettre une utilisation *in vivo*, simplement en effectuant un dépôt sur la muqueuse linguale. Des tests préliminaires *in vitro* et *in vivo* ont été réalisés. Tout d'abord, sur des cellules RAW 264.7 (monocytes) en culture traitées pendant 72h (siRNA dirigés contre CD36 1µM vs. siRNA contrôles, selon les recommandations du fabricant), une diminution significative des ARNm de CD36 (de l'ordre de 50%) chez les cellules traitées par rapport aux contrôles a effectivement été observée, ce qui était cohérent avec les résultats *in vivo* de l'étude évoquée précédemment (Chen et al., 2013). Ce résultat montre l'efficacité du mélange commercial de siRNA sans réactif de transfection. Des tests préliminaires ont donc été réalisés sur des souris WT (dépôt de 10µL de solution 1µM de siRNA dirigés contre CD36 ou de siRNA contrôles sur la surface de la langue). Différents tests de double-choix (huile de colza ou LA, en conditions « à jeun » ou « nourri ») ont été effectués. Aucune diminution de la préférence n'a cependant pu être observée, que ce soit pour l'huile de colza ou pour le LA, en conditions « à jeun » ou « nourri ». L'expression de CD36 (protéines et ARNm) dans les papilles caliciformes et fongiformes des souris WT traitées aux siRNA contrôles ou aux siRNA dirigés contre CD36 a donc été vérifiée : après 5 jours de traitement, aucune différence d'expression n'a pu être observée entre les deux groupes.

Ainsi, les siRNA utilisés sont efficaces pour diminuer l'expression de CD36 sur les cellules en culture, mais se sont avérés inefficaces *in vivo* dans nos conditions. Le mode opératoire étant le même que celui déjà publié (Chen et al., 2013), même si les espèces utilisées sont différentes (rats vs. souris), il est possible que le mélange commercial utilisé ne permette finalement pas aux siRNA de passer la barrière épithéliale linguale.

Le CD36, un acteur clé de la détection orosensorielle des lipides

L'ensemble de nos résultats suggère donc que le CD36 présent dans les papilles gustatives joue un rôle prépondérant dans la détection gustative et la préférence pour les lipides alimentaire (Gaillard et al., 2008; Laugerette et al., 2005) contrairement au GPR120 (Ancel et al., 2015). Or, le comportement alimentaire n'intègre pas uniquement les informations orales mais est aussi influencé par les signaux post-ingestifs. De manière intéressante, le CD36 et le GPR120 sont tous deux exprimés dans l'intestin (Hirasawa et al., 2005; Poirier et al., 1996).

L'équipe d'Anthony Sclafani aux Etats-Unis s'est posée la question du rôle de ces deux récepteurs dans le conditionnement post-oral aux lipides. Pour l'étudier, ils ont entraîné des souris à boire deux solutions non-caloriques et aromatisées différemment, l'une couplée à des infusions intra-gastriques d'Intralipide (CS+) et l'autre couplée à des infusions d'eau (CS-). Ils ont ensuite proposé ces deux solutions aux souris lors d'un test de double-choix. Les souris CD36^{-/-} se comportent comme les souris sauvages, c'est-à-dire qu'elles consomment la solution CS+ en plus grande quantité, indiquant que le CD36 n'est pas indispensable au conditionnement post-oral aux lipides (Sclafani et al., 2007a). En revanche, il a été montré que le GPR120, associé au GPR40, joue un rôle critique dans ce conditionnement (Sclafani et al., 2013), ce qui a été confirmé par une étude plus récente (Sclafani et al., 2015) montrant que l'auto-infusion intra-gastrique de lipides est altérée chez les double-KO GPR120/GPR40.

Mais quel est alors le rôle du CD36 intestinal ? Tout d'abord considéré comme un transporteur des AG dans les entérocytes, des travaux du Laboratoire tendent à montrer qu'il agirait plus comme un « senseur » du contenu en lipides de l'intestin (Buttet et al., 2014), qui permettrait une adaptation métabolique au contenu en lipides du régime (Sundaresan et al., 2013; Tran et al., 2011). Cette fonction de senseur d'AGLC du CD36 dans l'intestin semble donc être dans la continuité de son rôle au niveau oral. A l'interface de cet axe langue-intestin, se trouve le système nerveux central, dans lequel CD36 est également exprimé au niveau hypothalamique (Le Foll et al., 2009).

L'hypothalamus est le centre intégrateur de signaux nerveux, nutritifs et hormonaux, qui contrôlent l'homéostasie énergétique globale et la prise alimentaire (Hussain and Bloom, 2013). Le glucose est le substrat énergétique principal du métabolisme neuronal, mais certains neurones l'utilisent comme molécule de signalisation pour réguler leur activité (Levin et al., 2004). De même, les AGLC sont capables de réguler l'activité de neurones dans certaines zones de l'hypothalamus, ce qui peut impacter la prise alimentaire (Obici et al., 2002). Il a été montré que le CD36 est exprimé notamment au niveau des neurones du VMH (Le Foll et al., 2009). L'activation ou l'inhibition des neurones par les AGLC semble se faire par au moins deux mécanismes distincts : le métabolisme intracellulaire des AG, et dans la majorité des cas l'utilisation d'un récepteur membranaire, en l'occurrence le CD36, pour induire une signalisation cellulaire. En effet, l'utilisation du SSO (sulfo-N-succinimidyl oleate ester), qui bloque le site de liaison des AGLC au niveau du CD36, ou de shRNA (*small hairpin* RNA) dirigés contre CD36 diminue de manière considérable les effets de l'OLA sur les neurones du VMH *in vitro* et *in vivo* chez le rat (Le Foll et al., 2013; Le Foll et al., 2009). D'un point de vue physiologique, la déplétion du CD36 dans le VMH altère la distribution de l'adiposité et l'homéostasie du glucose chez les rats sevrés (Le Foll et al., 2013). De plus, toujours chez le rat, des infusions d'Intralipide hépariné (l'héparine stimule l'activité de la lipoprotéine lipase) dans l'artère carotide, qui irrigue notamment l'hypothalamus, diminuent la prise alimentaire à travers des mécanismes impliquant à la fois le CD36 et l'acyl-coenzyme A synthase (Mouille et al., 2013).

Les mécanismes mettant en jeu le CD36 ne sont pas encore totalement élucidés, mais des auteurs suggèrent qu'ils se rapprocheraient de ceux qui ont lieu dans les papilles gustatives (Mouille et al., 2014), puisque l'activation des neurones par l'OLA implique une augmentation de $[Ca^{2+}]_i$ et une dépolarisation membranaire (Le Foll et al., 2009). Pour étayer cette fonction de senseur lipidique, des travaux entrepris au laboratoire (Martin, 2011) visaient à étudier la régulation du CD36 dans l'hypothalamus par la prise alimentaire de lipides. Cependant, contrairement au peptide orexigène NPY, les niveaux d'ARNm ou de protéine CD36 n'ont pas été modifiés par la prise alimentaire, quel que soit le contenu en lipides de la nourriture. Il est à noter que ces travaux ont été réalisés sur l'hypothalamus total et non sur le VMH, ce qui peut masquer la régulation du CD36 si elle a lieu uniquement dans le VMH. CD36 apparaît malgré tout comme un acteur majeur du *sensing* hypothalamique des AG, impliqué dans le contrôle de la prise alimentaire.

L'axe langue-cerveau-intestin semble donc constituer un « continuum fonctionnel » dont CD36 serait le « chef d'orchestre ». Sa fonction de senseur lipidique permettrait en effet d'adapter les choix alimentaires en fonction des besoins énergétiques de l'organisme et du devenir métabolique des lipides alimentaires.

Approche globale du lien entre l'altération de la détection orale des lipides et l'obésité

Le dysfonctionnement du système de détection orale des lipides alimentaires constaté chez la souris rendue obèse par un régime gras (article n°2) semble être à l'origine d'un cercle vicieux favorisant une surconsommation d'aliments gras et donc renforçant l'obésité (figure 57). Le décryptage des mécanismes responsables de ce dysfonctionnement apparaît donc primordial.

Notre expérience de restriction calorique chez des animaux initialement obèses indique que cette perturbation du système de détection orosensorielle des lipides n'est pas irréversible. En effet, une réduction de masse grasse permet de corriger la perte de sensibilité du système de détection des lipides au niveau oral. Un résultat similaire est obtenu suite à la perte de poids induite par une chirurgie bariatrique chez le rat (Shin et al., 2011b). Cette réversibilité pourrait aussi être la conséquence de changements au niveau du microbiote intestinal. En effet, il est connu qu'un régime riche en lipides saturés induit une dysbiose intestinale, laquelle est corrigée suite à un bypass gastrique chez la souris (Liou et al., 2013). Deux pistes, non mutuellement exclusives, en relation à la fois avec la masse grasse et le microbiote intestinal sont actuellement privilégiées pour expliquer l'origine de l'altération de la détection gustative des lipides au cours de l'obésité : les perturbations hormonales et l'inflammation.

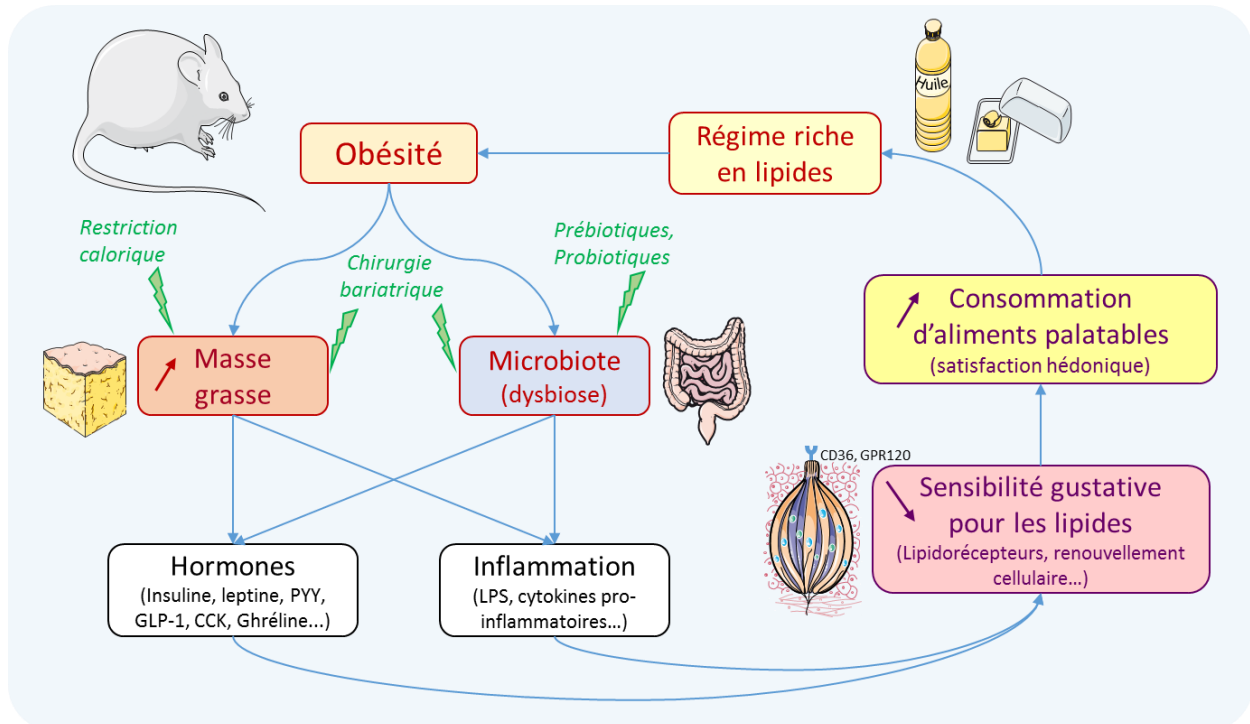


Figure 57 : Représentation schématique des mécanismes impliqués dans la diminution de la sensibilité gustative pour les lipides au cours de l'obésité.

CCK : cholécystokinine ; GLP-1 : *glucagon-like peptide 1* ; LPS : lipopolysaccharide ; PYY : peptide YY.

Il est connu que certaines cellules et/ou afférences nerveuses gustatives expriment à leur surface des récepteurs hormonaux. C'est le cas par exemple du récepteur au GLP-1. Le laboratoire a montré que l'absence du GLP-1R chez la souris se traduit par une augmentation du seuil de détection des lipides (correspondant à une diminution de la sensibilité) par rapport à des animaux témoins lors de tests de *licking* (Martin et al., 2012). Ce résultat suggère que le GLP-1 participe à la régulation de la sensibilité de la détection orosensorielle des lipides chez la souris. Or, une réduction de la sécrétion post-prandiale du GLP-1 est observée au cours de l'obésité (Ranganath et al., 1996). On peut donc penser que certaines perturbations endocrines associées à l'obésité pourraient directement affecter la détection orale des lipides. Des études complémentaires sont requises pour explorer l'impact d'autres hormones (insuline, PYY...).

Les bourgeons du goût sont des entités dynamiques dont l'efficacité dépend non seulement de leur environnement hormonal, mais aussi de la vitesse de leur renouvellement cellulaire (Feng et al., 2014b). Or, il a été rapporté que l'injection systémique de LPS chez la souris provoque une chute de la prolifération des cellules progénitrices et une altération du renouvellement cellulaire (Cohn et al., 2010). Il est donc possible que l'environnement inflammatoire caractérisant l'obésité puisse aussi affecter directement la performance de la détection orale des lipides.

Bien que nous ayons trouvé une corrélation positive entre les taux plasmatiques de LPS et le seuil de détection des lipides, cette endotoxine ne semble pas expliquer à elle seule le changement de

comportement observé chez la souris rendue obèse par un régime. En effet, l'induction d'une endotoxémie bas-bruit LPS-dépendante mimant celle trouvée chez l'animal obèse ne modifie pas la préférence pour les lipides chez la souris mince (article n°3). Cependant, l'analyse transcriptomique des papilles caliciformes révèle l'existence de marqueurs d'inflammation. Ceux-ci suggèrent un remodelage cellulaire au niveau de la papille caliciforme due à l'arrivée de cellules immunitaires chez la souris obèse. L'obésité s'accompagne donc bien d'une inflammation du système gustatif périphérique, tout comme elle s'accompagne également d'altérations de la voie gustative centrale. Ce constat soulève de nombreuses questions. Quelle est la conséquence fonctionnelle de cette inflammation locale ? Quels sont les mécanismes mis en jeu ? Est-ce que d'autres saveurs sont affectées ? Quel est le rôle du microbiote intestinal ? Des travaux sont en cours pour tenter de répondre à ces questions. C'est le cas, par exemple, de l'étude préliminaire réalisée avec un prébiotique, pour tenter de modifier la composition du microbiote intestinal, présentée dans cette thèse.

En bref, il est probable que la perturbation de la détection orosensorielle des lipides observée au cours de l'obésité soit un phénomène complexe, résultant d'un ensemble de changements physiopathologiques associant : dysbiose intestinale, inflammation bas-bruit, et modifications endocrines.

Conclusion

L'obésité est un problème majeur de santé publique. Comme les personnes obèses ont tendance à préférer et à surconsommer les aliments hautement palatables (généralement riches en lipides et en sucres), il est important de s'intéresser aux mécanismes à l'origine des changements du comportement alimentaire. On sait que les apports énergétiques et nutritionnels doivent être adaptés aux besoins de l'organisme. Le système gustatif joue un rôle non négligeable dans cette homéostasie en contribuant à la hiérarchisation des potentialités hédoniques des aliments et donc en motivant les choix alimentaires. Pourtant, les liens possibles entre l'obésité, le goût et le comportement alimentaire sont peu étudiés. Ceci est d'autant plus paradoxal que les travaux récents suggèrent l'existence d'une sixième modalité gustative dédiée à la perception des lipides alimentaires. Au cours de cette thèse, nous avons montré que la détection périphérique (orosensorielle) des lipides était défaillante chez la souris obèse, favorisant un comportement obésogène. Les mécanismes à l'origine de cette dysfonction gustative sont complexes. Nous avons montré précédemment que certaines perturbations endocrines associées à l'obésité, comme la chute du GLP-1 plasmatique, sont susceptibles d'affecter la détection des lipides par les bourgeons du goût (Martin et al., 2012). Les travaux de cette thèse démontrent que l'obésité s'accompagne également d'une inflammation des papilles gustatives, bien que l'endotoxémie bas-bruit dépendante du LPS soit insuffisante pour expliquer à elle seule les changements comportementaux. Les premiers résultats de manipulation du microbiote réalisée au moyen de prébiotiques indiquent que les changements du profil microbien induits par un régime gras saturé pourraient affecter la fonction gustative et le comportement alimentaire. Il ressort de ces travaux que la mise en place des perturbations du système gustatif liées à l'obésité intègrent probablement l'ensemble des facteurs évoqués et peut-être d'autres qui sont encore inconnus. De nombreuses questions restent encore sans réponse, mais l'intérêt croissant pour cet axe de recherche laisse espérer le développement d'approches nutritionnelles et/ou pharmacologiques, visant à moduler les fonctions de détection gustative périphérique des lipides dans un but préventif ou thérapeutique.

Perspectives

Le fonctionnement du système de détection gustative des lipides commence à être bien connu. Le lien existant entre l'efficacité de ce système et l'obésité a été établi. Dans le cadre de cette thèse, plusieurs aspects ont été abordés, mais de nombreuses questions restent en suspens.

- Quel est le rôle exact du GPR120 dans les papilles gustatives ?

GPR120 n'est pas indispensable à la détection gustative des lipides. Nos données suggèrent qu'il joue un rôle dans la modulation de la sensibilité au goût du gras, par l'intermédiaire de la sécrétion de GLP-1 (Martin et al., 2012). Cependant, ces données ont été obtenues de manière indirecte, par l'intermédiaire de cultures d'explant de papilles gustatives de souris WT stimulées avec des agonistes de GPR120. Le laboratoire ayant acquis une lignée GPR120^{-/-}, il apparaît intéressant de reproduire ces expériences avec ces souris afin de confirmer que la sécrétion de GLP-1 s'effectue bien par l'intermédiaire de GPR120. D'autre part, il a été montré que la stimulation orale par du glucose entraîne une élévation du GLP-1 plasmatique (Kokrashvili et al., 2014) ; on peut donc se demander si le même phénomène a lieu avec une stimulation par des lipides par l'intermédiaire du GPR120. Enfin, la mise au point des gustomètres pourrait permettre d'observer des effets potentiels de l'absence du GPR120, sur la modulation de la détection des saveurs, de manière plus précise que par les autres tests de comportement disponibles actuellement.

- La durée de vie et le renouvellement cellulaires des bourgeons du goût sont-ils perturbés chez la souris obèse ?

Connaissant l'impact de l'inflammation sur la durée de vie et le renouvellement des cellules gustatives (Cohn et al., 2010), on peut se demander quel est l'effet de l'inflammation bas-bruit observée au cours de l'obésité. Nos données préliminaires font état d'une augmentation du marqueur de prolifération cellulaire Ki67 dans les papilles gustatives des souris obèses, il serait donc intéressant de poursuivre les investigations dans ce domaine, qui pourrait donner un début d'explication à l'altération de la détection gustative qui accompagne l'obésité.

- Quel est le rôle du microbiote intestinal dans la détection orosensorielle des lipides ?

Si les effets des prébiotiques sont avérés, des analyses de la composition du microbiote pourront permettre d'établir des liens entre certaines bactéries spécifiques et la détection des lipides. Pour aller plus loin, un transfert de microbiote peut être envisagé. Ce type d'expérience s'effectue habituellement sur des souris-receveuses axéniques. Notre laboratoire n'étant pas équipé pour héberger ce modèle de souris, nous pourrions considérer la possibilité d'éliminer le microbiote des souris receveuses par un cocktail d'antibiotiques (Bruce-Keller et al., 2015). Le microbiote de souris traitées aux prébiotiques pourrait ensuite être transféré par gavage, afin de réaliser des tests comportementaux.

Références bibliographiques

- Abdollahi, M., and Radfar, M. (2003). A review of drug-induced oral reactions. *J Contemp Dent Pract* 4, 10-31.
- Adachi, S., Endo, Y., Mizushige, T., Tsuzuki, S., Matsumura, S., Inoue, K., and Fushiki, T. (2013). Increased levels of extracellular dopamine in the nucleus accumbens and amygdala of rats by ingesting a low concentration of a long-chain Fatty Acid. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* 77, 2175-2180.
- Adler, E., Hoon, M.A., Mueller, K.L., Chandrashekar, J., Ryba, N.J., and Zuker, C.S. (2000). A novel family of mammalian taste receptors. *Cell* 100, 693-702.
- Amar, J., Burcelin, R., Ruidavets, J.B., Cani, P.D., Fauvel, J., Alessi, M.C., Chamontin, B., and Ferrieres, J. (2008). Energy intake is associated with endotoxemia in apparently healthy men. *The American journal of clinical nutrition* 87, 1219-1223.
- Ancel, D., Bernard, A., Subramaniam, S., Hirasawa, A., Tsujimoto, G., Hashimoto, T., Passilly-Degrace, P., Khan, N.A., and Besnard, P. (2015). The oral lipid sensor GPR120 is not indispensable for the orosensory detection of dietary lipids in mice. *Journal of lipid research* 56, 369-378.
- Arnold, M., Pandeya, N., Byrnes, G., Renehan, A.G., Stevens, G.A., Ezzati, M., Ferlay, J., Miranda, J.J., Romieu, I., Dikshit, R., *et al.* (2015). Global burden of cancer attributable to high body-mass index in 2012: a population-based study. *The Lancet Oncology* 16, 36-46.
- Aubert, A., and Dantzer, R. (2005). The taste of sickness: lipopolysaccharide-induced finickiness in rats. *Physiology & behavior* 84, 437-444.
- Bachmanov, A.A., Tordoff, M.G., and Beauchamp, G.K. (2001). Sweetener preference of C57BL/6ByJ and 129P3/J mice. *Chemical senses* 26, 905-913.
- Backhed, F., Ding, H., Wang, T., Hooper, L.V., Koh, G.Y., Nagy, A., Semenkovich, C.F., and Gordon, J.I. (2004). The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 15718-15723.
- Baillie-Hamilton, P.F. (2002). Chemical toxins: a hypothesis to explain the global obesity epidemic. *Journal of alternative and complementary medicine* 8, 185-192.
- Baillie, A.G., Coburn, C.T., and Abumrad, N.A. (1996). Reversible binding of long-chain fatty acids to purified FAT, the adipose CD36 homolog. *The Journal of membrane biology* 153, 75-81.
- Barnett, S.A. (1963). *The Rat: A study in behavior* (Chicago, Illinois: Aldine Publishing Company).
- Bartel, D.L., Sullivan, S.L., Lavoie, E.G., Sevigny, J., and Finger, T.E. (2006). Nucleoside triphosphate diphosphohydrolase-2 is the ecto-ATPase of type I cells in taste buds. *The Journal of comparative neurology* 497, 1-12.
- Bartoshuk, L.M., Duffy, V.B., Hayes, J.E., Moskowitz, H.R., and Snyder, D.J. (2006). Psychophysics of sweet and fat perception in obesity: problems, solutions and new perspectives. *Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological sciences* 361, 1137-1148.
- Benoit, S.C., Clegg, D.J., Seeley, R.J., and Woods, S.C. (2004). Insulin and leptin as adiposity signals. *Recent progress in hormone research* 59, 267-285.
- Benton, R., Vannice, K.S., and Vosshall, L.B. (2007). An essential role for a CD36-related receptor in pheromone detection in *Drosophila*. *Nature* 450, 289-293.
- Berridge, K.C., Robinson, T.E., and Aldridge, J.W. (2009). Dissecting components of reward: 'liking', 'wanting', and learning. *Current opinion in pharmacology* 9, 65-73.
- Berthoud, H.R., Lenard, N.R., and Shin, A.C. (2011). Food reward, hyperphagia, and obesity. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology* 300, R1266-1277.
- Berthoud, H.R., Munzberg, H., Richards, B.K., and Morrison, C.D. (2012). Neural and metabolic regulation of macronutrient intake and selection. *The Proceedings of the Nutrition Society* 71, 390-400.
- Berthoud, H.R., and Zheng, H. (2012). Modulation of taste responsiveness and food preference by obesity and weight loss. *Physiology & behavior* 107, 527-532.
- Besnard, P. (2015). Lipides et obésité : aussi une histoire de goût ? *Cahiers de nutrition et de diététique*.
- Besnard, P., Passilly-Degrace, P., and Khan, N.A. (2016 (in press)). Taste of fat, a sixth taste modality? *Physiological reviews* 96.
- Bjursell, M., Xu, X., Admyre, T., Bottcher, G., Lundin, S., Nilsson, R., Stone, V.M., Morgan, N.G., Lam, Y.Y., Storlien, L.H., *et al.* (2014). The beneficial effects of n-3 polyunsaturated fatty acids on diet induced obesity and impaired glucose control do not require Gpr120. *PLoS one* 9, e114942.
- Bouchard, C., Tremblay, A., Despres, J.P., Nadeau, A., Lupien, P.J., Theriault, G., Dussault, J., Moorjani, S., Pinault, S., and Fournier, G. (1990). The response to long-term overfeeding in identical twins. *The New England journal of medicine* 322, 1477-1482.
- Boutagy, N.E., McMillan, R.P., Frisard, M.I., and Hulver, M.W. (2015). Metabolic endotoxemia with obesity: Is it real and is it relevant? *Biochimie*.

- Bray, G.A., Paeratakul, S., and Popkin, B.M. (2004). Dietary fat and obesity: a review of animal, clinical and epidemiological studies. *Physiology & behavior* 83, 549-555.
- Bray, G.A., and Popkin, B.M. (1998). Dietary fat intake does affect obesity! *The American journal of clinical nutrition* 68, 1157-1173.
- Brennan, I.M., Luscombe-Marsh, N.D., Seimon, R.V., Otto, B., Horowitz, M., Wishart, J.M., and Feinle-Bisset, C. (2012). Effects of fat, protein, and carbohydrate and protein load on appetite, plasma cholecystokinin, peptide YY, and ghrelin, and energy intake in lean and obese men. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology* 303, G129-140.
- Briscoe, C.P., Tadayyon, M., Andrews, J.L., Benson, W.G., Chambers, J.K., Eilert, M.M., Ellis, C., Elshourbagy, N.A., Goetz, A.S., Minnick, D.T., *et al.* (2003). The orphan G protein-coupled receptor GPR40 is activated by medium and long chain fatty acids. *The Journal of biological chemistry* 278, 11303-11311.
- Bruce-Keller, A.J., Salbaum, J.M., Luo, M., Blanchard, E.t., Taylor, C.M., Welsh, D.A., and Berthoud, H.R. (2015). Obese-type Gut Microbiota Induce Neurobehavioral Changes in the Absence of Obesity. *Biological psychiatry* 77, 607-615.
- Buttet, M., Traynard, V., Tran, T.T., Besnard, P., Poirier, H., and Niot, I. (2014). From fatty-acid sensing to chylomicron synthesis: role of intestinal lipid-binding proteins. *Biochimie* 96, 37-47.
- Cabanac, M. (1971). Physiological role of pleasure. *Science* 173, 1103-1107.
- Calvo, S.S., and Egan, J.M. (2015). The endocrinology of taste receptors. *Nature reviews Endocrinology* 11, 213-227.
- Cani, P.D., Amar, J., Iglesias, M.A., Poggi, M., Knauf, C., Bastelica, D., Neyrinck, A.M., Fava, F., Tuohy, K.M., Chabo, C., *et al.* (2007a). Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes* 56, 1761-1772.
- Cani, P.D., Bibiloni, R., Knauf, C., Waget, A., Neyrinck, A.M., Delzenne, N.M., and Burcelin, R. (2008). Changes in gut microbiota control metabolic endotoxemia-induced inflammation in high-fat diet-induced obesity and diabetes in mice. *Diabetes* 57, 1470-1481.
- Cani, P.D., and Everard, A. (2015). Talking microbes: When gut bacteria interact with diet and host organs. *Molecular nutrition & food research*.
- Cani, P.D., Everard, A., and Duparc, T. (2013). Gut microbiota, enteroendocrine functions and metabolism. *Current opinion in pharmacology* 13, 935-940.
- Cani, P.D., Neyrinck, A.M., Fava, F., Knauf, C., Burcelin, R.G., Tuohy, K.M., Gibson, G.R., and Delzenne, N.M. (2007b). Selective increases of bifidobacteria in gut microflora improve high-fat-diet-induced diabetes in mice through a mechanism associated with endotoxaemia. *Diabetologia* 50, 2374-2383.
- Cani, P.D., Possemiers, S., Van de Wiele, T., Guiot, Y., Everard, A., Rottier, O., Geurts, L., Naslain, D., Neyrinck, A., Lambert, D.M., *et al.* (2009). Changes in gut microbiota control inflammation in obese mice through a mechanism involving GLP-2-driven improvement of gut permeability. *Gut* 58, 1091-1103.
- Cansell, C., Castel, J., Denis, R.G., Rouch, C., Delbes, A.S., Martinez, S., Mestivier, D., Finan, B., Maldonado-Aviles, J.G., Rijnsburger, M., *et al.* (2014). Dietary triglycerides act on mesolimbic structures to regulate the rewarding and motivational aspects of feeding. *Molecular psychiatry* 19, 1095-1105.
- Carey, M., Kehlenbrink, S., and Hawkins, M. (2013). Evidence for central regulation of glucose metabolism. *The Journal of biological chemistry* 288, 34981-34988.
- Carnell, S., Gibson, C., Benson, L., Ochner, C.N., and Geliebter, A. (2012). Neuroimaging and obesity: current knowledge and future directions. *Obesity reviews : an official journal of the International Association for the Study of Obesity* 13, 43-56.
- Cartoni, C., Yasumatsu, K., Ohkuri, T., Shigemura, N., Yoshida, R., Godinot, N., le Coutre, J., Ninomiya, Y., and Damak, S. (2010). Taste preference for fatty acids is mediated by GPR40 and GPR120. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 30, 8376-8382.
- Castillo, D., Seidel, K., Salcedo, E., Ahn, C., de Sauvage, F.J., Klein, O.D., and Barlow, L.A. (2014). Induction of ectopic taste buds by SHH reveals the competency and plasticity of adult lingual epithelium. *Development* 141, 2993-3002.
- Chale-Rush, A., Burgess, J.R., and Mattes, R.D. (2007). Evidence for human orosensory (taste?) sensitivity to free fatty acids. *Chemical senses* 32, 423-431.
- Chandrashekar, J., Hoon, M.A., Ryba, N.J., and Zuker, C.S. (2006). The receptors and cells for mammalian taste. *Nature* 444, 288-294.
- Chandrashekar, J., Kuhn, C., Oka, Y., Yarmolinsky, D.A., Hummler, E., Ryba, N.J., and Zuker, C.S. (2010). The cells and peripheral representation of sodium taste in mice. *Nature* 464, 297-301.
- Chang, G.Q., Karatayev, O., Ahsan, R., Gaysinskaya, V., Marwil, Z., and Leibowitz, S.F. (2007). Dietary fat stimulates endogenous enkephalin and dynorphin in the paraventricular nucleus: role of circulating triglycerides. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism* 292, E561-570.
- Chang, R.B., Waters, H., and Liman, E.R. (2010). A proton current drives action potentials in genetically identified sour taste cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, 22320-22325.

- Chaudhari, N., Pereira, E., and Roper, S.D. (2009). Taste receptors for umami: the case for multiple receptors. *The American journal of clinical nutrition* *90*, 738S-742S.
- Chaudhari, N., and Roper, S.D. (2010). The cell biology of taste. *The Journal of cell biology* *190*, 285-296.
- Chen, C.S., Bench, E.M., Allerton, T.D., Schreiber, A.L., Arceneaux, K.P., 3rd, and Primeaux, S.D. (2013). Preference for linoleic acid in obesity-prone and obesity-resistant rats is attenuated by the reduction of CD36 on the tongue. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology* *305*, R1346-1355.
- Chevrot, M. (2013). Impact de l'obésité sur la détection oro-sensorielle des lipides alimentaires chez la souris et chez l'Homme. In *Ecole Doctorale Environnement-Santé n°554* (Dijon: Université de Bourgogne).
- Chevrot, M., Passilly-Degrace, P., Ancel, D., Bernard, A., Enderli, G., Gomes, M., Robin, I., Issanchou, S., Verges, B., Nicklaus, S., *et al.* (2014). Obesity interferes with the orosensory detection of long-chain fatty acids in humans. *The American journal of clinical nutrition* *99*, 975-983.
- Cintra, D.E., Ropelle, E.R., Moraes, J.C., Pauli, J.R., Morari, J., Souza, C.T., Grimaldi, R., Stahl, M., Carvalheira, J.B., Saad, M.J., *et al.* (2012). Unsaturated fatty acids revert diet-induced hypothalamic inflammation in obesity. *PLoS one* *7*, e30571.
- Clamp, A.G., Ladha, S., Clark, D.C., Grimble, R.F., and Lund, E.K. (1997). The influence of dietary lipids on the composition and membrane fluidity of rat hepatocyte plasma membrane. *Lipids* *32*, 179-184.
- Clapp, T.R., Yang, R., Stoick, C.L., Kinnamon, S.C., and Kinnamon, J.C. (2004). Morphologic characterization of rat taste receptor cells that express components of the phospholipase C signaling pathway. *The Journal of comparative neurology* *468*, 311-321.
- Coburn, C.T., Knapp, F.F., Jr., Febbraio, M., Beets, A.L., Silverstein, R.L., and Abumrad, N.A. (2000). Defective uptake and utilization of long chain fatty acids in muscle and adipose tissues of CD36 knockout mice. *The Journal of biological chemistry* *275*, 32523-32529.
- Cohn, Z.J., Kim, A., Huang, L., Brand, J., and Wang, H. (2010). Lipopolysaccharide-induced inflammation attenuates taste progenitor cell proliferation and shortens the life span of taste bud cells. *BMC neuroscience* *11*, 72.
- Cornall, L.M., Mathai, M.L., Hryciw, D.H., and McAinch, A.J. (2011). Diet-induced obesity up-regulates the abundance of GPR43 and GPR120 in a tissue specific manner. *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology* *28*, 949-958.
- Cornall, L.M., Mathai, M.L., Hryciw, D.H., and McAinch, A.J. (2014). GPR120 agonism as a countermeasure against metabolic diseases. *Drug discovery today* *19*, 670-679.
- Cummings, T.A., and Kinnamon, S.C. (1992). Apical K⁺ channels in *Necturus* taste cells. Modulation by intracellular factors and taste stimuli. *The Journal of general physiology* *99*, 591-613.
- Damak, S., Rong, M., Yasumatsu, K., Kokrashvili, Z., Varadarajan, V., Zou, S., Jiang, P., Ninomiya, Y., and Margolskee, R.F. (2003). Detection of sweet and umami taste in the absence of taste receptor T1r3. *Science* *301*, 850-853.
- Darling, R.A., Zhao, H., Kinch, D., Li, A.J., Simasko, S.M., and Ritter, S. (2014). Mercaptoacetate and fatty acids exert direct and antagonistic effects on nodose neurons via GPR40 fatty acid receptors. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology* *307*, R35-43.
- De Araujo, I.E., and Rolls, E.T. (2004). Representation in the human brain of food texture and oral fat. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* *24*, 3086-3093.
- DeFazio, R.A., Dvoryanchikov, G., Maruyama, Y., Kim, J.W., Pereira, E., Roper, S.D., and Chaudhari, N. (2006). Separate populations of receptor cells and presynaptic cells in mouse taste buds. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* *26*, 3971-3980.
- Ding, S., and Lund, P.K. (2011). Role of intestinal inflammation as an early event in obesity and insulin resistance. *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care* *14*, 328-333.
- DiPatrizio, N.V., and Piomelli, D. (2015). Intestinal lipid-derived signals that sense dietary fat. *The Journal of clinical investigation* *125*, 891-898.
- Donaldson, L.F., Bennett, L., Baic, S., and Melichar, J.K. (2009). Taste and weight: is there a link? *The American journal of clinical nutrition* *90*, 800S-803S.
- Dragoin, W., Hughes, G., Devine, M., and Bentley, J. (1973). Long-term retention of conditioned taste aversions: effects of gustatory interference. *Psychological reports* *33*, 511-514.
- Dramane, G., Abdoul-Azize, S., Hichami, A., Vogtle, T., Akpona, S., Chouabe, C., Sadou, H., Nieswandt, B., Besnard, P., and Khan, N.A. (2012). STIM1 regulates calcium signaling in taste bud cells and preference for fat in mice. *The Journal of clinical investigation* *122*, 2267-2282.
- Drewnowski, A., Brunzell, J.D., Sande, K., Iverius, P.H., and Greenwood, M.R. (1985). Sweet tooth reconsidered: taste responsiveness in human obesity. *Physiology & behavior* *35*, 617-622.
- Drewnowski, A., and Greenwood, M.R. (1983). Cream and sugar: human preferences for high-fat foods. *Physiology & behavior* *30*, 629-633.

- Duca, F.A., Swartz, T.D., Sakar, Y., and Covasa, M. (2012). Increased oral detection, but decreased intestinal signaling for fats in mice lacking gut microbiota. *PLoS one* 7, e39748.
- Duca, F.A., Swartz, T.D., Sakar, Y., and Covasa, M. (2013). Decreased intestinal nutrient response in diet-induced obese rats: role of gut peptides and nutrient receptors. *International journal of obesity* 37, 375-381.
- Duca, F.A., and Yue, J.T. (2014). Fatty acid sensing in the gut and the hypothalamus: in vivo and in vitro perspectives. *Molecular and cellular endocrinology* 397, 23-33.
- Dvoryanchikov, G., Sinclair, M.S., Perea-Martinez, I., Wang, T., and Chaudhari, N. (2009). Inward rectifier channel, ROMK, is localized to the apical tips of glial-like cells in mouse taste buds. *The Journal of comparative neurology* 517, 1-14.
- Edfalk, S., Steneberg, P., and Edlund, H. (2008). Gpr40 is expressed in enteroendocrine cells and mediates free fatty acid stimulation of incretin secretion. *Diabetes* 57, 2280-2287.
- Ehehalt, R., Fullekrug, J., Pohl, J., Ring, A., Herrmann, T., and Stremmel, W. (2006). Translocation of long chain fatty acids across the plasma membrane—lipid rafts and fatty acid transport proteins. *Molecular and cellular biochemistry* 284, 135-140.
- El-Yassimi, A., Hichami, A., Besnard, P., and Khan, N.A. (2008). Linoleic acid induces calcium signaling, Src kinase phosphorylation, and neurotransmitter release in mouse CD36-positive gustatory cells. *The Journal of biological chemistry* 283, 12949-12959.
- Elizalde, G., and Sclafani, A. (1990). Fat appetite in rats: flavor preferences conditioned by nutritive and non-nutritive oil emulsions. *Appetite* 15, 189-197.
- Emery, C., Dinet, J., Lafau, A., Sermet, C., Khoshnood, B., and Fagnani, F. (2007). [Cost of obesity in France]. *Presse medicale* 36, 832-840.
- Erlanson-Albertsson, C. (2005). How palatable food disrupts appetite regulation. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 97, 61-73.
- Everard, A., and Cani, P.D. (2013). Diabetes, obesity and gut microbiota. *Best practice & research Clinical gastroenterology* 27, 73-83.
- Everard, A., Lazarevic, V., Derrien, M., Girard, M., Muccioli, G.G., Neyrinck, A.M., Possemiers, S., Van Holle, A., Francois, P., de Vos, W.M., *et al.* (2011). Responses of gut microbiota and glucose and lipid metabolism to prebiotics in genetic obese and diet-induced leptin-resistant mice. *Diabetes* 60, 2775-2786.
- Feng, P., Chai, J., Zhou, M., Simon, N., Huang, L., and Wang, H. (2014a). Interleukin-10 is produced by a specific subset of taste receptor cells and critical for maintaining structural integrity of mouse taste buds. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 34, 2689-2701.
- Feng, P., Huang, L., and Wang, H. (2014b). Taste bud homeostasis in health, disease, and aging. *Chemical senses* 39, 3-16.
- Feng, P., Jyotaki, M., Kim, A., Chai, J., Simon, N., Zhou, M., Bachmanov, A.A., Huang, L., and Wang, H. (2015). Regulation of bitter taste responses by tumor necrosis factor. *Brain, behavior, and immunity* 49, 32-42.
- Feng, P., Zhao, H., Chai, J., Huang, L., and Wang, H. (2012). Expression and secretion of TNF-alpha in mouse taste buds: a novel function of a specific subset of type II taste cells. *PLoS one* 7, e43140.
- Finger, T.E., Danilova, V., Barrows, J., Bartel, D.L., Vigers, A.J., Stone, L., Hellekant, G., and Kinnamon, S.C. (2005). ATP signaling is crucial for communication from taste buds to gustatory nerves. *Science* 310, 1495-1499.
- Frayling, T.M., Timpson, N.J., Weedon, M.N., Zeggini, E., Freathy, R.M., Lindgren, C.M., Perry, J.R., Elliott, K.S., Lango, H., Rayner, N.W., *et al.* (2007). A common variant in the FTO gene is associated with body mass index and predisposes to childhood and adult obesity. *Science* 316, 889-894.
- Fredriksson, R., Hoglund, P.J., Gloriam, D.E., Lagerstrom, M.C., and Schiöth, H.B. (2003). Seven evolutionarily conserved human rhodopsin G protein-coupled receptors lacking close relatives. *FEBS letters* 554, 381-388.
- Freitas Kde, C., Amancio, O.M., and de Moraes, M.B. (2012). High-performance inulin and oligofructose prebiotics increase the intestinal absorption of iron in rats with iron deficiency anaemia during the growth phase. *The British journal of nutrition* 108, 1008-1016.
- Friedman, J.M., and Halaas, J.L. (1998). Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature* 395, 763-770.
- Fukuwatari, T., Kawada, T., Tsuruta, M., Hiraoka, T., Iwanaga, T., Sugimoto, E., and Fushiki, T. (1997). Expression of the putative membrane fatty acid transporter (FAT) in taste buds of the circumvallate papillae in rats. *FEBS letters* 414, 461-464.
- Fukuwatari, T., Shibata, K., Iguchi, K., Saeki, T., Iwata, A., Tani, K., Sugimoto, E., and Fushiki, T. (2003). Role of gustation in the recognition of oleate and triolein in anosmic rats. *Physiology & behavior* 78, 579-583.
- Gaillard, D., Laugerette, F., Darcel, N., El-Yassimi, A., Passilly-Degrace, P., Hichami, A., Khan, N.A., Montmayeur, J.P., and Besnard, P. (2008). The gustatory pathway is involved in CD36-mediated orosensory perception of long-chain fatty acids in the mouse. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 22, 1458-1468.

- Gaillard, D., Xu, M., Liu, F., Millar, S.E., and Barlow, L.A. (2015). beta-Catenin Signaling Biases Multipotent Lingual Epithelial Progenitors to Differentiate and Acquire Specific Taste Cell Fates. *PLoS genetics* *11*, e1005208.
- Galindo, M.M., Schneider, N.Y., Stahler, F., Tole, J., and Meyerhof, W. (2012a). Taste preferences. *Progress in molecular biology and translational science* *108*, 383-426.
- Galindo, M.M., Voigt, N., Stein, J., van Lengerich, J., Raguse, J.D., Hofmann, T., Meyerhof, W., and Behrens, M. (2012b). G protein-coupled receptors in human fat taste perception. *Chemical senses* *37*, 123-139.
- Garcia, J., Hankins, W.G., and Rusiniak, K.W. (1974). Behavioral regulation of the milieu interne in man and rat. *Science* *185*, 824-831.
- Gilbertson, T.A., Fontenot, D.T., Liu, L., Zhang, H., and Monroe, W.T. (1997). Fatty acid modulation of K⁺ channels in taste receptor cells: gustatory cues for dietary fat. *The American journal of physiology* *272*, C1203-1210.
- Gilbertson, T.A., and Khan, N.A. (2014). Cell signaling mechanisms of oro-gustatory detection of dietary fat: advances and challenges. *Progress in lipid research* *53*, 82-92.
- Gilbertson, T.A., Liu, L., Kim, I., Burks, C.A., and Hansen, D.R. (2005). Fatty acid responses in taste cells from obesity-prone and -resistant rats. *Physiology & behavior* *86*, 681-690.
- Gilbertson, T.A., Yu, T., and Shah, B.P. (2010). Gustatory Mechanisms for Fat Detection. In *Fat Detection: Taste, Texture, and Post Ingestive Effects*, J.P. Montmayeur, and J. le Coutre, eds. (Boca Raton (FL)).
- Glendinning, J.I., Gresack, J., and Spector, A.C. (2002). A high-throughput screening procedure for identifying mice with aberrant taste and oromotor function. *Chemical senses* *27*, 461-474.
- Godinot, N., Yasumatsu, K., Barcos, M.E., Pineau, N., Ledda, M., Viton, F., Ninomiya, Y., le Coutre, J., and Damak, S. (2013). Activation of tongue-expressed GPR40 and GPR120 by non caloric agonists is not sufficient to drive preference in mice. *Neuroscience* *250*, 20-30.
- Gong, Z., Yoshimura, M., Aizawa, S., Kurotani, R., Zigman, J.M., Sakai, T., and Sakata, I. (2014). G protein-coupled receptor 120 signaling regulates ghrelin secretion in vivo and in vitro. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism* *306*, E28-35.
- Gotoh, C., Hong, Y.H., Iga, T., Hishikawa, D., Suzuki, Y., Song, S.H., Choi, K.C., Adachi, T., Hirasawa, A., Tsujimoto, G., *et al.* (2007). The regulation of adipogenesis through GPR120. *Biochemical and biophysical research communications* *354*, 591-597.
- Greenberg, D., and Smith, G.P. (1996). The controls of fat intake. *Psychosomatic medicine* *58*, 559-569.
- Gregor, M.F., and Hotamisligil, G.S. (2011). Inflammatory mechanisms in obesity. *Annual review of immunology* *29*, 415-445.
- Grun, F., and Blumberg, B. (2009). Endocrine disruptors as obesogens. *Molecular and cellular endocrinology* *304*, 19-29.
- Guesnet, P.A.J.-M.A., P.; Pifferi, F.; Lavielle, M. (2005). Les rôles physiologiques majeurs exercés par les acides gras polyinsaturés (AGPI). *Oléagineux Corps Gras Lipides* *12*.
- Halder, S., Kumar, S., and Sharma, R. (2013). The therapeutic potential of GPR120: a patent review. *Expert opinion on therapeutic patents* *23*, 1581-1590.
- Hamamichi, R., Asano-Miyoshi, M., and Emori, Y. (2006). Taste bud contains both short-lived and long-lived cell populations. *Neuroscience* *141*, 2129-2138.
- Hansen, H.S., Rosenkilde, M.M., Holst, J.J., and Schwartz, T.W. (2012). GPR119 as a fat sensor. *Trends in pharmacological sciences* *33*, 374-381.
- Hara, T., Kashihara, D., Ichimura, A., Kimura, I., Tsujimoto, G., and Hirasawa, A. (2014). Role of free fatty acid receptors in the regulation of energy metabolism. *Biochimica et biophysica acta* *1841*, 1292-1300.
- Hariri, N., and Thibault, L. (2010). High-fat diet-induced obesity in animal models. *Nutrition research reviews* *23*, 270-299.
- Heath, R.B., Jones, R., Frayn, K.N., and Robertson, M.D. (2004). Vagal stimulation exaggerates the inhibitory ghrelin response to oral fat in humans. *The Journal of endocrinology* *180*, 273-281.
- Heinze, J.M., Preissl, H., Fritsche, A., and Frank, S. (2015). Controversies in fat perception. *Physiology & behavior*.
- Heit, B., Kim, H., Cosio, G., Castano, D., Collins, R., Lowell, C.A., Kain, K.C., Trimble, W.S., and Grinstein, S. (2013). Multimolecular signaling complexes enable Syk-mediated signaling of CD36 internalization. *Developmental cell* *24*, 372-383.
- Herness, S., and Zhao, F.L. (2009). The neuropeptides CCK and NPY and the changing view of cell-to-cell communication in the taste bud. *Physiology & behavior* *97*, 581-591.
- Herness, S., Zhao, F.L., Kaya, N., Shen, T., Lu, S.G., and Cao, Y. (2005). Communication routes within the taste bud by neurotransmitters and neuropeptides. *Chemical senses* *30 Suppl 1*, i37-38.
- Hiraoka, T., Fukuwatari, T., Imaizumi, M., and Fushiki, T. (2003). Effects of oral stimulation with fats on the cephalic phase of pancreatic enzyme secretion in esophagostomized rats. *Physiology & behavior* *79*, 713-717.

- Hirasawa, A., Tsumaya, K., Awaji, T., Katsuma, S., Adachi, T., Yamada, M., Sugimoto, Y., Miyazaki, S., and Tsujimoto, G. (2005). Free fatty acids regulate gut incretin glucagon-like peptide-1 secretion through GPR120. *Nature medicine* *11*, 90-94.
- Hochheimer, A., Krohn, M., Rudert, K., Riedel, K., Becker, S., Thirion, C., and Zinke, H. (2014). Endogenous gustatory responses and gene expression profile of stably proliferating human taste cells isolated from fungiform papillae. *Chemical senses* *39*, 359-377.
- Horio, N., Yoshida, R., Yasumatsu, K., Yanagawa, Y., Ishimaru, Y., Matsunami, H., and Ninomiya, Y. (2011). Sour taste responses in mice lacking PKD channels. *PLoS one* *6*, e20007.
- Huang, A.L., Chen, X., Hoon, M.A., Chandrashekar, J., Guo, W., Trankner, D., Ryba, N.J., and Zuker, C.S. (2006). The cells and logic for mammalian sour taste detection. *Nature* *442*, 934-938.
- Huang, M.M., Bolen, J.B., Barnwell, J.W., Shattil, S.J., and Brugge, J.S. (1991). Membrane glycoprotein IV (CD36) is physically associated with the Fyn, Lyn, and Yes protein-tyrosine kinases in human platelets. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *88*, 7844-7848.
- Huang, Y.J., Maruyama, Y., Dvoryanchikov, G., Pereira, E., Chaudhari, N., and Roper, S.D. (2007). The role of pannexin 1 hemichannels in ATP release and cell-cell communication in mouse taste buds. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *104*, 6436-6441.
- Hurtado, M.D., Acosta, A., Riveros, P.P., Baum, B.J., Ukhanov, K., Brown, A.R., Dotson, C.D., Herzog, H., and Zolotukhin, S. (2012). Distribution of Y-receptors in murine lingual epithelia. *PLoS one* *7*, e46358.
- Hussain, S.S., and Bloom, S.R. (2013). The regulation of food intake by the gut-brain axis: implications for obesity. *International journal of obesity* *37*, 625-633.
- Hwang, I., Park, Y.J., Kim, Y.R., Kim, Y.N., Ka, S., Lee, H.Y., Seong, J.K., Seok, Y.J., and Kim, J.B. (2015). Alteration of gut microbiota by vancomycin and bacitracin improves insulin resistance via glucagon-like peptide 1 in diet-induced obesity. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* *29*, 2397-2411.
- Ibarguren, M., Lopez, D.J., and Escriba, P.V. (2014). The effect of natural and synthetic fatty acids on membrane structure, microdomain organization, cellular functions and human health. *Biochimica et biophysica acta* *1838*, 1518-1528.
- Ichimura, A., Hara, T., and Hirasawa, A. (2014). Regulation of Energy Homeostasis via GPR120. *Frontiers in endocrinology* *5*, 111.
- Ichimura, A., Hirasawa, A., Poulain-Godefroy, O., Bonnefond, A., Hara, T., Yengo, L., Kimura, I., Leloire, A., Liu, N., Iida, K., *et al.* (2012). Dysfunction of lipid sensor GPR120 leads to obesity in both mouse and human. *Nature* *483*, 350-354.
- Imaizumi, M., Takeda, M., and Fushiki, T. (2000). Effects of oil intake in the conditioned place preference test in mice. *Brain research* *870*, 150-156.
- Iwasaki, K., Harada, N., Sasaki, K., Yamane, S., Iida, K., Suzuki, K., Hamasaki, A., Nasteska, D., Shibue, K., Joo, E., *et al.* (2015). Free fatty acid receptor GPR120 is highly expressed in enteroendocrine K cells of the upper small intestine and has a critical role in GIP secretion after fat ingestion. *Endocrinology* *156*, 837-846.
- Iwasaki, S., Aoyagi, H., Asami, T., Wanichanon, C., and Jackowiak, H. (2012). Patterns of immunoreactivity specific for gustducin and for NCAM differ in developing rat circumvallate papillae and their taste buds. *Acta histochemica* *114*, 259-269.
- Jaber, L., Zhao, F.L., Kolli, T., and Herness, S. (2014). A physiologic role for serotonergic transmission in adult rat taste buds. *PLoS one* *9*, e112152.
- Jump, D.B. (2004). Fatty acid regulation of gene transcription. *Critical reviews in clinical laboratory sciences* *41*, 41-78.
- Kallio, K.A., Hatonen, K.A., Lehto, M., Salomaa, V., Mannisto, S., and Pussinen, P.J. (2015). Endotoxemia, nutrition, and cardiometabolic disorders. *Acta Diabetol* *52*, 395-404.
- Kanicky, J.R., and Shah, D.O. (2002). Effect of degree, type, and position of unsaturation on the pKa of long-chain fatty acids. *Journal of colloid and interface science* *256*, 201-207.
- Katsuura, Y., Heckmann, J.A., and Taha, S.A. (2011). mu-Opioid receptor stimulation in the nucleus accumbens elevates fatty tastant intake by increasing palatability and suppressing satiety signals. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology* *301*, R244-254.
- Kawai, K., Sugimoto, K., Nakashima, K., Miura, H., and Ninomiya, Y. (2000). Leptin as a modulator of sweet taste sensitivities in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *97*, 11044-11049.
- Kawai, T., and Fushiki, T. (2003). Importance of lipolysis in oral cavity for orosensory detection of fat. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology* *285*, R447-454.
- Keller, K.L., Liang, L.C., Sakimura, J., May, D., van Belle, C., Breen, C., Driggin, E., Tepper, B.J., Lanzano, P.C., Deng, L., *et al.* (2012). Common variants in the CD36 gene are associated with oral fat perception, fat preferences, and obesity in African Americans. *Obesity* *20*, 1066-1073.

- Kimura, K., Ohtubo, Y., Tateno, K., Takeuchi, K., Kumazawa, T., and Yoshii, K. (2014). Cell-type-dependent action potentials and voltage-gated currents in mouse fungiform taste buds. *The European journal of neuroscience* *39*, 24-34.
- Kinney, N.E., and Antill, R.W. (1996). Role of olfaction in the formation of preference for high-fat foods in mice. *Physiology & behavior* *59*, 475-478.
- Kist, R., Watson, M., Crosier, M., Robinson, M., Fuchs, J., Reichelt, J., and Peters, H. (2014). The formation of endoderm-derived taste sensory organs requires a Pax9-dependent expansion of embryonic taste bud progenitor cells. *PLoS genetics* *10*, e1004709.
- Kock, K., Ahlers, C., and Schmale, H. (1994). Structural organization of the genes for rat von Ebner's gland proteins 1 and 2 reveals their close relationship to lipocalins. *European journal of biochemistry / FEBS* *221*, 905-916.
- Kokrashvili, Z., Yee, K.K., Ilegems, E., Iwatsuki, K., Li, Y., Mosinger, B., and Margolskee, R.F. (2014). Endocrine taste cells. *The British journal of nutrition* *111 Suppl 1*, S23-29.
- Kulkarni, B., and Mattes, R. (2013). Evidence for presence of nonesterified fatty acids as potential gustatory signaling molecules in humans. *Chemical senses* *38*, 119-127.
- Laffargue, A., de Kochko, A., and Dussert, S. (2007). Development of solid-phase extraction and methylation procedures to analyse free fatty acids in lipid-rich seeds. *Plant physiology and biochemistry : PPB / Societe francaise de physiologie vegetale* *45*, 250-257.
- Laisney, C. (2013). Disparités sociales et alimentation (Centre d'études et de la prospective, Ministère de l'agriculture, de l'agroalimentaire et de la forêt).
- Lam, T.K., Schwartz, G.J., and Rossetti, L. (2005). Hypothalamic sensing of fatty acids. *Nature neuroscience* *8*, 579-584.
- Lam, Y.Y., Ha, C.W., Hoffmann, J.M., Oscarsson, J., Dinudom, A., Mather, T.J., Cook, D.I., Hunt, N.H., Caterson, I.D., Holmes, A.J., *et al.* (2015). Effects of dietary fat profile on gut permeability and microbiota and their relationships with metabolic changes in mice. *Obesity* *23*, 1429-1439.
- Lan, H., Hoos, L.M., Liu, L., Tetzloff, G., Hu, W., Abbondanzo, S.J., Vassileva, G., Gustafson, E.L., Hedrick, J.A., and Davis, H.R. (2008). Lack of FFAR1/GPR40 does not protect mice from high-fat diet-induced metabolic disease. *Diabetes* *57*, 2999-3006.
- Laugerette, F., Passilly-Degrace, P., Patris, B., Niot, I., Febbraio, M., Montmayeur, J.P., and Besnard, P. (2005). CD36 involvement in orosensory detection of dietary lipids, spontaneous fat preference, and digestive secretions. *The Journal of clinical investigation* *115*, 3177-3184.
- Lawton, D.M., Furness, D.N., Lindemann, B., and Hackney, C.M. (2000). Localization of the glutamate-aspartate transporter, GLAST, in rat taste buds. *The European journal of neuroscience* *12*, 3163-3171.
- Le Chatelier, E., Nielsen, T., Qin, J., Prifti, E., Hildebrand, F., Falony, G., Almeida, M., Arumugam, M., Batto, J.M., Kennedy, S., *et al.* (2013). Richness of human gut microbiome correlates with metabolic markers. *Nature* *500*, 541-546.
- Le Corre, L., Besnard, P., and Chagnon, M.C. (2015). BPA, an energy balance disruptor. *Critical reviews in food science and nutrition* *55*, 769-777.
- Le Foll, C., Dunn-Meynell, A., Musatov, S., Magnan, C., and Levin, B.E. (2013). FAT/CD36: a major regulator of neuronal fatty acid sensing and energy homeostasis in rats and mice. *Diabetes* *62*, 2709-2716.
- Le Foll, C., Irani, B.G., Magnan, C., Dunn-Meynell, A.A., and Levin, B.E. (2009). Characteristics and mechanisms of hypothalamic neuronal fatty acid sensing. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology* *297*, R655-664.
- Leinonen, J., Parkkila, S., Kaunisto, K., Koivunen, P., and Rajaniemi, H. (2001). Secretion of carbonic anhydrase isoenzyme VI (CA VI) from human and rat lingual serous von Ebner's glands. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* *49*, 657-662.
- Levin, B.E., Routh, V.H., Kang, L., Sanders, N.M., and Dunn-Meynell, A.A. (2004). Neuronal glucosensing: what do we know after 50 years? *Diabetes* *53*, 2521-2528.
- Ley, R.E., Backhed, F., Turnbaugh, P., Lozupone, C.A., Knight, R.D., and Gordon, J.I. (2005). Obesity alters gut microbial ecology. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *102*, 11070-11075.
- Liang, N.C., Hajnal, A., and Norgren, R. (2006). Sham feeding corn oil increases accumbens dopamine in the rat. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology* *291*, R1236-1239.
- Liman, E.R., Zhang, Y.V., and Montell, C. (2014). Peripheral coding of taste. *Neuron* *81*, 984-1000.
- Linnenbrink, M., Wang, J., Hardouin, E.A., Kunzel, S., Metzler, D., and Baines, J.F. (2013). The role of biogeography in shaping diversity of the intestinal microbiota in house mice. *Molecular ecology* *22*, 1904-1916.
- Liou, A.P., Lu, X., Sei, Y., Zhao, X., Pechhold, S., Carrero, R.J., Raybould, H.E., and Wank, S. (2011). The G-protein-coupled receptor GPR40 directly mediates long-chain fatty acid-induced secretion of cholecystokinin. *Gastroenterology* *140*, 903-912.

- Liou, A.P., Paziuk, M., Luevano, J.M., Jr., Machineni, S., Turnbaugh, P.J., and Kaplan, L.M. (2013). Conserved shifts in the gut microbiota due to gastric bypass reduce host weight and adiposity. *Science translational medicine* 5, 178ra141.
- Little, T.J., Isaacs, N.J., Young, R.L., Ott, R., Nguyen, N.Q., Rayner, C.K., Horowitz, M., and Feinle-Bisset, C. (2014). Characterization of duodenal expression and localization of fatty acid-sensing receptors in humans: relationships with body mass index. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology*.
- Liu, H.X., Ermilov, A., Grachtchouk, M., Li, L., Gumucio, D.L., Dlugosz, A.A., and Mistretta, C.M. (2013). Multiple Shh signaling centers participate in fungiform papilla and taste bud formation and maintenance. *Developmental biology* 382, 82-97.
- Liu, L., Hansen, D.R., Kim, I., and Gilbertson, T.A. (2005). Expression and characterization of delayed rectifying K⁺ channels in anterior rat taste buds. *American journal of physiology Cell physiology* 289, C868-880.
- Lo, C.C., Langhans, W., Georgievsky, M., Arnold, M., Caldwell, J.L., Cheng, S., Liu, M., Woods, S.C., and Tso, P. (2012). Apolipoprotein AIV requires cholecystokinin and vagal nerves to suppress food intake. *Endocrinology* 153, 5857-5865.
- Lucas, F., and Sclafani, A. (1999). Differential reinforcing and satiating effects of intragastric fat and carbohydrate infusions in rats. *Physiology & behavior* 66, 381-388.
- Luiken, J.J., Dyck, D.J., Han, X.X., Tandon, N.N., Arumugam, Y., Glatz, J.F., and Bonen, A. (2002). Insulin induces the translocation of the fatty acid transporter FAT/CD36 to the plasma membrane. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism* 282, E491-495.
- Lutz, T.A., and Woods, S.C. (2012). Overview of animal models of obesity. *Current protocols in pharmacology / editorial board, SJ Enna Chapter 5, Unit5* 61.
- Maliphol, A.B., Garth, D.J., and Medler, K.F. (2013). Diet-induced obesity reduces the responsiveness of the peripheral taste receptor cells. *PLoS one* 8, e79403.
- Maljaars, J., Peters, H.P., and Masclee, A.M. (2007). Review article: The gastrointestinal tract: neuroendocrine regulation of satiety and food intake. *Alimentary pharmacology & therapeutics* 26 Suppl 2, 241-250.
- Mann, N.M. (2002). Management of smell and taste problems. *Cleveland Clinic journal of medicine* 69, 329-336.
- Martin, B., Dotson, C.D., Shin, Y.K., Ji, S., Drucker, D.J., Maudsley, S., and Munger, S.D. (2009). Modulation of taste sensitivity by GLP-1 signaling in taste buds. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1170, 98-101.
- Martin, B., Shin, Y.K., White, C.M., Ji, S., Kim, W., Carlson, O.D., Napora, J.K., Chadwick, W., Chapter, M., Waschek, J.A., et al. (2010). Vasoactive intestinal peptide-null mice demonstrate enhanced sweet taste preference, dysglycemia, and reduced taste bud leptin receptor expression. *Diabetes* 59, 1143-1152.
- Martin, C. (2011). Détection gustative des lipides alimentaires chez la souris : portrait croisé de deux lipido-récepteurs, CD36 & GPR120. Impacts sur les préférences alimentaires et la santé (Université de Bourgogne), pp. 196.
- Martin, C., Chevrot, M., Poirier, H., Passilly-Degrace, P., Niot, I., and Besnard, P. (2011a). CD36 as a lipid sensor. *Physiology & behavior* 105, 36-42.
- Martin, C., Passilly-Degrace, P., Chevrot, M., Ancel, D., Sparks, S.M., Drucker, D.J., and Besnard, P. (2012). Lipid-mediated release of GLP-1 by mouse taste buds from circumvallate papillae: putative involvement of GPR120 and impact on taste sensitivity. *Journal of lipid research* 53, 2256-2265.
- Martin, C., Passilly-Degrace, P., Gaillard, D., Merlin, J.F., Chevrot, M., and Besnard, P. (2011b). The lipid-sensor candidates CD36 and GPR120 are differentially regulated by dietary lipids in mouse taste buds: impact on spontaneous fat preference. *PLoS one* 6, e24014.
- Matsumoto, I., Ohmoto, M., Narukawa, M., Yoshihara, Y., and Abe, K. (2011). Skn-1a (Pou2f3) specifies taste receptor cell lineage. *Nature neuroscience* 14, 685-687.
- Matsumura, S., Eguchi, A., Mizushige, T., Kitabayashi, N., Tsuzuki, S., Inoue, K., and Fushiki, T. (2009). Colocalization of GPR120 with phospholipase-Cbeta2 and alpha-gustducin in the taste bud cells in mice. *Neuroscience letters* 450, 186-190.
- Matsumura, S., Mizushige, T., Yoneda, T., Iwanaga, T., Tsuzuki, S., Inoue, K., and Fushiki, T. (2007). GPR expression in the rat taste bud relating to fatty acid sensing. *Biomedical research* 28, 49-55.
- Mattes, R.D. (2009a). Brief oral stimulation, but especially oral fat exposure, elevates serum triglycerides in humans. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology* 296, G365-371.
- Mattes, R.D. (2009b). Oral Fat Exposure Pattern and Lipid Loading Effects on the Serum Triacylglycerol Concentration of Humans. *Chemosensory perception* 2, 180-185.
- Mattes, R.D. (2011). Accumulating evidence supports a taste component for free fatty acids in humans. *Physiology & behavior* 104, 624-631.
- McCormack, D.N., Clyburn, V.L., and Pittman, D.W. (2006). Detection of free fatty acids following a conditioned taste aversion in rats. *Physiology & behavior* 87, 582-594.
- Medler, K.F., Margolskee, R.F., and Kinnamon, S.C. (2003). Electrophysiological characterization of voltage-gated currents in defined taste cell types of mice. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 23, 2608-2617.

- Mela, D.J. (1988). Sensory assessment of fat content in fluid dairy products. *Appetite* 10, 37-44.
- Mela, D.J., Langley, K.R., and Martin, A. (1994). Sensory assessment of fat content: effect of emulsion and subject characteristics. *Appetite* 22, 67-81.
- Mela, D.J., and Sacchetti, D.A. (1991). Sensory preferences for fats: relationships with diet and body composition. *The American journal of clinical nutrition* 53, 908-915.
- Million, M., Maraninchi, M., Henry, M., Armougom, F., Richet, H., Carrieri, P., Valero, R., Raccach, D., Vialettes, B., and Raoult, D. (2012). Obesity-associated gut microbiota is enriched in *Lactobacillus reuteri* and depleted in *Bifidobacterium animalis* and *Methanobrevibacter smithii*. *International journal of obesity* 36, 817-825.
- Miras, A.D., and le Roux, C.W. (2013). Mechanisms underlying weight loss after bariatric surgery. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology* 10, 575-584.
- Miura, H., Kusakabe, Y., and Harada, S. (2006). Cell lineage and differentiation in taste buds. *Archives of histology and cytology* 69, 209-225.
- Miura, H., Kusakabe, Y., Sugiyama, C., Kawamatsu, M., Ninomiya, Y., Motoyama, J., and Hino, A. (2001). Shh and Ptc are associated with taste bud maintenance in the adult mouse. *Mechanisms of development* 106, 143-145.
- Miura, H., Scott, J.K., Harada, S., and Barlow, L.A. (2014). Sonic hedgehog-expressing basal cells are general post-mitotic precursors of functional taste receptor cells. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* 243, 1286-1297.
- Mizushige, T., Kawai, T., Matsumura, S., Yoneda, T., Kawada, T., Tsuzuki, S., Inoue, K., and Fushiki, T. (2006). POMC and orexin mRNA expressions induced by anticipation of a corn-oil emulsion feeding are maintained at the high levels until oil ingestion. *Biomedical research* 27, 227-232.
- Mo, X.L., Wei, H.K., Peng, J., and Tao, Y.X. (2013). Free fatty acid receptor GPR120 and pathogenesis of obesity and type 2 diabetes mellitus. *Progress in molecular biology and translational science* 114, 251-276.
- Montague, C.T., Farooqi, I.S., Whitehead, J.P., Soos, M.A., Rau, H., Wareham, N.J., Sewter, C.P., Digby, J.E., Mohammed, S.N., Hurst, J.A., *et al.* (1997). Congenital leptin deficiency is associated with severe early-onset obesity in humans. *Nature* 387, 903-908.
- Montmayeur, J.P., Fenech, C., Kusumakshi, S., Laugerette, F., Liu, Z.H., Wiencis, A., and Boehm, U. (2011). Screening for G-protein-coupled receptors expressed in mouse taste papillae. *Flavour Frag J* 26, 223-230.
- Moore, K., Zhang, Q., Murgolo, N., Hosted, T., and Duffy, R. (2009). Cloning, expression, and pharmacological characterization of the GPR120 free fatty acid receptor from cynomolgus monkey: comparison with human GPR120 splice variants. *Comparative biochemistry and physiology Part B, Biochemistry & molecular biology* 154, 419-426.
- Mouille, V.S., Le Foll, C., Philippe, E., Kassis, N., Rouch, C., Marsollier, N., Bui, L.C., Guissard, C., Dairou, J., Lorsignol, A., *et al.* (2013). Fatty acid transporter CD36 mediates hypothalamic effect of fatty acids on food intake in rats. *PLoS one* 8, e74021.
- Mouille, V.S., Picard, A., Le Foll, C., Levin, B.E., and Magnan, C. (2014). Lipid sensing in the brain and regulation of energy balance. *Diabetes & metabolism* 40, 29-33.
- Muccioli, G.G., Naslain, D., Backhed, F., Reigstad, C.S., Lambert, D.M., Delzenne, N.M., and Cani, P.D. (2010). The endocannabinoid system links gut microbiota to adipogenesis. *Molecular systems biology* 6, 392.
- Nakamura, Y., Sanematsu, K., Ohta, R., Shirosaki, S., Koyano, K., Nonaka, K., Shigemura, N., and Ninomiya, Y. (2008). Diurnal variation of human sweet taste recognition thresholds is correlated with plasma leptin levels. *Diabetes* 57, 2661-2665.
- Naor, Z. (1991). Is arachidonic acid a second messenger in signal transduction? *Molecular and cellular endocrinology* 80, C181-186.
- Neel, J.V. (1962). Diabetes mellitus: a "thrifty" genotype rendered detrimental by "progress"? *American journal of human genetics* 14, 353-362.
- Nelson, G., Chandrashekar, J., Hoon, M.A., Feng, L., Zhao, G., Ryba, N.J., and Zuker, C.S. (2002). An amino-acid taste receptor. *Nature* 416, 199-202.
- Nelson, G., Hoon, M.A., Chandrashekar, J., Zhang, Y., Ryba, N.J., and Zuker, C.S. (2001). Mammalian sweet taste receptors. *Cell* 106, 381-390.
- Neyraud, E., Palicki, O., Schwartz, C., Nicklaus, S., and Feron, G. (2012). Variability of human saliva composition: possible relationships with fat perception and liking. *Archives of oral biology* 57, 556-566.
- Neyrinck, A.M., Van Hee, V.F., Piront, N., De Backer, F., Toussaint, O., Cani, P.D., and Delzenne, N.M. (2012). Wheat-derived arabinoxylan oligosaccharides with prebiotic effect increase satiety gut peptides and reduce metabolic endotoxemia in diet-induced obese mice. *Nutrition & diabetes* 2, e28.
- Nguyen, A.T., Mandard, S., Dray, C., Deckert, V., Valet, P., Besnard, P., Drucker, D.J., Lagrost, L., and Grober, J. (2014). Lipopolysaccharides-mediated increase in glucose-stimulated insulin secretion: involvement of the GLP-1 pathway. *Diabetes* 63, 471-482.

- Niki, M., Jyotaki, M., Yoshida, R., Yasumatsu, K., Shigemura, N., DiPatrizio, N.V., Piomelli, D., and Ninomiya, Y. (2015). Modulation of sweet taste sensitivities by endogenous leptin and endocannabinoids in mice. *The Journal of physiology*.
- Niot, I., Poirier, H., Tran, T.T., and Besnard, P. (2009). Intestinal absorption of long-chain fatty acids: evidence and uncertainties. *Progress in lipid research* 48, 101-115.
- Nutrinet-Santé (2011). Etude Nutrinet-Santé, Etat d'avancement et résultats préliminaires 30 mois après le lancement.
- ObEpi (2012). Enquête épidémiologique nationale sur le surpoids et l'obésité (INSERM / KANTAR HEALTH / ROCHE).
- Obici, S., Feng, Z., Morgan, K., Stein, D., Karkanias, G., and Rossetti, L. (2002). Central administration of oleic acid inhibits glucose production and food intake. *Diabetes* 51, 271-275.
- Ogden, C.L., Carroll, M.D., Kit, B.K., and Flegal, K.M. (2014). Prevalence of childhood and adult obesity in the United States, 2011-2012. *JAMA : the journal of the American Medical Association* 311, 806-814.
- Oh da, Y., and Walenta, E. (2014). Omega-3 Fatty Acids and FFAR4. *Frontiers in endocrinology* 5, 115.
- Oh, D.Y., Talukdar, S., Bae, E.J., Imamura, T., Morinaga, H., Fan, W., Li, P., Lu, W.J., Watkins, S.M., and Olefsky, J.M. (2010). GPR120 is an omega-3 fatty acid receptor mediating potent anti-inflammatory and insulin-sensitizing effects. *Cell* 142, 687-698.
- Oh, D.Y., Walenta, E., Akiyama, T.E., Lagakos, W.S., Lackey, D., Pessenheiner, A.R., Sasik, R., Hah, N., Chi, T.J., Cox, J.M., *et al.* (2014). A Gpr120-selective agonist improves insulin resistance and chronic inflammation in obese mice. *Nature medicine*.
- Oka, Y., Butnaru, M., von Buchholtz, L., Ryba, N.J., and Zuker, C.S. (2013). High salt recruits aversive taste pathways. *Nature* 494, 472-475.
- Overberg, J., Hummel, T., Krude, H., and Wiegand, S. (2012). Differences in taste sensitivity between obese and non-obese children and adolescents. *Archives of disease in childhood* 97, 1048-1052.
- Ozdener, M.H., Brand, J.G., Spielman, A.I., Lischka, F.W., Teeter, J.H., Breslin, P.A., and Rawson, N.E. (2011). Characterization of human fungiform papillae cells in culture. *Chemical senses* 36, 601-612.
- Ozdener, M.H., Subramaniam, S., Sundaresan, S., Sery, O., Hashimoto, T., Asakawa, Y., Besnard, P., Abumrad, N.A., and Khan, N.A. (2014). CD36- and GPR120-Mediated Ca Signaling in Human Taste Bud Cells Mediates Differential Responses to Fatty Acids and Is Altered in Obese Mice. *Gastroenterology*.
- Pan, D.A., and Storlien, L.H. (1993). Dietary lipid profile is a determinant of tissue phospholipid fatty acid composition and rate of weight gain in rats. *The Journal of nutrition* 123, 512-519.
- Pannacciulli, N., Del Parigi, A., Chen, K., Le, D.S., Reiman, E.M., and Tataranni, P.A. (2006). Brain abnormalities in human obesity: a voxel-based morphometric study. *NeuroImage* 31, 1419-1425.
- Paquot, N., De Flines, J., and Rorive, M. (2012). [Obesity: a model of complex interactions between genetics and environment]. *Revue medicale de Liege* 67, 332-336.
- Park, D.C., Yeo, J.H., Ryu, I.Y., Kim, S.H., Jung, J., and Yeo, S.G. (2015). Differences in taste detection thresholds between normal-weight and obese young adults. *Acta Otolaryngol* 135, 478-483.
- Passilly-Degrace, P., Chevrot, M., Bernard, A., Ancel, D., Martin, C., and Besnard, P. (2013). Is the taste of fat regulated? *Biochimie*.
- Paulsen, S.J., Larsen, L.K., Hansen, G., Chelur, S., Larsen, P.J., and Vrang, N. (2014). Expression of the fatty acid receptor GPR120 in the gut of diet-induced-obese rats and its role in GLP-1 secretion. *PLoS one* 9, e88227.
- Pepino, M.Y., Kuda, O., Samovski, D., and Abumrad, N.A. (2014). Structure-Function of CD36 and Importance of Fatty Acid Signal Transduction in Fat Metabolism. *Annual review of nutrition* 34, 281-303.
- Pepino, M.Y., Love-Gregory, L., Klein, S., and Abumrad, N.A. (2012). The fatty acid translocase gene CD36 and lingual lipase influence oral sensitivity to fat in obese subjects. *Journal of lipid research* 53, 561-566.
- Perea-Martinez, I., Nagai, T., and Chaudhari, N. (2013). Functional cell types in taste buds have distinct longevities. *PLoS one* 8, e53399.
- Pittman, D., Crawley, M.E., Corbin, C.H., and Smith, K.R. (2007). Chorda tympani nerve transection impairs the gustatory detection of free fatty acids in male and female rats. *Brain research* 1151, 74-83.
- Pittman, D.W., Labban, C.E., Anderson, A.A., and O'Connor, H.E. (2006). Linoleic and oleic acids alter the licking responses to sweet, salt, sour, and bitter tastants in rats. *Chemical senses* 31, 835-843.
- Plociennikowska, A., Hromada-Judycka, A., Borzecka, K., and Kwiatkowska, K. (2015). Co-operation of TLR4 and raft proteins in LPS-induced pro-inflammatory signaling. *Cell Mol Life Sci* 72, 557-581.
- Pohl, J., Ring, A., Korkmaz, U., Ehehalt, R., and Stremmel, W. (2005). FAT/CD36-mediated long-chain fatty acid uptake in adipocytes requires plasma membrane rafts. *Molecular biology of the cell* 16, 24-31.
- Poirier, H., Degrace, P., Niot, I., Bernard, A., and Besnard, P. (1996). Localization and regulation of the putative membrane fatty-acid transporter (FAT) in the small intestine. Comparison with fatty acid-binding proteins (FABP). *European journal of biochemistry / FEBS* 238, 368-373.

- Poreba, M.A., Dong, C.X., Li, S.K., Stahl, A., Miner, J.H., and Brubaker, P.L. (2012). Role of fatty acid transport protein 4 in oleic acid-induced glucagon-like peptide-1 secretion from murine intestinal L cells. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism* 303, E899-907.
- Ramirez, I. (1985). Oral stimulation alters digestion of intragastric oil meals in rats. *The American journal of physiology* 248, R459-463.
- Ranganath, L.R., Beety, J.M., Morgan, L.M., Wright, J.W., Howland, R., and Marks, V. (1996). Attenuated GLP-1 secretion in obesity: cause or consequence? *Gut* 38, 916-919.
- Raybould, H.E. (2007). Mechanisms of CCK signaling from gut to brain. *Current opinion in pharmacology* 7, 570-574.
- Ridaura, V.K., Faith, J.J., Rey, F.E., Cheng, J., Duncan, A.E., Kau, A.L., Griffin, N.W., Lombard, V., Henrissat, B., Bain, J.R., et al. (2013). Gut microbiota from twins discordant for obesity modulate metabolism in mice. *Science* 341, 1241214.
- Ring, A., Le Lay, S., Pohl, J., Verkade, P., and Stremmel, W. (2006). Caveolin-1 is required for fatty acid translocase (FAT/CD36) localization and function at the plasma membrane of mouse embryonic fibroblasts. *Biochimica et biophysica acta* 1761, 416-423.
- Ritter, R.C. (2004). Gastrointestinal mechanisms of satiation for food. *Physiology & behavior* 81, 249-273.
- Rodriguez-Pacheco, F., Garcia-Serrano, S., Garcia-Escobar, E., Gutierrez-Repiso, C., Garcia-Arnes, J., Valdes, S., Gonzalo, M., Soriguer, F., Moreno-Ruiz, F.J., Rodriguez-Canete, A., et al. (2014). Effects of obesity/fatty acids on the expression of GPR120. *Molecular nutrition & food research*.
- Rolls, B.J., Rolls, E.T., Rowe, E.A., and Sweeney, K. (1981). Sensory specific satiety in man. *Physiology & behavior* 27, 137-142.
- Rolls, E.T., Critchley, H.D., Browning, A.S., Hernadi, I., and Lenard, L. (1999). Responses to the sensory properties of fat of neurons in the primate orbitofrontal cortex. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 19, 1532-1540.
- Roper, S.D. (2013). Taste buds as peripheral chemosensory processors. *Seminars in cell & developmental biology* 24, 71-79.
- Roper, S.D. (2015). The taste of table salt. *Pflugers Archiv : European journal of physiology* 467, 457-463.
- Rosell, M., Kafourou, M., Frontini, A., Okolo, A., Chan, Y.W., Nikolopoulou, E., Millership, S., Fenech, M.E., MacIntyre, D., Turner, J.O., et al. (2014). Brown and white adipose tissues: intrinsic differences in gene expression and response to cold exposure in mice. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism* 306, E945-964.
- Running, C.A., Craig, B.A., and Mattes, R.D. (2015). Oleogustus: The Unique Taste of Fat. *Chemical senses* 40, 507-516.
- Running, C.A., and Mattes, R.D. (2014). Different oral sensitivities to and sensations of short-, medium-, and long-chain fatty acids in humans. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology* 307, G381-389.
- Sakamoto, K., Matsumura, S., Okafuji, Y., Eguchi, A., Yoneda, T., Mizushige, T., Tsuzuki, S., Inoue, K., and Fushiki, T. (2015). The opioid system contributes to the acquisition of reinforcement for dietary fat but is not required for its maintenance. *Physiology & behavior* 138, 227-235.
- Sako, H., Hori, M., Masuho, I., Saitoh, O., Okada, A., and Tomooka, Y. (2011). Establishment of clonal cell lines of taste buds from a p53(-/-) mouse tongue. *In vitro cellular & developmental biology Animal* 47, 333-340.
- Salazar, N., Dewulf, E.M., Neyrinck, A.M., Bindels, L.B., Cani, P.D., Mahillon, J., de Vos, W.M., Thissen, J.P., Gueimonde, M., de Los Reyes-Gavilan, C.G., et al. (2014). Inulin-type fructans modulate intestinal Bifidobacterium species populations and decrease fecal short-chain fatty acids in obese women. *Clinical nutrition*.
- Samra, R.A. (2010). Fats and Satiety. In *Fat Detection: Taste, Texture, and Post Ingestive Effects*, J.P. Montmayeur, and J. le Coutre, eds. (Boca Raton (FL)).
- Scheen, A.J., and Junien, C. (2012). [Epigenetics, interface between environment and genes: role in complex diseases]. *Revue medicale de Liege* 67, 250-257.
- Schnell, S., Schaefer, M., and Schofl, C. (2007). Free fatty acids increase cytosolic free calcium and stimulate insulin secretion from beta-cells through activation of GPR40. *Molecular and cellular endocrinology* 263, 173-180.
- Schulte, E.M., Avena, N.M., and Gearhardt, A.N. (2015). Which foods may be addictive? The roles of processing, fat content, and glycemic load. *PloS one* 10, e0117959.
- Schwartz, G.J. (2004). Biology of eating behavior in obesity. *Obesity research* 12 Suppl 2, 102S-106S.
- Schwartz, G.J., Fu, J., Astarita, G., Li, X., Gaetani, S., Campolongo, P., Cuomo, V., and Piomelli, D. (2008). The lipid messenger OEA links dietary fat intake to satiety. *Cell metabolism* 8, 281-288.
- Sclafani, A., and Ackroff, K. (2012). Role of gut nutrient sensing in stimulating appetite and conditioning food preferences. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology* 302, R1119-1133.
- Sclafani, A., and Ackroff, K. (2014). Maltodextrin and fat preference deficits in "taste-blind" P2X2/P2X3 knockout mice. *Chemical senses* 39, 507-514.
- Sclafani, A., Ackroff, K., and Abumrad, N.A. (2007a). CD36 gene deletion reduces fat preference and intake but not post-oral fat conditioning in mice. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology* 293, R1823-1832.

- Sclafani, A., Touzani, K., and Ackroff, K. (2015). Intra-gastric fat self-administration is impaired in GPR40/120 double knockout mice. *Physiology & behavior* *147*, 141-148.
- Sclafani, A., Zukerman, S., and Ackroff, K. (2013). GPR40 and GPR120 fatty acid sensors are critical for postoral but not oral mediation of fat preferences in the mouse. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology* *305*, R1490-1497.
- Sclafani, A., Zukerman, S., Glendinning, J.I., and Margolskee, R.F. (2007b). Fat and carbohydrate preferences in mice: the contribution of alpha-gustducin and Trpm5 taste-signaling proteins. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology* *293*, R1504-1513.
- Serrano, A., Pavon, F.J., Tovar, S., Casanueva, F., Senaris, R., Dieguez, C., and de Fonseca, F.R. (2011). Oleoylethanolamide: effects on hypothalamic transmitters and gut peptides regulating food intake. *Neuropharmacology* *60*, 593-601.
- Shen, T., Kaya, N., Zhao, F.L., Lu, S.G., Cao, Y., and Herness, S. (2005). Co-expression patterns of the neuropeptides vasoactive intestinal peptide and cholecystokinin with the transduction molecules alpha-gustducin and T1R2 in rat taste receptor cells. *Neuroscience* *130*, 229-238.
- Shigemura, N., Ohta, R., Kusakabe, Y., Miura, H., Hino, A., Koyano, K., Nakashima, K., and Ninomiya, Y. (2004). Leptin modulates behavioral responses to sweet substances by influencing peripheral taste structures. *Endocrinology* *145*, 839-847.
- Shin, A.C., and Berthoud, H.R. (2011). Food reward functions as affected by obesity and bariatric surgery. *International journal of obesity* *35 Suppl 3*, S40-44.
- Shin, A.C., Townsend, R.L., Patterson, L.M., and Berthoud, H.R. (2011a). "Liking" and "wanting" of sweet and oily food stimuli as affected by high-fat diet-induced obesity, weight loss, leptin, and genetic predisposition. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology* *301*, R1267-1280.
- Shin, A.C., Zheng, H., Pistell, P.J., and Berthoud, H.R. (2011b). Roux-en-Y gastric bypass surgery changes food reward in rats. *International journal of obesity* *35*, 642-651.
- Shin, Y.K., and Egan, J.M. (2010). Roles of hormones in taste signaling. *Results and problems in cell differentiation* *52*, 115-137.
- Shin, Y.K., Martin, B., Golden, E., Dotson, C.D., Maudsley, S., Kim, W., Jang, H.J., Mattson, M.P., Drucker, D.J., Egan, J.M., *et al.* (2008). Modulation of taste sensitivity by GLP-1 signaling. *Journal of neurochemistry* *106*, 455-463.
- Shin, Y.K., Martin, B., Kim, W., White, C.M., Ji, S., Sun, Y., Smith, R.G., Seigny, J., Tschop, M.H., Maudsley, S., *et al.* (2010). Ghrelin is produced in taste cells and ghrelin receptor null mice show reduced taste responsivity to salty (NaCl) and sour (citric acid) tastants. *PLoS one* *5*, e12729.
- Shuto, T., Kato, K., Mori, Y., Viriyakosol, S., Oba, M., Furuta, T., Okiyonedo, T., Arima, H., Suico, M.A., and Kai, H. (2005). Membrane-anchored CD14 is required for LPS-induced TLR4 endocytosis in TLR4/MD-2/CD14 overexpressing CHO cells. *Biochemical and biophysical research communications* *338*, 1402-1409.
- Silverstein, R.L., and Febbraio, M. (2009). CD36, a scavenger receptor involved in immunity, metabolism, angiogenesis, and behavior. *Science signaling* *2*, re3.
- Simons, P.J., Kummer, J.A., Luiken, J.J., and Boon, L. (2011). Apical CD36 immunolocalization in human and porcine taste buds from circumvallate and foliate papillae. *Acta histochemica* *113*, 839-843.
- Simopoulos, A.P. (2008). The importance of the omega-6/omega-3 fatty acid ratio in cardiovascular disease and other chronic diseases. *Experimental biology and medicine* *233*, 674-688.
- Slavin, J. (2013). Fiber and prebiotics: mechanisms and health benefits. *Nutrients* *5*, 1417-1435.
- Smith, J., Su, X., El-Maghrabi, R., Stahl, P.D., and Abumrad, N.A. (2008). Opposite regulation of CD36 ubiquitination by fatty acids and insulin: effects on fatty acid uptake. *The Journal of biological chemistry* *283*, 13578-13585.
- Smith, J.C., Fisher, E.M., Maleszewski, V., and McClain, B. (2000). Orosensory factors in the ingestion of corn oil/sucrose mixtures by the rat. *Physiology & behavior* *69*, 135-146.
- Speliotes, E.K., Willer, C.J., Berndt, S.I., Monda, K.L., Thorleifsson, G., Jackson, A.U., Lango Allen, H., Lindgren, C.M., Luan, J., Magi, R., *et al.* (2010). Association analyses of 249,796 individuals reveal 18 new loci associated with body mass index. *Nature genetics* *42*, 937-948.
- Steneberg, P., Rubins, N., Bartoov-Shifman, R., Walker, M.D., and Edlund, H. (2005). The FFA receptor GPR40 links hyperinsulinemia, hepatic steatosis, and impaired glucose homeostasis in mouse. *Cell metabolism* *1*, 245-258.
- Stewart, J.E., Feinle-Bisset, C., Golding, M., Delahunty, C., Clifton, P.M., and Keast, R.S. (2010). Oral sensitivity to fatty acids, food consumption and BMI in human subjects. *The British journal of nutrition* *104*, 145-152.
- Stewart, J.E., and Keast, R.S. (2012). Recent fat intake modulates fat taste sensitivity in lean and overweight subjects. *International journal of obesity* *36*, 834-842.
- Stewart, J.E., Newman, L.P., and Keast, R.S. (2011a). Oral sensitivity to oleic acid is associated with fat intake and body mass index. *Clinical nutrition* *30*, 838-844.

- Stewart, J.E., Seimon, R.V., Otto, B., Keast, R.S., Clifton, P.M., and Feinle-Bisset, C. (2011b). Marked differences in gustatory and gastrointestinal sensitivity to oleic acid between lean and obese men. *The American journal of clinical nutrition* 93, 703-711.
- Stoeckel, L.E., Weller, R.E., Cook, E.W., 3rd, Twieg, D.B., Knowlton, R.C., and Cox, J.E. (2008). Widespread reward-system activation in obese women in response to pictures of high-calorie foods. *NeuroImage* 41, 636-647.
- Strader, A.D., and Woods, S.C. (2005). Gastrointestinal hormones and food intake. *Gastroenterology* 128, 175-191.
- Stratford, J.M., and Contreras, R.J. (2009). Saliva and other taste stimuli are important for gustatory processing of linoleic acid. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology* 297, R1162-1170.
- Su, X., and Abumrad, N.A. (2009). Cellular fatty acid uptake: a pathway under construction. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* 20, 72-77.
- Suckow, A.T., Polidori, D., Yan, W., Chon, S., Ma, J.Y., Leonard, J., and Briscoe, C.P. (2014). Alteration of the glucagon axis in GPR120 (FFAR4) knockout mice: a role for GPR120 in glucagon secretion. *The Journal of biological chemistry* 289, 15751-15763.
- Sullivan, J.M., Borecki, A.A., and Oleskevich, S. (2010). Stem and progenitor cell compartments within adult mouse taste buds. *The European journal of neuroscience* 31, 1549-1560.
- Sumida, C., Graber, R., and Nunez, E. (1993). Role of fatty acids in signal transduction: modulators and messengers. *Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids* 48, 117-122.
- Sundaresan, S., Shahid, R., Riehl, T.E., Chandra, R., Nassir, F., Stenson, W.F., Liddle, R.A., and Abumrad, N.A. (2013). CD36-dependent signaling mediates fatty acid-induced gut release of secretin and cholecystokinin. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 27, 1191-1202.
- Suzuki, A., Yamane, T., Imaizumi, M., and Fushiki, T. (2003). Integration of orosensory and postingestive stimuli for the control of excessive fat intake in mice. *Nutrition* 19, 36-40.
- Suzuki, Y., Takeda, M., Sakakura, Y., and Suzuki, N. (2005). Distinct expression pattern of insulin-like growth factor family in rodent taste buds. *The Journal of comparative neurology* 482, 74-84.
- Takeda, M., Imaizumi, M., and Fushiki, T. (2000). Preference for vegetable oils in the two-bottle choice test in mice. *Life sciences* 67, 197-204.
- Takeda, M., Imaizumi, M., Sawano, S., Manabe, Y., and Fushiki, T. (2001a). Long-term optional ingestion of corn oil induces excessive caloric intake and obesity in mice. *Nutrition* 17, 117-120.
- Takeda, M., Sawano, S., Imaizumi, M., and Fushiki, T. (2001b). Preference for corn oil in olfactory-blocked mice in the conditioned place preference test and the two-bottle choice test. *Life sciences* 69, 847-854.
- Talukdar, S., Olefsky, J.M., and Osborn, O. (2011). Targeting GPR120 and other fatty acid-sensing GPCRs ameliorates insulin resistance and inflammatory diseases. *Trends in pharmacological sciences* 32, 543-550.
- Tanaka, T., Katsuma, S., Adachi, T., Koshimizu, T.A., Hirasawa, A., and Tsujimoto, G. (2008a). Free fatty acids induce cholecystokinin secretion through GPR120. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology* 377, 523-527.
- Tanaka, T., Yano, T., Adachi, T., Koshimizu, T.A., Hirasawa, A., and Tsujimoto, G. (2008b). 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-Schmiedeberg's archives of pharmacology* 377, 515-522.
- Taruno, A., Matsumoto, I., Ma, Z., Marambaud, P., and Foskett, J.K. (2013). How do taste cells lacking synapses mediate neurotransmission? CALHM1, a voltage-gated ATP channel. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* 35, 1111-1118.
- Tellez, L.A., Ferreira, J.G., Medina, S., Land, B.B., DiLeone, R.J., and de Araujo, I.E. (2013). Flavor-independent maintenance, extinction, and reinstatement of fat self-administration in mice. *Biological psychiatry* 73, 851-859.
- Thorne, R.F., Law, E.G., Elith, C.A., Ralston, K.J., Bates, R.C., and Burns, G.F. (2006). The association between CD36 and Lyn protein tyrosine kinase is mediated by lipid. *Biochemical and biophysical research communications* 351, 51-56.
- Tomchik, S.M., Berg, S., Kim, J.W., Chaudhari, N., and Roper, S.D. (2007). Breadth of tuning and taste coding in mammalian taste buds. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 27, 10840-10848.
- Tran, T.T., Poirier, H., Clement, L., Nassir, F., Pelsers, M.M., Petit, V., Degrace, P., Monnot, M.C., Glatz, J.F., Abumrad, N.A., *et al.* (2011). Luminal lipid regulates CD36 levels and downstream signaling to stimulate chylomicron synthesis. *The Journal of biological chemistry* 286, 25201-25210.
- Treesukosol, Y., Blonde, G.D., Jiang, E., Gonzalez, D., Smith, J.C., and Spector, A.C. (2010). Necessity of the glossopharyngeal nerve in the maintenance of normal intake and ingestive bout size of corn oil by rats. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology* 299, R1050-1058.
- Treesukosol, Y., Smith, K.R., and Spector, A.C. (2011). The functional role of the T1R family of receptors in sweet taste and feeding. *Physiology & behavior* 105, 14-26.
- Tso, P., and Liu, M. (2004). Ingested fat and satiety. *Physiology & behavior* 81, 275-287.

- Tsuruta, M., Kawada, T., Fukuwatari, T., and Fushiki, T. (1999). The orosensory recognition of long-chain fatty acids in rats. *Physiology & behavior* 66, 285-288.
- Tucker, R.M., Mattes, R.D., and Running, C.A. (2014). Mechanisms and effects of "fat taste" in humans. *BioFactors* 40, 313-326.
- Turnbaugh, P.J., Hamady, M., Yatsuneneko, T., Cantarel, B.L., Duncan, A., Ley, R.E., Sogin, M.L., Jones, W.J., Roe, B.A., Affourtit, J.P., *et al.* (2009). A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature* 457, 480-484.
- Turnbaugh, P.J., Ley, R.E., Mahowald, M.A., Magrini, V., Mardis, E.R., and Gordon, J.I. (2006). An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature* 444, 1027-1031.
- Ulven, T., and Christiansen, E. (2015). Dietary Fatty Acids and Their Potential for Controlling Metabolic Diseases Through Activation of FFA4/GPR120. *Annual review of nutrition* 35, 239-263.
- van Oort, M.M., van Doorn, J.M., Bonen, A., Glatz, J.F., van der Horst, D.J., Rodenburg, K.W., and Luiken, J.J. (2008). Insulin-induced translocation of CD36 to the plasma membrane is reversible and shows similarity to that of GLUT4. *Biochimica et biophysica acta* 1781, 61-71.
- Vandenbeuch, A., Anderson, C.B., Parnes, J., Enjyoji, K., Robson, S.C., Finger, T.E., and Kinnamon, S.C. (2013). Role of the ectonucleotidase NTPDase2 in taste bud function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110, 14789-14794.
- Vandenbeuch, A., Clapp, T.R., and Kinnamon, S.C. (2008). Amiloride-sensitive channels in type I fungiform taste cells in mouse. *BMC neuroscience* 9, 1.
- Vandenbeuch, A., Tizzano, M., Anderson, C.B., Stone, L.M., Goldberg, D., and Kinnamon, S.C. (2010). Evidence for a role of glutamate as an efferent transmitter in taste buds. *BMC neuroscience* 11, 77.
- Voigt, N., Stein, J., Galindo, M.M., Dunkel, A., Raguse, J.D., Meyerhof, W., Hofmann, T., and Behrens, M. (2014). The role of lipolysis in human orosensory fat perception. *Journal of lipid research* 55, 870-882.
- Vors, C., Drai, J., Gabert, L., Pineau, G., Laville, M., Vidal, H., Guichard, E., Michalski, M.C., and Feron, G. (2015). Salivary composition in obese vs normal-weight subjects: towards a role in postprandial lipid metabolism? *International journal of obesity*.
- Vozzo, R., Wittert, G., Cocchiario, C., Tan, W.C., Mudge, J., Fraser, R., and Chapman, I. (2003). Similar effects of foods high in protein, carbohydrate and fat on subsequent spontaneous food intake in healthy individuals. *Appetite* 40, 101-107.
- Waguri, T., Goda, T., Kasezawa, N., and Yamakawa-Kobayashi, K. (2013). The combined effects of genetic variations in the GPR120 gene and dietary fat intake on obesity risk. *Biomedical research* 34, 69-74.
- Wang, H., Zhou, M., Brand, J., and Huang, L. (2007). Inflammation activates the interferon signaling pathways in taste bud cells. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 27, 10703-10713.
- Wang, H., Zhou, M., Brand, J., and Huang, L. (2009). Inflammation and taste disorders: mechanisms in taste buds. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1170, 596-603.
- Watson, S.J., Brown, A.J., and Holliday, N.D. (2012). Differential signaling by splice variants of the human free fatty acid receptor GPR120. *Molecular pharmacology* 81, 631-642.
- Wellendorph, P., Johansen, L.D., and Brauner-Osborne, H. (2009). Molecular pharmacology of promiscuous seven transmembrane receptors sensing organic nutrients. *Molecular pharmacology* 76, 453-465.
- WHO (2014). Global Status Report on noncommunicable diseases (WHO Library Cataloguing-in-Publication Data).
- Widmayer, P., Goldschmid, H., Henkel, H., Kuper, M., Konigsrainer, A., and Breer, H. (2015). High fat feeding affects the number of GPR120 cells and enteroendocrine cells in the mouse stomach. *Front Physiol* 6, 53.
- Widmayer, P., Kuper, M., Kramer, M., Konigsrainer, A., and Breer, H. (2012). Altered expression of gustatory-signaling elements in gastric tissue of morbidly obese patients. *International journal of obesity* 36, 1353-1359.
- Yoneda, T., Saitou, K., Asano, H., Mizushige, T., Matsumura, S., Eguchi, A., Manabe, Y., Tsuzuki, S., Inoue, K., and Fushiki, T. (2009). Assessing palatability of long-chain fatty acids from the licking behavior of BALB/c mice. *Physiology & behavior* 96, 735-741.
- Yoneda, T., Saitou, K., Mizushige, T., Matsumura, S., Manabe, Y., Tsuzuki, S., Inoue, K., and Fushiki, T. (2007a). The palatability of corn oil and linoleic acid to mice as measured by short-term two-bottle choice and licking tests. *Physiology & behavior* 91, 304-309.
- Yoneda, T., Taka, Y., Okamura, M., Mizushige, T., Matsumura, S., Manabe, Y., Tsuzuki, S., Inoue, K., and Fushiki, T. (2007b). Reinforcing effect for corn oil stimulus was concentration dependent in an operant task in mice. *Life sciences* 81, 1585-1592.
- Yoshida, R., Ohkuri, T., Jyotaki, M., Yasuo, T., Horio, N., Yasumatsu, K., Sanematsu, K., Shigemura, N., Yamamoto, T., Margolskee, R.F., *et al.* (2010). Endocannabinoids selectively enhance sweet taste. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, 935-939.
- Yu, T., Shah, B.P., Hansen, D.R., Park-York, M., and Gilbertson, T.A. (2012). Activation of oral trigeminal neurons by fatty acids is dependent upon intracellular calcium. *Pflügers Archiv : European journal of physiology* 464, 227-237.

- Zeng, Q., Kwan, A., and Oakley, B. (2000). Gustatory innervation and bax-dependent caspase-2: participants in the life and death pathways of mouse taste receptor cells. *The Journal of comparative neurology* 424, 640-650.
- Zhang, X.J., Zhou, L.H., Ban, X., Liu, D.X., Jiang, W., and Liu, X.M. (2011). Decreased expression of CD36 in circumvallate taste buds of high-fat diet induced obese rats. *Acta histochemica* 113, 663-667.
- Zhang, Y., Proenca, R., Maffei, M., Barone, M., Leopold, L., and Friedman, J.M. (1994). Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 372, 425-432.
- Zhao, F.L., Shen, T., Kaya, N., Lu, S.G., Cao, Y., and Herness, S. (2005). Expression, physiological action, and coexpression patterns of neuropeptide Y in rat taste-bud cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 11100-11105.
- Zukerman, S., Ackroff, K., and Sclafani, A. (2011). Rapid post-oral stimulation of intake and flavor conditioning by glucose and fat in the mouse. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology* 301, R1635-1647.

Publications et Communications

LISTE DES PUBLICATIONS

Ancel D., Bernard A., Subramaniam S., Hirasawa A., Tsujimoto G., Hashimoto T., Passilly-Degrace P., Khan N.A. and Besnard P. *The oral lipid sensor GPR120 is not indispensable for the orosensory detection of dietary lipids in the mouse.* J Lipid Res, 2015 Feb;56(2):369-78.

Chevrot, M., Passilly-Degrace, P., Ancel, D., Bernard, A., Enderli, G., Gomes, M., Robin, I., Issanchou, S., Vergès, B., Nicklaus, S., and Besnard, P., *Obesity interferes with the orosensory detection of long-chain fatty acids in Human.* Am J Clin Nutr, 2014 May;99(5):975-83.

Passilly-Degrace, P., Chevrot, M., Bernard, A., Ancel, D., Martin, C. and Besnard, P., *Is the taste of fat regulated?* Biochimie, 2014 Jan;96:3-7.

Chevrot, M., Bernard, A., Ancel, D., Buttet, M., Martin, C., Abdoul-Azize, S., Merlin, J-F., Poirier, H., Niot, I., Akhtar Khan, N., Passilly-Degrace, P., and Besnard, P., *Obesity alters the gustatory perception of lipids in the mouse: plausible involvement of lingual CD36.* J Lipid Res, 2013 Sep;54(9):2485-94

Martin, C., Passilly-Degrace, P., Chevrot, M., Ancel, D., M. Sparks, S., J. Drucker, D., and Besnard, P., *Lipid-mediated release of GLP-1 by mouse taste buds from circumvallate papillae: putative involvement of GPR120 and impact on taste sensitivity.* J Lipid Res, 2012 Nov;53(11):2256-65.

COMMUNICATIONS ORALES ET AFFICHEES

Communications orales

Le senseur lipidique GPR120 n'est pas indispensable pour la préférence aux lipides médiée par le goût chez la souris. D. Ancel, A. Bernard, S. Subramaniam, A. Hirasawa, G. Tsujimoto, T. Hashimoto, P. Passilly-Degrace, N-A. Khan, P. Besnard. **Journées Francophones de Nutrition (JFN)**, Bruxelles, 10-12 décembre 2014.

Impact d'un régime obésogène sur la perception oro-sensorielle des lipides alimentaires chez la souris. Ancel D., Chevrot M., Bernard A., Merlin J-F., Passilly-Degrace P., Besnard P. **Forum des Jeunes Chercheurs (FJC)**, Dijon, 13-14 juin 2013.

Impact d'un régime obésogène riche en acides gras saturés sur la perception oro-sensorielle des lipides alimentaires chez la souris. M. Chevrot, A. Bernard, D. Ancel, J-F. Merlin, P. Passilly-Degrace, P. Besnard. **Journées Francophones de Nutrition (JFN)**, Lyon, 12-14 décembre 2012.

Communications affichées

La chute de la détection oro-sensorielle des lipides alimentaires chez la souris obèse a-t-elle une origine inflammatoire ? Bernard, D. Ancel, M. Chevrot, J-P Pais De Barros, L. Lagrost, P. Passilly-Degrace, P. Besnard (poster présenté par Arnaud Bernard). **Journées Francophones de Nutrition (JFN)**, Bruxelles, 10-12 décembre 2014.

Obesity interferes with the oro-sensory detection of long-chain fatty acids in Human. M Chevrot, P Passilly-Degrace, C Martin, G Enderli, M Gomes, D Ancel, I Robin, S Issanchou, B Vergès, S Nicklaus, P Besnard. **9^{ème} congrès international Goût Nutrition Santé (Vitagora)**, Dijon, 3-4 avril 2014.

Diet-induced obesity decreases the preference for lipids in the mouse. A Bernard, M Chevrot, D Ance, M Buttet, , C Martin, S Abdoul-Azize, JF Merlin, H Poirier, I Niot, NA Khan, P Passilly-Degrace, P Besnard. **9^{ème} congrès international Goût Nutrition Santé** (Vitagora), Dijon, 3-4 avril 2014.

Comparative immunolocalization of the lipid-receptors CD36 and GPR120 in taste buds from mouse circumvallate papillae. D. Ance, P. Passilly-Degrace, C. Schneider, C. Martin, P. Besnard. **Journées Francophones de Nutrition** (JFN), Bordeaux, 11-13 décembre 2013.

Obesity interferes with the oro-sensory detection of long-chain fatty acids in Human. M Chevrot, P Passilly-Degrace, C Martin, G Enderli, M Gomes, D Ance, I Robin, S Issanchou, B Vergès, S Nicklaus, P Besnard (poster présenté par Philippe Besnard). **Journées Francophones de Nutrition** (JFN), Bordeaux, 11-13 décembre 2013.

Diet-induced obesity decreases the preference for lipids in the mouse. A Bernard, M Chevrot, D Ance, M Buttet, C Martin, S Abdoul-Azize, JF Merlin, H Poirier, I Niot, NA Khan, P Passilly-Degrace, P Besnard. **Journées Francophones de Nutrition** (JFN), Bordeaux, 11-13 décembre 2013.

Comparative immunolocalization of the lipid-receptors CD36 and GPR120 in taste buds from mouse circumvallate papillae. D. Ance, P. Passilly-Degrace, C. Schneider, C. Martin, P. Besnard. **21^{ème} congrès de la Society for the Study of Ingestive Behaviour** (SSIB), Nouvelle Orléans, Etats-Unis, 30 juillet - 3 août 2013.

Obesity interferes with the oro-sensory detection of long-chain fatty acids in Human. M Chevrot, P Passilly-Degrace, C Martin, G Enderli, M Gomes, D Ance, I Robin, S Issanchou, B Vergès, S Nicklaus, P Besnard (poster présenté par Philippe Besnard). **21^{ème} congrès de la Society for the Study of Ingestive Behaviour** (SSIB), Nouvelle Orléans, Etats-Unis, 30 juillet - 3 août 2013.

Diet-induced obesity decreases the preference for lipids in the mouse. A Bernard, M Chevrot, D Ance, M Buttet, , C Martin, S Abdoul-Azize, JF Merlin, H Poirier, I Niot, NA Khan, P Passilly-Degrace, P Besnard (poster présenté par Arnaud Bernard). **21^{ème} congrès de la Society for the Study of Ingestive Behaviour** (SSIB), Nouvelle Orléans, Etats-Unis, 30 juillet - 3 août 2013.

Obesity interferes with the oro-sensory detection of long-chain fatty acids in Human. M Chevrot, P Passilly-Degrace, C Martin, G Enderli, M Gomes, D Ance, I Robin, S Issanchou, B Vergès, S Nicklaus, P Besnard (poster présenté par Michael Chevrot). **13^{ème} journée de l'Institut Multidisciplinaire de Biochimie des Lipides** (IMBL), Dijon, 7 juin 2013.

Diet-induced obesity decreases the preference for lipids in the mouse. A Bernard, M Chevrot, D Ance, M Buttet, , C Martin, S Abdoul-Azize, JF Merlin, H Poirier, I Niot, NA Khan, P Passilly-Degrace, P Besnard (poster présenté par Arnaud Bernard). **13^{ème} journée de l'Institut Multidisciplinaire de Biochimie des Lipides** (IMBL), Dijon, 7 juin 2013.

✦ Author's Choice

Lipid-mediated release of GLP-1 by mouse taste buds from circumvallate papillae: putative involvement of GPR120 and impact on taste sensitivity

Céline Martin,* Patricia Passilly-Degrace,* Michaël Chevrot,* Déborah Ancel,* Steven M. Sparks,[†] Daniel J. Drucker,[§] and Philippe Besnard^{1,*}

Physiologie de la Nutrition et Toxicologie (NUTox),* UMR U866 INSERM/Université de Bourgogne/AgroSup Dijon, F-21000 Dijon, France; GlaxoSmithKline Metabolic Pathways,[†] Enteroendocrine DPU, Research Triangle Park, NC; Department of Medicine,[§] Mt. Sinai Hospital, The Samuel Lunenfeld Research Institute, University of Toronto, Toronto, Ontario, Canada.

Abstract Glucagon-like peptide-1 (GLP-1) signaling modulates sweet-taste sensitivity in the mouse. Because circumvallate papillae (CVPs) express both GLP-1 and its receptor, a local regulation has been suggested. However, whether dietary lipids are involved in this regulation, as shown in the gut, is unknown. By using a combination of biochemical, immunohistochemical, and behavioral approaches, the present data i) confirm the role of GLP-1 signaling in the attraction for sucrose, ii) demonstrate that minute quantities of long-chain FAs (LCFAs) reinforce the attraction for sucrose in a GLP-1 receptor-dependent manner, iii) suggest an involvement of the LCFA receptor GPR120 expressed in taste buds in this system, and iv) support the existence of a regulation by GLP-1 of the lipid sensing mediated by lingual CD36. Therefore, oro-sensory detection of LCFAs may affect sweet and fatty taste responsiveness by controlling the secretion of lingual GLP-1. This regulatory loop, probably triggered by the LCFA-GPR120 interaction, might contribute to the high palatability of foods rich both in fat and sugar.—Martin, C., P. Passilly-Degrace, M. Chevrot, D. Ancel, S. M. Sparks, D. J. Drucker, and P. Besnard. **Lipid-mediated release of GLP-1 by mouse taste buds from circumvallate papillae: putative involvement of GPR120 and impact on taste sensitivity.** *J. Lipid Res.* 2012, 53: 2256–2265.

Supplementary key words long-chain fatty acid • eating behavior • obesity risk • health

Substantial evidence supports the existence of a specific detection system devoted to the oro-sensory perception of dietary lipids in both rodents and humans. Long-chain

FAs (LCFAs) are the main molecules detected by this system and are thought to play a significant role in the spontaneous preference for fatty foods (1, 2). The plasma membrane glycoprotein CD36 has been the first plausible candidate identified to exert the function of a lipid sensor in the oral cavity (3). Indeed, it displays a very high affinity for LCFAs (4), is specifically found in the gustatory papillae in rat (5), mouse (3), or human (6), and ablation of *CD36* gene expression renders mice unable to recognize and prefer LCFAs in a textured solution during two-bottle preference tests (3, 7, 8). In human subjects, the common single-nucleotide polymorphism rs1761667, known to reduce *CD36* gene expression (9), is also associated with a deep attenuation of orosensory sensitivity for fat (10).

Two unrelated members of the G protein-coupled receptor family, the free fatty acid receptor 1 (FFAR1, also termed GPR40) and GPR120, have also been recently identified as playing a role in the spontaneous preference for fat in the mouse (11). Such a function is probably indirect for FFAR1, inasmuch as it is not found in taste buds in rat (12) and human (13) and is not systematically detected in circumvallate papillae (CVPs) in the mouse (8, 11), in contrast to GPR120. This last observation raises the question of the respective role(s) played by CD36 and GPR120 in the coding mechanisms for fat taste at the periphery. The fact that CD36 expression is subjected to a short-term lipid-mediated downregulation in mouse taste buds during food intake, whereas *GPR120* gene expression remains unchanged (8), is consistent with distinct functions.

A biological action for GPR120 was first identified in the entero-endocrine L cells, in which its activation by LCFA triggers the secretion of the glucagon-like peptide-1 (GLP-1)

Abbreviations: ALA, α -linolenic acid; CVPs, circumvallate papillae; DPP4, dipeptidyl peptidase 4; FFAR1, free fatty acid receptor 1; GLP-1, glucagon-like peptide-1; GLP-1R, GLP-1 receptor; LCFA, long-chain FA; OLA, oleic acid; TBC, taste bud cell.

¹To whom correspondence should be addressed.
e-mail: pbesnard@u-bourgogne.fr

Copyright © 2012 by the American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc.

This article is available online at <http://www.jlr.org>

ASBMB

JOURNAL OF LIPID RESEARCH



(14). In addition to its insulinotropic effect, GLP-1 exerts multiple physiological functions, including a role in the regulation of eating behavior (15). Interestingly, GLP-1 and its receptor (GLP-1R) have also been identified in mouse taste buds, suggesting an involvement of this incretin in the sense of taste (16). Consistent with this assumption, it has been shown that GLP-1 signaling modulates taste sensitivity in the mouse, decreasing sour taste but enhancing the responsiveness to sucrose (16). However, mechanisms by which this regulation takes place are not yet determined.

Compelling evidence supports the existence of a functional continuum along the oro-intestinal tract responsible for the permanent analysis and control of ingestion, digestion, absorption, and metabolic fate of energy nutrients. For fat, cells from taste buds and entero-endocrine cells share common lipid sensors (e.g., GPR120), express similar hormones and their respective receptors (e.g., GLP-1, GLP-1R), and are connected to afferent nerve fibers involved in feeding behavior (i.e., gustatory nerves and vagus). A continuum being "a set of elements such that one can pass from one to another continuously," we propose that fundamental knowledge of the gut can be used to better understand the functional characteristics of the oro-sensory tract, and reciprocally. Consistent with this hypothesis, the goal of the present work was to determine whether LCFA, GPR120, and GLP-1 are functionally linked in the tongue, as found in the gut, and to explore the impact of such a regulatory system on sweet and fatty taste responsiveness.

MATERIALS AND METHODS

Ethics statement

French guidelines for the use and care of laboratory animals were followed, and experimental protocols were approved by the animal ethics committee of Burgundy University (approval codes B1010, B0210, and C1011).

Animals

Animals were housed in a controlled environment (constant temperature and humidity, darkness from 7 PM to 7 AM) and were fed a standard laboratory chow (4RF21; Mucedola, Italy). C57Bl/6j wild-type mice were purchased from Charles River Laboratories (France). *CD36*^{-/-} (17) and *Glp1r*^{-/-} (18) mice with a C57Bl/6j background were bred locally.

Behavioral experiments

CD36^{-/-} and *Glp1r*^{-/-} mice were used in the behavioral experiments. Two different tests, offered successively in a randomized manner, were a licking test or, simultaneously, a two-bottle preference test. A control or an experimental solution were used: a licking test that offered successively, in a randomized manner, a control and an experimental solution and a two bottle preference test in which control and experimental solutions were offered simultaneously.

Licking test. This test consists of subjecting a mouse to the control or experimental solution successively to determine the number of licks given on each bottle using a contact lickometer (Med Associates). Mice were food- and water-deprived for 6 h before the test, which took place 6 h after the beginning of the dark period. After a training period required to learn the procedure,

different groups of mice were subjected to different solutions. In a first experiment, mice were randomly subjected to a bottle containing a control solution (62 mM of sucrose; Sigma-Aldrich) or a bottle containing an experimental solution [62 mM of sucrose + 200 μ M of oleic acid (OLA) or α -linolenic acid (ALA); Sigma-Aldrich] for 15 min. Then mice were offered the other bottle for an additional 15 min session. OLA and ALA were previously dissolved in ethanol (0.1% final). The same quantity of ethanol was added in the control solution. In a second experiment, mice were randomly subjected to a bottle containing water (control solution) or a bottle containing 62 mM sucrose, 200 μ M of OLA, or 200 μ M of ALA in water. In a third experiment, mice were randomly subjected to a bottle containing mineral oil (control solution; Cooper, France) or different concentrations of OLA in mineral oil. In each experiment, data were analyzed for 1 min from the first lick to exclude postingestive signals.

Two-bottle preference test. Mice were subjected for 12 h to a double-choice test. Mice were offered a pair of bottles of water in experimental cages for 1 day. Because rapeseed oil was added in xanthan gum to facilitate solubilization and minimize textural cues, mice were subjected on day 2 to 0.3% xanthan gum (Sigma-Aldrich) alone to avoid neophobia. A double-choice test between control solution (xanthan gum) and experimental solution (xanthan gum + rapeseed oil) was performed on day 3. The position of the bottles (on the right or the left) was changed daily to avoid the development of side preference. Consumption of each solution (in grams) was analyzed for 12 h after the beginning of the test, and preference for the experimental solutions (ratio between the consumption on experimental bottle and the total consumption) was calculated.

Papillae isolation

CVPs from wild-type or *Glp1r*^{-/-} mice were isolated according to previously published procedures (3). In brief, the lingual epithelium was separated from connective tissue by enzymatic dissociation (elastase and dispase mixture, 2 mg/ml each in Tyrode buffer: 140 mM NaCl, 5 mM KCl, 10 mM HEPES, 1 mM CaCl₂, 10 mM glucose, 1 mM MgCl₂, 10 mM Na pyruvate, pH 7.4), and papillae were dissected under a microscope. Epithelium surrounding the papillae was also collected to serve as nonsensory control tissue. Samples were snap-frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until RNA or protein extraction, or put in culture.

Tissue culture of CVPs

CVPs of wild-type mice were isolated and incubated at 37°C in an oxygenized medium containing 33 μ M FA-free BSA alone (Sigma-Aldrich; control solution), 200 μ M ALA, 200 μ M OLA, or 50 μ M of a GPR120 agonist (GSKI37647A). After 2 h of incubation, the medium was collected, and the active GLP-1 release was measured by ELISA (Millipore). We have postulated that secretion of GLP-1 by CVPs might be very low. To be sure to detect active GLP-1 in the incubation medium, 10 pM of pure GLP-1 were systematically added in each experimental well, but not in standard curve, according to the manufacturers' recommendations. In these conditions, values under 2 pM become resolved. A dipeptidyl peptidase 4 (DPP4) inhibitor (0.1%; Millipore) was added to the medium to prevent GLP-1 degradation.

Compound profiling in recombinant GPR120 receptor assay using intracellular calcium mobilization

U2OS cells (human osteo-sarcoma ATCC HTB-96; American Type Culture Collection) were grown in DMEM/F-12 supplemented with 10% FBS and 2 mM L-glutamine. Recombinant GPR120-expressing cells were generated by transducing U2OS cells with BacMam viruses encoding the respective receptors and

the chimeric G-protein Gα16 according to established protocols (19). In brief, cells were plated to a density of 2×10^5 cells/ml in cell culture medium containing human GPR120 (0.25%, v/v), mouse GPR120 (0.5%, v/v), or rat GPR120 (0.8%, v/v) BacMam virus. Gα16 BacMam virus (0.12%, v/v) was also transduced in preparation of recombinant human GPR120 cells to allow efficient coupling of the human GPR120 receptor to the phospholipase C pathway. This solution of cells/virus mixture was then plated at a density of 10^4 cells/well and cultured at 37°C, 5% CO₂, 95% humidity for 24 h. Functional EC₅₀ studies were performed in cells incubated with HBSS containing the cytoplasmic calcium indicator Fluo-4 dye in the acetylmethyl form (4 mM), 2.5 mM probenecid, and 250 μM Brilliant Black at 37°C for 60 min. Compound plates were generated containing 3% DMSO in dye loading buffer. Compounds (i.e., GPR120 agonist GSK137647A or histamine for host untransduced U2OS cells) were added to the cells at a 1:3 dilution, and calcium mobilization was measured using a fluorescence image plate reader (Molecular Devices). Data were converted into normalized responses with respect to assay standards GSK137647A (for GPR120) or histamine (for host U2OS cells). Data were further analyzed using a four-parameter fit to calculate EC₅₀ values.

Real-time RT-PCR

Total RNA from CVPs and surrounding nongustatory epithelium (negative control) was extracted using RNeasy mini-columns (Qiagen). Genomic DNA digestion was performed using the RNase-free DNase set (Qiagen). First-strand cDNA was generated by reverse transcription from total RNA (OmniScript Reverse Transcription; Qiagen). Levels of mRNA transcripts were determined by real-time RT-PCR (StepOnePlus apparatus; Applied Biosystems). RNA levels were normalized against levels of 36B4 RNA transcripts. Primer probe sets were designed with the Primer3 software tool using gene sequences, either from the GenBank database or purchased directly from Applied Biosystems. PCR amplification was done using Sybrgreen (Power SYBR Green PCR Master Mix; Applied Biosystems) or Taqman (Universal Taqman PCR Master Mix; Applied Biosystems) technology. The oligonucleotide sequences of primers and probes are shown in **Table 1**. The comparative 2^{-ΔΔCT} method was used for relative quantification (20).

Western blotting

Samples were homogenized using a micro-potter in a tris/sodium/EDTA buffer (50 mM Tris HCl, 150 mM NaCl, 1 mM

EDTA, 1% nonidet P.40). Protein concentration in homogenates was assayed using a bicinchoninic acid kit (Perkin Elmer). After being separated by SDS-PAGE, proteins were transferred to a polyvinylidene difluoride membrane by electroblotting. After being blocked using a TBS buffer containing 5% BSA and 0.05% Tween 20, membranes were incubated overnight at 4°C with an anti-CD36 primary antibody raised in goat (1:1,000 dilution; R&D Systems) or an anti-GPR120 primary antibody raised in rabbit (1:1,000 dilution; MBL International Corp.). After a set of washes, an appropriate peroxidase-conjugated secondary antibody was added (Santa Cruz Biotechnology). Antibody labeling was detected by chemiluminescence (ECL-plus reagent; Perkin Elmer). GAPDH was used as an internal reference protein.

Immunohistochemistry

CVPs from wild-type mice were fixed for 2–3 h in 4% paraformaldehyde, cryoprotected overnight with 30% sucrose in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4), and then embedded in OCT medium (Tissue-Tek; Sakura Finetek). Cryostat sections (10 μm) were air dried for 2 h at room temperature and then rehydrated in 0.1 M PBS (pH 7.4) for 10 min. Rehydrated sections were incubated for 1 h with PBS containing 0.3% Triton X-100, 30 min with PBS 50 mM glycine, and then blocked with 10% FA-free BSA in PBS for 40 min. Next, the slices were incubated overnight at 4°C with an anti-GPR120 primary antibody raised in rabbit (1:500 dilution; MBL). Specificity of the GPR120 antibody has been documented elsewhere (11). After washing, sections were incubated for 1 h at room temperature with a fluorescent anti-rabbit secondary antibody (Alexa 568, 1:1,000 dilution; Invitrogen). After washing, slices were blocked again before adding an anti-CD36 primary antibody raised in goat (1:250 dilution; R&D Systems) or an anti-GLP-1 primary antibody raised in goat (1:100 dilution; Santa Cruz Biotechnology). This GLP-1 antibody was used elsewhere (21). Sections were next incubated with a fluorescent anti-goat secondary antibody (Alexa 488, 1:1,000 dilution; Invitrogen) and then counterstained with Hoechst reactive (0.05 mg/ml; Sigma-Aldrich) to stain the nuclei. Slices were analyzed under a confocal microscope (Leica). In no cases was fluorescent staining observed when the primary antibody was omitted.

Statistics

Results are expressed as mean ± SEM. The significance of differences between groups was evaluated with SigmaStat (Systat Software; Germany). We first checked that the data for each

TABLE 1. Sequences and GenBank numbers of primers employed for RT-PCR amplifications

Gene name	Nucleotides sequences (5'→3') or Applied Biosystems Taqman Assay ID details	PubMed accession number
CD36	Forward: GGCCAAGCTATTGCGACATG Probe: CACAGACGCAGCCCTTTCCACCT Reverse: CCGAAGACAGCGTAGATAGAC	NM_007643
GPR120	Mm01198944_m1	NM_181748
α-Gustducin	Forward: ACACATTGCAGTCCATCCTAGC Probe: TGAAGTTGTTCTTGGTGCTCTCGGCTCC Reverse: ATCACCATCTTCTAGTGTATTTGGC	XM_144196
PLCβ2	Forward: GGCTTGAGTTTCATGGTCATT Reverse: ACTCCCCCTGTCTTTCCCTA	NM_177568
T1R2	Forward: CCGCCAGGCTTTCTTCACC Probe: TTGCTTCTCCGTCTGCCTCTCCTGC Reverse: AGACGCACACAATCTGGAAGG	NM_031873.1
IP3R3	Forward: ACGGAGCTGCCACATTAT Reverse: CTGCTCCTCTTCTACGATCTC	NM_080553
36B4	Forward: GCCACCTGGAGAACAACCC Probe: AGGTCTCTCTTGGTGAACACGAAGCC Reverse: GCCAAGCAGCATATCCGAATC	NM_007475
T1R3	Mm00473459_g1	NM_031872.2
SGLT-1	Mm0041203_m1	NM_019810.4
TRPM5	Mm00498453_m1	NM_020277.2

group were normally distributed and that variances were equal and then carried out ANOVA, two-tailed Student's *t*-test, or Mann-Whitney tests. A *P* value of less than 0.05 was considered to be statistically significant.

RESULTS

LCFAs enhance the GLP-1-mediated induction of sweet-taste sensitivity

To explore the mechanisms by which GLP-1 can affect sweet-taste sensitivity, drinking behavior of wild-type and *Glp1r*^{-/-} mice was compared using computer-controlled lickometers and a brief access procedure (1 min). Consistent with published data (16), functional disruption of the *Glp1r* gene led to a decrease in the attraction for sucrose under conditions in which postingestive cues were known to be deeply minimized (Fig. 1A). This effect took place independently of changes in both CVP structure (data not shown) and expression of the key genes responsible for sweet-taste perception (Fig. 1B). Interestingly, addition of a small quantity of ALA or OLA reinforced the avidity for the sucrose solution in wild-type mice, but was without effect in *Glp1r*^{-/-} mice (Fig. 1C), suggesting that LCFAs may modulate sweet-taste sensitivity via the GLP-1 signaling pathway. It is unlikely that the greater preference for the fat-sweet mix was due to an additive effect

of these two tastants, inasmuch as the concentration of LCFA used (i.e., 200 μM ≈ 0.005%) was not detected by mice when it was presented alone in a control solution (Fig. 2A). This behavior is independent of any change in relative expression of genes encoding for the gustatory lipid sensors GPR120 and CD36 in *Glp1r*-null mice (Fig. 2B, C).

GLP-1 signaling in CVPs is independent of CD36 gene expression

GLP-1 has been found in a few taste bud cells (TBCs) in various species (16, 22), but the mechanisms leading to its secretion by gustatory papillae are not yet fully understood. Because mouse CVPs express both GPR120 and GLP-1, we hypothesized that the activation of GPR120 by LCFA leads to GLP-1 secretion by TBCs, as reported for intestinal enteroendocrine L cells (14). In support of this hypothesis, GPR120 and GLP-1 were found to be coexpressed in a large number of mouse taste cells from mouse CVPs (Fig. 3A). No staining was detected when the GPR120 or the GLP-1 antibodies were omitted (data not shown). The fact that CD36 was also found to be coexpressed with GPR120 in subsets of TBCs (Fig. 3B) raises the possibility of a direct or indirect implication of lingual CD36 in the GLP-1-dependent modulation of avidity for sucrose. To assess this assumption, sucrose licking tests in the presence or absence

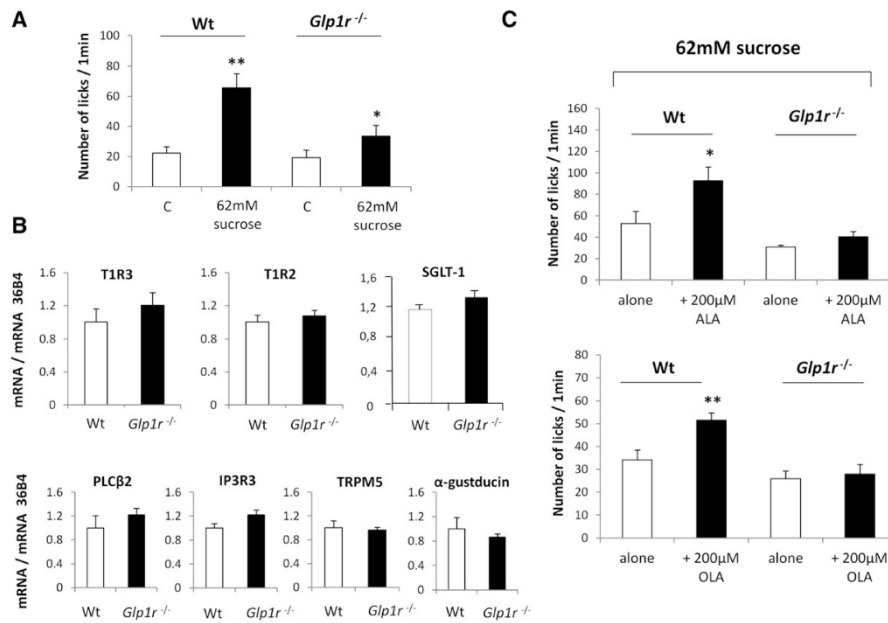


Fig. 1. Minute quantities of LCFA increase sweet-taste sensitivity via the GLP-1 signaling. A: Short-term licking tests (1 min) in wild-type (Wt) and *Glp1r*^{-/-} mice subjected to a control solution or 62 mM sucrose solution. Mean ± SEM (n = 11–15). * *P* < 0.05; ** *P* < 0.01. B: mRNA levels of key genes involved in sweet-taste perception assayed by real-time PCR in CVPs from wild-type (Wt) and *Glp1r*^{-/-} mice. Each value corresponds to a pool of total RNA from two mice. Mean ± SEM (n = 6). C: Short-term licking tests (1 min) in wild-type (Wt) and *Glp1r*^{-/-} mice subjected to a 62 mM sucrose solution alone or in the presence of 200 μM ALA or OLA. Mean ± SEM (n = 11–13). * *P* < 0.05; ** *P* < 0.01.

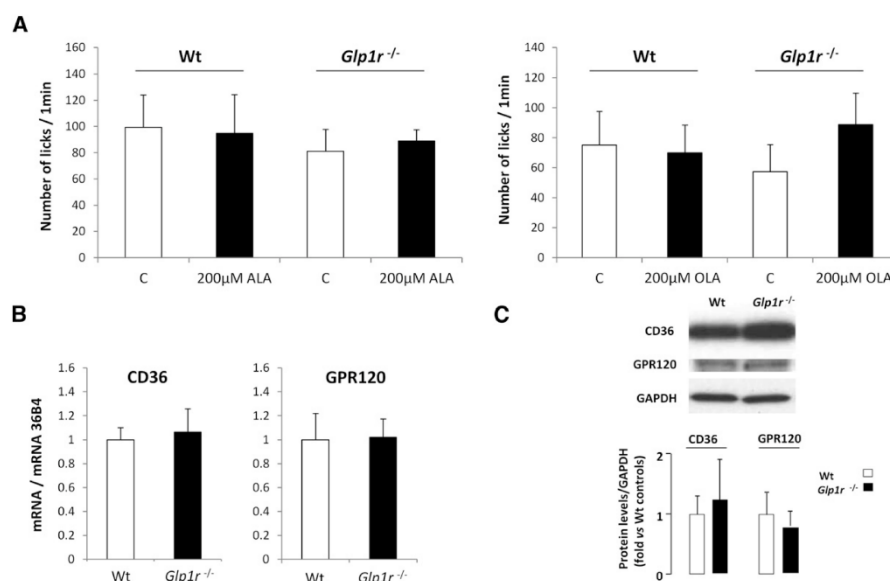


Fig. 2. *Glp1r* gene disruption does not affect gene expression of CD36 and GPR120 in mouse CVP. **A:** Short-term licking tests (1 min) in wild-type (Wt) and *Glp1r*^{-/-} mice subjected to a control solution or a 200 μM ALA or OLA solution. Mean ± SEM (n = 11–13). **B:** CD36 and GPR120 mRNA levels assayed by real-time PCR in CVPs from wild-type (Wt) and *Glp1r*^{-/-} mice. Each value corresponds to a pool of total RNA from two mice. Mean ± SEM (n = 6). **C:** CD36 and GPR120 protein levels assayed by Western blotting in CVPs from wild-type (Wt) and *Glp1r*^{-/-} mice. A representative blot corresponding to a pool of total proteins from three mice is shown. Mean ± SEM (n = 2–4).

of 200 μM ALA were performed in *CD36*-null mice. Interestingly, enhanced attraction for sucrose appeared to be independent of expression of the *CD36* gene (Fig. 3C).

GPR120 is involved in the lipid-mediated release of GLP-1 by mouse CVPs

To assess the role of GPR120 in the lipid-mediated activation of GLP-1 signaling in TBCs, freshly isolated mouse CVPs were incubated for 2 h in an oxygenized medium containing anti-DPP4, to prevent GLP-1 degradation, and 200 μM LCFA or 50 μM GSK137647A. This new drug (Fig. 4A) was identified by screening a recombinant GPR120 receptor assay coupled with the calcium imaging as a potent and selective GPR120 agonist in various species (Fig. 4B, C). ALA, which is a potent activator of GPR120 in vitro (14), led to a small but significant rise in active GLP-1 levels in culture medium (2.08 pM ± 0.09 vs. 1.51 pM ± 0.16 in controls without ALA) (data not shown). Because GPR120 is thought to be preferentially a ω3 receptor (23), the effect of ALA on GLP-1 secretion was compared with OLA. As shown in Fig. 5A, addition of ALA and, to a lesser extent, of OLA increased the GLP-1 content of medium. Interestingly, addition of the specific GPR120 agonist GSK137647A fully reproduced the ALA effect, suggesting that GPR120 might be responsible for the LCFA-mediated release of GLP-1 by the mouse CVPs (Fig. 5B).

Disruption of the *Glp1r* gene affects the detection threshold for lipids in the oral cavity

GLP-1 signaling in mouse taste buds modulates sweet-taste sensitivity (16). To determine whether such a regulatory system was also involved in the oro-sensory detection of dietary lipids, wild-type and *Glp1r*^{-/-} mice were subjected to a set of long-term (12 h) two-bottle preference tests using increasing amounts of rapeseed oil, known to contain both OLA and ALA. *Glp1r*^{-/-} mice were unable to detect low concentrations (from 0.02% to 0.5% w/v) of oil, contrary to control animals. However, *Glp1r*^{-/-} mice responded to high-lipid solutions (≥1% w/v) similarly to wild-type mice (Fig. 6A), suggesting that GLP-1 signaling also plays a role in the fatty-taste sensitivity.

It has been previously demonstrated that GLP-1 in TBCs may act on local targets in a paracrine manner (16). To confirm that GLP-1-mediated modulation of the detection threshold for lipids took place in the oral cavity, mice were subjected to a computer-controlled lickometer using a brief access procedure (1 min) to minimize post-ingestive effects. As expected, *Glp1r*-deficient mice failed to detect small quantities of OLA (0.125% = 4.4 mM), but shared similar high licking responses for the 0.5% OLA solution (= 17.7 mM) compared with responses obtained with wild-type mice, suggesting a higher detection threshold for fat in *Glp1r*^{-/-} mice (Fig. 6B).

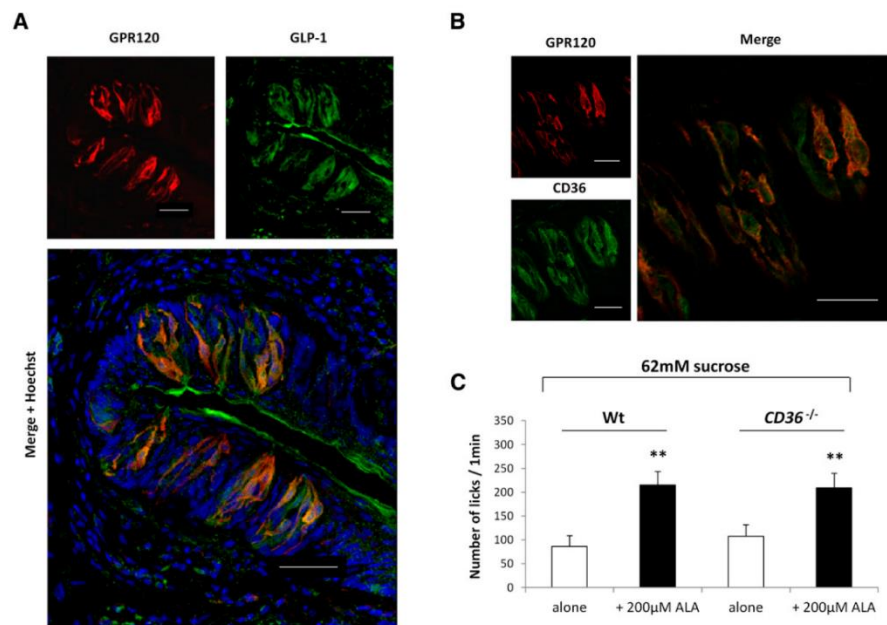


Fig. 3. LCFA-induced sweet-taste sensitivity is independent of the CD36 gene expression. **A:** Immunolocalization of GPR120 and GLP-1 in mouse CVPs. Nuclei were stained by Hoechst's dye. Scale bar is 40 μ m. **B:** Immunolocalization of GPR120 and CD36 in mouse CVPs. Scale bar is 40 μ m. **C:** Short-term licking tests (1 min) in wild-type (Wt) and CD36-null mice subjected to a 62 mM sucrose solution alone or in the presence of 200 μ M ALA. Mean \pm SEM (n = 10). ** $P < 0.01$.

Regulation of lingual CD36 is modulated by GLP-1 signaling

According to previous published data (3, 7, 8), lingual CD36 plays a significant role in the spontaneous preference for fat (Fig. 7A). Indeed, CD36^{-/-} mice failed to detect large quantities of OLA in a textured solution, in contrast to wild-type mice. It has recently been reported in mouse CVPs that CD36 is a lipid-sensitive receptor whom the down-regulation during a meal might lead to progressive sensory-specific satiety for lipid-rich foods (8). The origin of this physiological regulation remains elusive. Because GLP-1 affects the detection threshold for lipids in oral cavity, it was tempting to hypothesize that CD36 expression levels in taste buds might be modulated by the GLP-1 signaling pathway during the postprandial period. To explore this assumption, mice fasted overnight were refed a standard laboratory chow for 2 h, and CD36 expression levels were assayed by Western blotting in wild-type and *Glp1r*^{-/-} mouse CVPs. As expected, a 2-fold decrease in lingual CD36 protein levels were found in refed wild-type mice. By contrast, no change was detected in *Glp1r*-null mice (Fig. 7B).

DISCUSSION

The sense of taste informs the organism about the quality of the food before it is ingested, leading to stereotyped eating behavior (e.g., preference or aversion). Taste buds

not only specifically detect tastants responsible for the basic taste modalities, but are also able to modulate gustatory perception in an autocrine or a paracrine manner. This last function, probably related to the body energy balance, is not yet fully understood. A better knowledge of physiological mechanisms modulating gustation is required to explain and, perhaps, predict the ingestive decision circuitry. It is a major health challenge, since it can be thought that a dysfunction of this regulatory system might lead to disturbances in eating behavior.

Subsets of taste bud cells synthesize and secrete gastrointestinal hormones known to be controlled by energy nutrients, including lipids, and involved in the regulation of food intake, as GLP-1. The concomitant presence of the receptor for GLP-1 (GLP-1R) in gustatory mucosa (16) suggests that this hormone is locally active and, thus, might directly affect the basic functions in mouse taste buds. Consistent with this assumption, it has been reported that GLP-1 signaling enhances sweet-taste sensitivity (16). Because GLP-1 was found to be colocalized with the sweet-taste receptor subunit TIR3 and α -gustducin in a subset of type II TBCs in mouse CVPs, it was concluded that GLP-1-positive cells are probably sweet sensitive (16). Data reported herein confirm that the knock-out of the *Glp1r* gene decreases the attraction for sucrose in the mouse. We show that it is not elicited by changes in the expression of key genes encoding for sweet-taste transduction molecules,

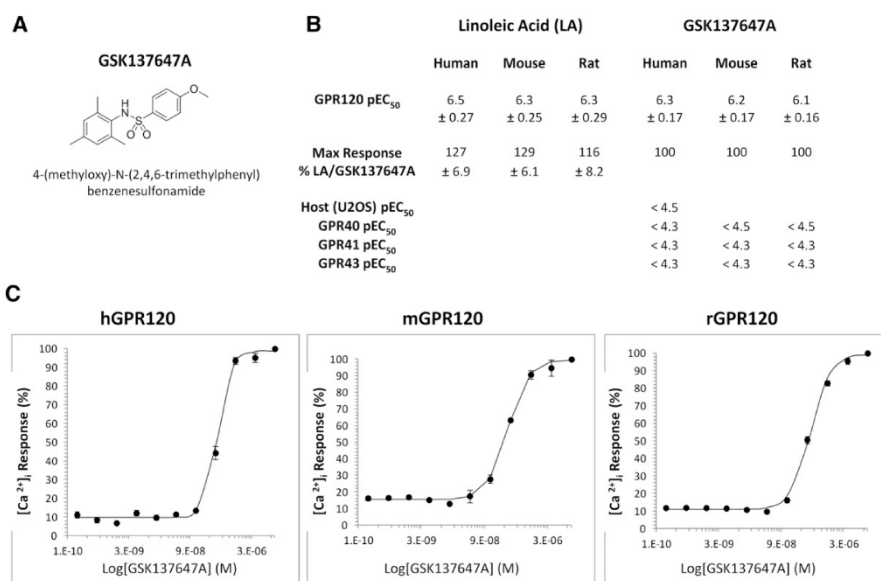


Fig. 4. Identification of a selective GPR120 agonist. A: Formula of the specific GPR120 agonist GSK137647A. B: In vitro potency (pEC₅₀) and efficacy (max response) of GPR120 agonists linoleic acid (LA) and GSK137647A for human, mouse, and rat GPR120. C: Calcium-response curves of the GPR120 agonist GSK137647A for human, mouse, and rat GPR120. For B and C, values are means of at least three experiments.

including T1R2 and T1R3 taste receptors, glucose/galactose transporter SGLT-1, α-gustducin, phospholipase C-β2, the receptor for inositol 1,4,5-trisphosphate, or the transient receptor potential M5 channel. Therefore, further investigations will be required to elucidate the involved mechanism.

We also show that attraction for the sucrose solution was reinforced by the presence of ALA or OLA, suggesting the existence of an additive lipid-dependent regulatory system. Such an effect has also been found in the rat (24). In our experiments, this phenomenon occurred while the LCFA concentration used (i.e., 200 μM ≈ 0.005%) was undetectable by the mouse when it was presented alone during licking tests. It is consistent with the results of Yoneda et al. (25) showing that mice are unable to properly detect 0.01% LCFA (ALA, OLA, or linoleic acid) during short-term behavioral tests. Therefore, the change in perceived

intensity of sweet taste may not be attributed to addition of sucrose and LCFA effects. Interestingly, we have found that salient impact of ALA or OLA was abolished in *Glp1r*-null mice, bringing the first demonstration that dietary lipids affect the perception threshold of sucrose via the GLP-1 signaling pathway. Because CD36 and GPR120 are lipid sensors expressed in the gustatory epithelium, their implication in this regulation was possible. A role of CD36 seems unlikely because *CD36*-null mice display a similar attraction for fat-sweet mixture as control mice during short-term licking tests. By contrast, several observations are in favor of an implication of GPR120. First, GPR120 and GLP-1 are found to be colocalized in subsets of TBCs in mouse CVPs. This observation correlated quite well with the fact that GPR120 (11, 26) and GLP-1 (16) are mainly expressed in type II TBCs in the mouse. Second, using an original ex-vivo approach maintaining the morphological

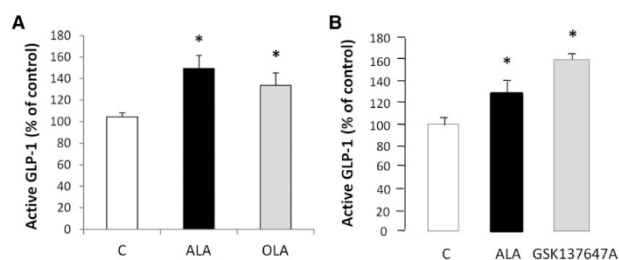


Fig. 5. LCFA and the selective GPR120 agonist GSK137647A induce active GLP-1 release by mouse CVPs. A: GLP-1 release by freshly isolated CVPs incubated in the presence of 33 μM BSA alone (C, control) or with 200 μM ALA or 200 μM OLA. Each value corresponds to the GLP-1 released by a pool of CVP from three mice. Mean ± SEM (n = 3–4). * *P* < 0.05. B: GLP-1 release by freshly isolated CVPs incubated in the presence of 33 μM BSA alone (C, control) or with 200 μM ALA or 50 μM of the specific GPR120 agonist GSK137647A. Each value corresponds to the GLP-1 released by a pool of CVPs from three mice. Mean ± SEM (n = 3). * *P* < 0.05.

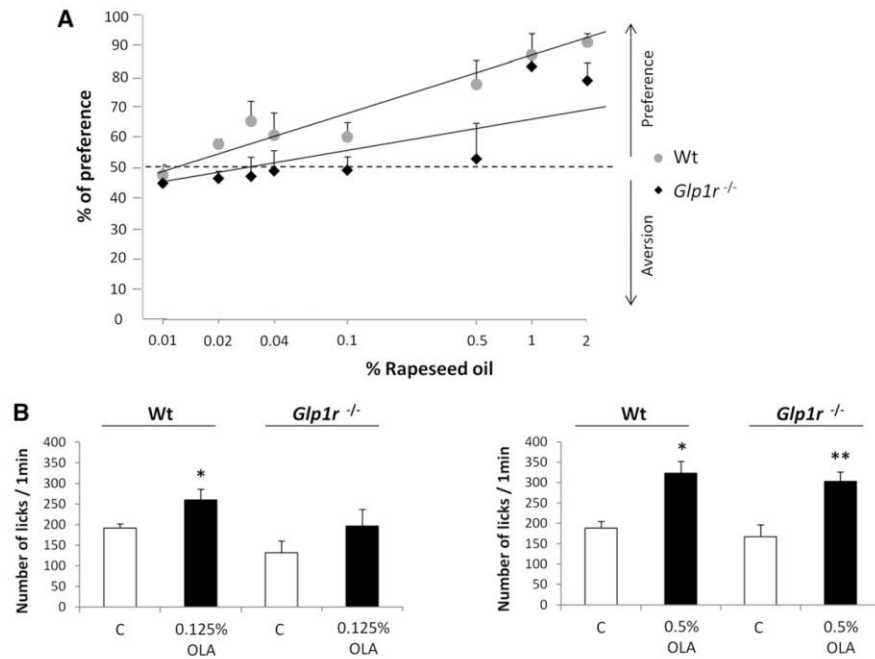


Fig. 6. Disruption of the *Glp1r* gene affects the lipid detection threshold in the mouse. A: Long-term two-bottle preference tests (12 h) in wild-type (Wt) and *Glp1r*^{-/-} mice subjected to control solution (0.3% xanthan gum in water) and growing levels of rapeseed oil (0.01–2%) in 0.3% xanthan gum. Xanthan gum was used to minimize textural cues and to emulsify rapeseed oil. Mean ± SEM (n = 10–12). Dotted line represents a lack of preference. B: Short-term licking tests (1 min) in wild-type (Wt) and *Glp1r*^{-/-} mice subjected to a control solution (mineral oil) and 0.125 or 0.5% OLA in mineral oil. Mean ± SEM (n = 11–20). * *P* < 0.05; ** *P* < 0.01.

and functional integrity of taste buds, we found that LCFAs lead to GLP-1 release by mouse CVPs. ALA, which is known to be a potent activator of the GPR120 receptor (14), appears to be a stronger GLP-1 secretagogue than OLA. Third,

use of the specific GPR120 agonist GSK137647A reproduces the secretion of active GLP-1 mediated by LCFAs, especially ALA. Because LCFA, GPR120, and GLP-1 are functionally linked in the entero-endocrine L cells in the

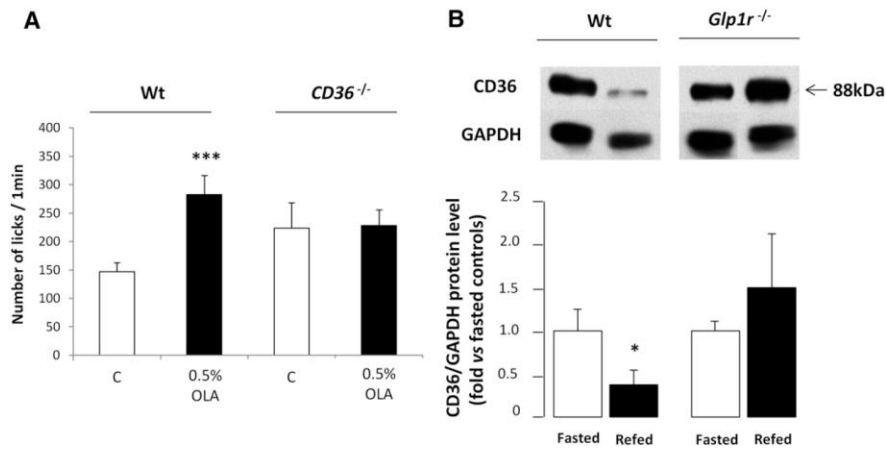


Fig. 7. Regulation of lingual CD36 is modulated by GLP-1 signaling. A: Short-term licking tests (1 min) in wild-type (Wt) and *CD36*^{-/-} mice subjected to a control solution (mineral oil) and 0.5% OLA in mineral oil. Mean ± SEM (n = 7). *** *P* < 0.001. B: CD36 protein levels determined by Western blotting in CVPs from wild-type (Wt) or *Glp1r*^{-/-} mice fasted overnight or refed ad libitum with a standard laboratory chow for 2 h. Each point corresponds to a pool of total proteins from three to four mice. Mean ± SEM (n = 4). * *P* < 0.05.



gut (14), these results suggest that the activation of lingual GPR120 by LCFAs might induce the release of GLP-1 by TBCs, increasing the attraction for sucrose. This original function for the sense of taste does not exclude a direct implication of GPR120 in the oro-sensory perception of dietary lipids, as proposed by Damak and collaborators (11). Indeed, it is thought that the glucose sensor T1R3 plays a role in both sweet-taste perception and hormone secretion (27, 28).

GLP-1 signaling also appears to be involved in the oro-sensory perception of dietary fat. Invalidation of the *Glp1r* gene leads to a significant reduction of sensitivity to rapeseed oil in long term (12 h) two-bottle preference tests. Although the preference threshold for oil was 0.02% in age-matched wild-type controls, it was up to 0.5% in *Glp1r*^{-/-} mice. Mechanisms responsible for this eating behavior mainly take place in the oral cavity. Indeed, similar data were reproduced when wild-type controls and *Glp1r*-null mice were tested with a computer-controlled lickometer using a brief-access procedure (1 min) known to minimize postingestive cues. We have recently reported that the CD36 protein level in mouse CVPs is subjected to a short-term down-regulation during food intake, contrary to GPR120 (8). It is a very sensitive regulation strictly dependent on the presence of lipid in the diet. Interestingly, direct oil deposition onto the tongue is sufficient to trigger the decrease of CD36 protein in CVP, confirming a local regulation (8). However, the underlying mechanism(s) remain poorly understood. Data reported here demonstrate that GLP-1 signaling plays a significant role in this regulation. Indeed, no decrease in CD36 protein level was observed in CVPs from refed *Glp1r*-null mice, contrary to wild-type animals. As reported for numerous surface receptors, this negative feedback might constitute a desensitization system during persistent exposure to dietary lipids. Consistent with this assumption, the postprandial down-regulation of CD36 in CVPs seems to be sufficient to affect the motivation for fat during a meal, initially high and then gradually decreasing secondary to food intake (8). Therefore, it is tempting to speculate that the lower attraction for fat found in *Glp1r*^{-/-} mice is related to a dysfunction in the GLP-1 regulatory loop controlling CD36 protein level in CVPs.

The existence of physiological links between oro-sensory perception of lipids, selection of energy-dense foods, and obesity risk is gradually emerging. An inverse correlation between peripheral gustatory sensitivity to PUFAs and preference for lipid-rich foods has been reported in rats (29). In healthy humans, hypersensitivity to lipids seems to be associated with lower energy consumption, fat intake, and body mass index (30). This phenomenon might be related to lipid sensors found in taste buds. The fact that a common genetic polymorphism leading to the reduction of CD36 gene expression produces an attenuation of oro-sensory sensitivity for fat in humans (10) is consistent with this assumption. Studies have also shown synergy between oral fat sensitivity and attraction for sucrose in rodents. The ability of unsaturated LCFAs to inhibit the delayed-rectifying K⁺ channels in rat TBCs has been the first

mechanism identified (31). Indeed, lipid-mediated cellular depolarization added to that triggered by sucrose should increase the sweet-taste perception (24). Present data highlight an alternative mechanism suggesting the involvement of GLP-1 signaling. The relative physiological importance of these two mechanisms remains to be established.

In conclusion, our data support the existence of a functional link between unsaturated LCFAs including ω 3, GPR120, and the secretion of GLP-1 by mouse CVP. This system, reminiscent of what happens in the entero-endocrine L cells, modulates the sensitivity thresholds for energy-dense nutrients (sucrose and LCFA). For lipids, it appears to be implicated in a regulatory loop targeting CD36. Because change of CD36 protein level in CVPs modulates the motivation for fat during a meal (8), this LCFA/GPR120/GLP-1 axis might play a significant role in the sensory-specific satiety for lipids. Therefore, it is tempting to speculate that a dysfunction of this regulatory loop might lead to an increased motivation to obtain high-fat foods. A better understanding of the molecular mechanisms responsible for lipid sensing in the gustatory papillae and of their physiological impact on eating behavior should allow the development of new therapeutic and nutritional strategies for mitigating excess food intake and limiting obesity risk. ■

REFERENCES

1. Fukuwatari, T., K. Shibata, K. Iguchi, T. Saeki, A. Iwata, K. Tani, E. Sugimoto, and T. Fushiki. 2003. Role of gustation in the recognition of oleate and triolein in anosmic rats. *Physiol. Behav.* **78**: 579–583.
2. Chale-Rush, A., J. R. Burgess, and R. D. Mattes. 2007. Evidence for human orosensory (taste?) sensitivity to free fatty acids. *Chem. Senses.* **32**: 423–431.
3. Laugerette, F., P. Passilly-Degrace, B. Patris, I. Niot, M. Febbraio, J. P. Montmayeur, and P. Besnard. 2005. CD36 involvement in orosensory detection of dietary lipids, spontaneous fat preference, and digestive secretions. *J. Clin. Invest.* **115**: 3177–3184.
4. Baillie, A. G., C. T. Coburn, and N. A. Abumrad. 1996. Reversible binding of long-chain fatty acids to purified FAT, the adipose CD36 homologue. *J. Membr. Biol.* **153**: 75–81.
5. Fukuwatari, T., T. Kawada, M. Tsuruta, T. Hiraoka, T. Iwanaga, E. Sugimoto, and T. Fushiki. 1997. Expression of the putative membrane fatty acid transporter (FAT) in taste buds of the circumvallate papillae in rats. *FEBS Lett.* **414**: 461–464.
6. Simons, P. J., J. A. Kummer, J. J. Luiken, and L. Boon. 2011. Apical CD36 immunolocalization in human and porcine taste buds from circumvallate and foliate papillae. *Acta Histochem.* **113**: 839–843.
7. Scalfani, A., K. Ackroff, and N. A. Abumrad. 2007. CD36 gene deletion reduces fat preference and intake but not post-oral fat conditioning in mice. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **293**: R1823–R1832.
8. Martin, C., P. Passilly-Degrace, D. Gaillard, J. F. Merlin, M. Chevrot, and P. Besnard. 2011. The lipid-sensor candidates CD36 and GPR120 are differentially regulated by dietary lipids in mouse taste buds: impact on spontaneous fat preference. *PLoS ONE.* **6**: e24014.
9. Love-Gregory, L., R. Sherva, T. Schappe, J. S. Qi, J. McCrea, S. Klein, M. A. Connelly, and N. A. Abumrad. 2011. Common CD36 SNPs reduce protein expression and may contribute to a protective atherogenic profile. *Hum. Mol. Genet.* **20**: 193–201.
10. Pepino, M. Y., L. Love-Gregory, S. Klein, and N. A. Abumrad. 2012. The fatty acid translocase gene, CD36, and lingual lipase influence oral sensitivity to fat in obese subjects. *J. Lipid Res.* **53**: 561–566.
11. Cartoni, C., K. Yasumatsu, T. Ohkuri, N. Shigemura, R. Yoshida, N. Godinot, J. le Coultre, Y. Ninomiya, and S. Damak. 2010. Taste



- preference for fatty acids is mediated by GPR40 and GPR120. *J. Neurosci.* **30**: 8376–8382.
12. Matsumura, S., T. Mizushige, T. Yoneda, T. Iwanaga, S. Tsuzuki, K. Inoue, and T. Fushiki. 2007. GPR expression in the rat taste bud relating to fatty acid sensing. *Biomed. Res.* **28**: 49–55.
 13. Galindo, M. M., N. Voigt, J. Stein, J. van Lengerich, J. D. Raguse, T. Hofmann, W. Meyerhof, and M. Behrens. 2012. G protein-coupled receptors in human fat taste perception. *Chem. Senses.* **37**: 123–139.
 14. Hirasawa, A., K. Tsumaya, T. Awaji, S. Katsuma, T. Adachi, M. Yamada, Y. Sugimoto, S. Miyazaki, and G. Tsujimoto. 2005. Free fatty acids regulate gut incretin glucagon-like peptide-1 secretion through GPR120. *Nat. Med.* **11**: 90–94.
 15. Baggio, L. L., and D. J. Drucker. 2007. Biology of incretins: GLP-1 and GIP. *Gastroenterology.* **132**: 2131–2157.
 16. Shin, Y. K., B. Martin, E. Golden, C. D. Dotson, S. Maudsley, W. Kim, H. J. Jang, M. P. Mattson, D. J. Drucker, J. M. Egan, et al. 2008. Modulation of taste sensitivity by GLP-1 signaling. *J. Neurochem.* **106**: 455–463.
 17. Febbraio, M., N. A. Abumrad, D. P. Hajar, K. Sharma, W. Cheng, S. F. Pearce, and R. L. Silverstein. 1999. A null mutation in murine CD36 reveals an important role in fatty acid and lipoprotein metabolism. *J. Biol. Chem.* **274**: 19055–19062.
 18. Scrocchi, L. A., T. J. Brown, N. MaClusky, P. L. Brubaker, A. B. Auerbach, A. L. Joyner, and D. J. Drucker. 1996. Glucose intolerance but normal satiety in mice with a null mutation in the glucagon-like peptide 1 receptor gene. *Nat. Med.* **2**: 1254–1258.
 19. Condreay, J. P., S. M. Witherspoon, W. C. Clay, and T. A. Kost. 1999. Transient and stable gene expression in mammalian cells transduced with a recombinant baculovirus vector. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **96**: 127–132.
 20. Livak, K. J., and T. D. Schmittgen. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-delta delta C(T)) method. *Methods.* **25**: 402–408.
 21. Jang, H. J., Z. Kokrashvili, M. J. Theodorakis, O. D. Carlson, B. J. Kim, J. Zhou, H. H. Kim, X. Xu, S. L. Chan, M. Juhaszova, et al. 2007. Gut-expressed gustducin and taste receptors regulate secretion of glucagon-like peptide-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **104**: 15069–15074.
 22. Feng, X. H., X. M. Liu, L. H. Zhou, J. Wang, and G. D. Liu. 2008. Expression of glucagon-like peptide-1 in the taste buds of rat circumvallate papillae. *Acta Histochem.* **110**: 151–154.
 23. Oh, D. Y., S. Talukdar, E. J. Bae, T. Imamura, H. Morinaga, W. Fan, P. Li, W. J. Lu, S. M. Watkins, and J. M. Olefsky. 2010. GPR120 is an omega-3 fatty acid receptor mediating potent anti-inflammatory and insulin-sensitizing effects. *Cell.* **142**: 687–698.
 24. Pittman, D. W., C. E. Labban, A. A. Anderson, and H. E. O'Connor. 2006. Linoleic and oleic acids alter the licking responses to sweet, salt, sour, and bitter tastants in rats. *Chem. Senses.* **31**: 835–843.
 25. Yoneda, T., K. Saitou, H. Asano, T. Mizushige, S. Matsumura, A. Eguchi, Y. Manabe, S. Tsuzuki, K. Inoue, and T. Fushiki. 2009. Assessing palatability of long-chain fatty acids from the licking behavior of BALB/c mice. *Physiol. Behav.* **96**: 735–741.
 26. Matsumura, S., A. Eguchi, T. Mizushige, N. Kitabayashi, S. Tsuzuki, K. Inoue, and T. Fushiki. 2009. Colocalization of GPR120 with phospholipase-Cbeta2 and alpha-gustducin in the taste bud cells in mice. *Neurosci. Lett.* **450**: 186–190.
 27. Damak, S., M. Rong, K. Yasumatsu, Z. Kokrashvili, V. Varadarajan, S. Zou, P. Jiang, Y. Ninomiya, and R. F. Margolskee. 2003. Detection of sweet and umami taste in the absence of taste receptor T1r3. *Science.* **301**: 850–853.
 28. Kokrashvili, Z., B. Mosinger, and R. F. Margolskee. 2009. T1R3 and alpha gustducin in gut regulate secretion of glucagon-like peptide 1. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1170**: 91–94.
 29. Gilbertson, T. A., L. Liu, D. A. York, and G. A. Bray. 1998. Dietary fat preferences are inversely correlated with peripheral gustatory fatty acid sensitivity. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **855**: 165–168.
 30. Stewart, J. E., C. Feinle-Bisset, M. Golding, C. Delahunty, P. M. Clifton, and R. S. Keast. 2010. Oral sensitivity to fatty acids, food consumption and BMI in human subjects. *Br. J. Nutr.* **104**: 145–152.
 31. Gilbertson, T. A., D. T. Fontenot, L. Liu, H. Zhang, and W. T. Monroe. 1997. Fatty acid modulation of K⁺ channels in taste receptor cells: gustatory cues for dietary fat. *Am. J. Physiol.* **272**: C1203–C1210.



Contents lists available at ScienceDirect

Biochimie

journal homepage: www.elsevier.com/locate/biochi

Mini-review

Is the taste of fat regulated?



Patricia Passilly-Degrace, Michael Chevrot, Arnaud Bernard, Déborah Ancel, Céline Martin, Philippe Besnard*

Physiologie de la Nutrition et Toxicologie (NUTox), UMR U866 INSERM/Université de Bourgogne/AgroSup Dijon, AgroSup Dijon, 1, Esplanade Erasme, F-21000 Dijon, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 18 April 2013

Accepted 25 July 2013

Available online 9 August 2013

Keywords:

Gustation
Eating behavior
CD36
Obesity

ABSTRACT

Over the last decade, converging data have been accumulated both in rodents and humans, supporting the existence of a sixth taste modality devoted to the perception of dietary lipids. It is well known that the sense of taste is determinant for the food choice and that the overconsumption of highly palatable energy-dense foods contributes to the current obesity epidemic. Thus, an important issue in terms of Public Health is to understand the mechanisms by which the oro-sensory perception of fat is regulated. An overview of our current knowledge in this field of investigations is proposed in this mini-review.

© 2013 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

1. Introduction

Obesity reaches epidemic levels in the world. By reason of deleterious effects of obesity-associated diseases (i.e. type 2 diabetes, vascular disorders, hypertension, cancers), it is one of the major public health challenges of the 21st century. Origin of this epidemic is clearly multifactorial. Nevertheless, availability of highly palatable energy-dense foods rich in fat and sugar seems to play a significant role in this phenomenon by changing our eating habits. Although hedonic reward value of foods is closely linked to the sense of taste which constitutes a driving force leading to preferential consumption of high palatable foodstuffs, putative involvement of gustation in the obesity risk remains largely neglected. Four primary taste modalities (sweet, salty, bitter and sour) were initially described, to which *umami* was recently added. Over the last decade, compelling evidences were accumulated supporting the implication of a taste component in the oro-sensory detection of dietary lipids, in addition to textural and olfactory cues [1,2]. Interestingly, a correlation between sensitivity of the oral lipid

detection system and attraction for fatty foods has been recently reported [3]. Therefore, it can be thought that the efficiency of the “taste of fat” might influence the food choice and, thereby, the energy balance. This assumption raises possibility that a dysfunction of this oral lipid sensing system might influence the eating behavior and, thereby, contribute to the obesity risk. The goal of this mini-review is to provide an overview on our current knowledge about the regulation of the system responsible for the oro-sensory detection of lipids by attempting to answer a basic question: Is the fat taste regulated?

2. The fat taste paradigm

Taste perception is mediated by taste receptor cells (TRC), which are clustered in taste buds, a specialized onion-shaped structure. Mammalian taste bud cells are classified into four subsets (type I, II, III and IV) in function of their structural and functional characteristics [4]. In the lingual epithelium, taste buds are located in three types of gustatory papillae (i.e. fungiform, foliate and circumvallate) and establish synaptic contacts with afferent fibers of chorda tympani and glossopharyngeal nerves (VIIth and IXth cranial nerves, respectively). These nerves transfer the gustatory signals to the brain and digestive tract *via* the nucleus of solitary tract (NST) in the brainstem leading to adaptations in eating behavior and digestive function (Fig. 1). The chemoreception of tastants takes place in the apical side of the TRC.

According to the recent proposition of Richard Mattes from Purdue University (USA) concerning the minimal elements required to constitute a primary taste quality (i.e. effective

Abbreviations: AEA, endocannabinoid anandamide; CCK, cholecystokinin; CVP, circumvallate papillae; DIO, diet-induced obesity; GLP-1, glucagon-like peptide-1; *Glp1-r*, GLP-1 receptor; GPCR, G protein-coupled receptors; LCFA, long-chain fatty acids; NPY, neuropeptide Y; NST, nucleus of solitary tract; PPY, pancreatic polypeptide; PYY, peptide YY; TRC, taste receptor cells; VIP, vasoactive intestinal peptide.

* Corresponding author. Tel./fax: +33 380 77 40 91.

E-mail address: pbsnard@u-bourgogne.fr (P. Besnard).

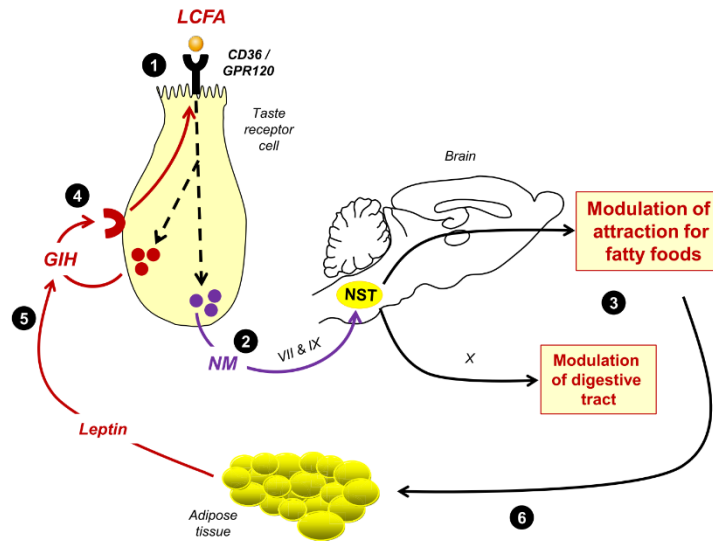


Fig. 1. Regulation of the taste of fat: working model. (1) Interaction between a long-chain fatty acid (LCFA) and lipid sensors (CD36 and/or GPR120) located at the apical side of the taste bud cell triggers a signaling cascade leading to the release of neuromediators (NM) and gastro-intestinal hormones (GIH). (2) The lipid signal is transmitted to the nucleus of solitary tract (NST) via the gustatory nerves (VII = chorda tympani, IX = glossopharyngeal nerve). (3) Integration of the lipid signal by the brain modulates the attraction for fatty foods. A transfer of the lipid signal towards the digestive tract (X = vagus nerve) also occurs via a reflex loop (tongue/NST/periphery axis) and generates digestive secretions preparing the body to lipid incoming. (4) Gastro-intestinal hormones (GIH) release by the taste bud cells stimulated by LCFA can act locally in an autocrine and/or paracrine manner to regulate the function of lipid receptors (CD36/GPR120). (5) Regulation by peripheral mediators: example of the leptin. (6) Obesity, by increasing the plasma leptin levels, leads to a decrease in the sensitivity to fat taste. This event might lead to an overconsumption of lipid-rich foods to reach a hedonic fulfillment inducing a vicious circle promoting obesity.

stimulus, specific reception and signaling, involvement of gustatory pathway, physiological impacts, and identifiable sensation [5]), it appears that "Fat" might be eligible. Indeed, long-chain fatty acids (LCFA) have been shown to be the effective stimuli in both human and rodents [1,2,6,7]. It is noteworthy that LCFA can be efficiently released from triglycerides (TG) by the lingual lipase in these species [8,9]. Chemoreception of free LCFA is elicited by lipid-binding proteins specifically expressed in TRC, such as CD36 and GPR120. The glycoprotein CD36, which belongs to the scavenger receptors family, was the first to be identified in TRC in rodents [10,11] and more recently in humans [12]. In the mouse, the binding of LCFA to lingual CD36 triggers the activation of a specific transduction system leading to the secretion of neurotransmitters previously stored in TRC [13,14] (Fig. 1-1). This event produces a specific signal conveyed by peripheral and central nervous system involved in the gustatory pathway [15] (Fig. 1-2). From a physiological point of view, lingual CD36 was shown to contribute to the preference for fat in mice and human [9,10]. It also participates to the digestive anticipation preparing the body to the fat incoming. This phenomenon, which takes place through a reflex loop (tongue/brainstem/periphery axis) involving the NST, results in early secretion of digestive enzymes (e.g. lipases) and hormones (e.g. cholecystokinin (CKK), pancreatic polypeptide Y (PPY), peptide YY (PYY), insulin) [5,16] known to play a role in feeding behavior (Fig. 1-3). Another LCFA receptor, GPR120 has recently been identified in TRC in mice [17] and humans [18]. This member of the G protein-coupled receptors (GPCR) family also plays a significant role in the generation of fat preference since GPR120-null mice are unable to detect properly an oily source during behavioral test [17]. Nevertheless, the respective roles of CD36 and GPR120 in TRC remain to be elucidated. The implication of the free fatty acid

receptor 1 (FFAR1, also termed GPR40) is more questionable. Albeit, it was reported to be involved in the spontaneous preference for fat in the mouse [17] GPR40 mRNA seem lacking in CVP in different species including rat [19], mouse [20] and human [18]. Origin of this discrepancy remains to be elucidated. Finally, albeit LCFA can be discriminated in the oral cavity when non-gustatory cues are eliminated in humans, sensation is non-easily identifiable, a clear lexicon being lacking [5]. "Fat" is similar to *umami*, in this regard. Despite of this limitation, a body of evidences is consistent with the implication of the sense of taste in the oro-sensory perception of lipids.

To these six minimal elements required to define a primary taste quality must be added a seventh: be flexible. Indeed, if this sensory property plays significant physiological functions, it must be tightly regulated.

3. Modulation of fat taste sensitivity

How lingual CD36 might be regulated? To answer this basic question, we postulated that CD36 expressed in taste buds might share similar regulatory pathways with intestinal CD36.

3.1. Lipid-mediated regulation

Consistent with this assumption, an adaptation of the oral lipid sensing system in function of the lipid content of diet was suspected. Indeed, it was previously shown a lipid-mediated down-regulation of CD36 in intestinal cells [21]. As expected, CD36 protein level in circumvallate papillae (CVP) displays a diurnal rhythm with a down-regulation during the dark period corresponding to the food intake. This phenomenon is strictly dependent on the

presence of lipid in the diet [22]. It takes place mainly at the oral level since a direct oil deposition onto the tongue is sufficient to trigger the drop of CD36 protein in CVP [22]. As reported for numerous surface receptors, this negative feedback might constitute a desensitization system during persistent exposure to dietary lipids. Interestingly, the magnitude of the CD36 drop in the CVP seems sufficient to induce a decrease in the preference for lipids [22]. Therefore, it is tempting to speculate that this change might modulate the motivation for fat during a meal, initially high and then gradually decreasing during the food intake. This physiological negative feedback is reminiscent of sensory-specific satiety which refers to a temporary decline in pleasure derived from consuming a certain food in comparison to other unconsumed foods [23]. In humans, a similar regulation might exist since the oral sensitivity to fat is decreased after 4-weeks on a high-fat diet [24] and a genetic variant decreasing the CD36 expression levels is associated with a lower oral sensitivity to lipids [9].

In contrast to CD36, the GPR120 protein levels in mouse CVP appear to be insensitive to the lipid content of the diet [22]. This differential regulation strongly suggests that these two lipid sensors may exert different, but likely complementary, functions in CVP.

3.2. Endocrine regulation

Recent studies have revealed that fat and sweet taste sensitivities are modulated by hormones. Some of them and their cognate receptors are produced by taste buds [25–31] suggesting that they are locally active and, thus, might directly affect the basic functions of taste buds in an autocrine and/or paracrine manner. A regulation by hormones from periphery is also likely.

3.2.1. Taste buds are endocrine tissue

Numerous gastro-intestinal hormones, known to regulate both the digestive tract (i.e. motility, secretions) and the appetite, such as GLP-1, CCK, neuropeptide Y (NPY), vasoactive intestinal peptide (VIP) and ghrelin are produced by the gustatory papillae, as well as their respective receptors (Table 1).

Among these hormones, GLP-1 has been especially studied. This multifunctional hormone [32] is expressed on subsets of Type II and Type III taste cells, known to support the gustatory function, whereas its receptor is expressed on afferent gustatory nerves [25]. LCFA lead to the release of GLP-1 in freshly isolated mouse CVP [33]. As demonstrated in the entero-endocrine cells [34], this event seems to be dependent of the activation of lingual GPR120 by LCFA [33]. The fact that sweet and *umami* tastes are modulated by GLP-1 [25,35] and sweet taste sensitivity is enhanced by LCFA via the GLP-1 signaling pathway [33] raised the question of a possible role of

GLP-1 on “fat taste” sensitivity. To address this issue, behavioral experiments were conducted using mice in which the GLP-1 receptor (*Glp1-r*) was lacking. Interestingly, these mice displayed a lower sensitivity to oily solution [33]. This effect is likely related to the disappearance, in *Glp1-r*-null mice, of the down-regulation of CD36 protein levels normally triggered by LCFA in TRC [33]. This finding provides the first evidence that GLP-1 regulates the signaling cascade controlling “fat taste” sensitivity, via CD36 which is expressed in taste buds. This regulatory loop (i.e. LCFA/GPR120/GLP-1/CD36/sensitivity to lipids), which occurs locally, might be reinforced by GLP-1 produced elsewhere (Fig. 1–4).

Putative regulatory functions of other hormones expressed in taste buds on fat perception remain to be explored.

3.2.2. Regulation by peripheral mediators

Although leptin and endocannabinoids are not expressed in taste buds, the presence of their cognate receptors on the surface of TRC [36] suggests that these mediators also exert regulatory functions in gustatory papillae. Leptin is an anorexigenic hormone primarily produced in adipocytes. It regulates food intake, energy expenditure and, thereby, body mass by acting on hypothalamic receptors and, to a lesser extent, on few peripheral organs including gustatory papillae. To date, there are no published data concerning leptin or endocannabinoids associated with fat taste. However, it has been reported that circulating leptin act as a negative modulator for sweet taste [36] which is, like fat taste, a gustatory modality involved in the detection of energy-dense foods. Since plasma leptin levels are positively correlated to fat mass, it is likely that this endocrine profile contribute to the degradation of sweet taste sensitivity observed in obese subject [37] (Fig. 1–5). By contrast, the endocannabinoid anandamide (AEA) is an orexigenic mediator which enhances the sweet taste sensitivity by binding to CB1 receptor which is found in TRC [38]. By analogy, a regulation of fat taste by leptin and endocannabinoids might also exist. Consistent with this assumption, preliminary data from our laboratory strongly suggest that the preference for oily solution is changed in ob/ob mice in which leptin is lacking.

In brief, further studies are required to fully understand the specific roles played by each of the modulators (hormones and others) in the physiology of taste buds and the regulation of taste sensitivity. Already, “fatty” and sweet taste sensitivities appear to be tightly controlled parameters. The balance between positive and negative modulators is likely to be determinant for the homeostatic regulation of the taste sensitivity and an adequate adaptation of eating behavior (e.g. choice of food) to the real-time requirements of the body. Therefore, it can be thought that a dysregulation of this homeostatic system might induce dietary changes by impacting the body weight.

4. Obesity and gustation

Given obesity epidemics, an important issue is to determine if obesity itself leads to changes in the oro-sensory perception of dietary fat.

4.1. Obesity alters the taste sensitivity

It has been recently reported using a 3-alternative forced choice protocol that detection thresholds for an LCFA were greater (=lower sensitivity) in obese than in lean subjects, suggesting that oral fat sensitivity is compromised in obesity [39]. Moreover, over-consumption of dietary fat has been linked to obesity [40]. Obese people prefer foods with higher fat content [41] and consume more fat than lean individuals [42]. Finally, oral sensitivity to LCFA seems to be inversely associated with dietary fat consumption in humans

Table 1
Location of hormones and their receptors in the different types of taste buds cells.

	Type I	Type II	Type III	Type IV	Nerve fibers	References
GLP-1		X	X			[25]
GLP-1 receptor			X		X	[25]
CCK		X				[26]
CCK receptor (CCK-1)		X				[27]
NPY		X				[28]
NPY receptor (YRs)		X	X	X	X	[29]
VIP		X				[26]
VIP (VPAC1, VPAC2) receptor		X				[30]
Ghrelin	X	X	X	X		[31]
Ghrelin receptor	X	X	X	X		[31]
Leptin receptor (Ob-Rh)		X				[36]

[39]. In obesity, fat taste sensitivity might be attenuated, predisposing individuals to increased consumption of foods containing greater concentration of fat [3,39]. Therefore, it was tempting to speculate that a lower sensitivity to lipids related to obesity might be associated with an overconsumption of fatty foods [3]. Such a change in eating behavior might be required to reach a hedonic fulfillment in individuals poorly sensitive to LCFA. Consistent with this idea, a weakened activation in reward circuit after the ingestion of energy-dense foods in obese subjects is observed [43]. Therefore, a dysregulation in the peripheral and central taste circuitry devoted to lipid sensing might elicit a vicious circle promoting obesity (Fig. 1–6). Further experiments are required to verify this hypothesis.

Obesity-related decrease in LCFA sensitivity seems to exist also in rodents. Diet-induced obesity (DIO) shifts sucrose and corn oil preference towards higher concentrations as compared to lean controls in rats [44]. By using a combination of biochemical, physiological and behavioral approaches, we found that (i) the attraction for lipids is also decreased in obese mice, (ii) this behavioral change takes place at the oro-sensory levels and (iii) the CD36-dependent signaling cascade controlling the intracellular calcium levels ($[Ca^{2+}]_i$) in taste bud cells is decreased in obese mice [45]. Because lingual CD36 is involved in the preference for fat, such a dysfunction might contribute to the lower attraction for oily solution found in these DIO mice (unpublished data).

Thus, the oro-sensory perception of dietary lipids is degraded during obesity both in human and rodents. But, what happens when there is a weight loss?

4.2. Role of fat mass

Induced weight loss by caloric restriction or bariatric surgery in humans and rodents demonstrates that alterations in the fat (and sweet) taste responsiveness are reversible [46,47]. In obese subjects, dietary restriction reduced the spontaneous consumption of foods high in fat and/or sugar [48], while patients with a gastric bypass find fatty (and sweet) meals less pleasant [47]. Animal studies yield similar observations. Reversibility of obesity-associated alterations of oro-sensory perceptions of fat and sweet during weight loss indicates that the size of fat mass plays a significant role in the regulation of these taste modalities in rodents [45,46]. For instance, an inverse correlation between fat preference and adipose tissue size was found by using calorie-restricted DIO mice [45]. An endocrine influence is likely. Consistent with this assumption, the increase in sweet taste sensitivity observed during weight loss in obese women appears to be correlated with the decrease in plasma leptin levels [37]. In rodents, the increased detection threshold (= lower sensitivity) for corn oil or sucrose found in obese rats is reproduced by exogenous leptin administration in weight-reduced animals [44]. Other alternative, but non-exclusive, influences related to adiposity must be explored, including obesity-induced inflammation. Indeed, lipopolysaccharide-induced inflammation disturbs the physiology of gustatory papillae [49].

5. Conclusion

The taste of fat appears to be highly regulated in mammals. The link between taste modalities allowing the perception of high palatable energy-dense foods and obesity is an important issue. It appears to be reciprocal since overconsumption of energy-dense foods promotes obesity which, in turn, disturbs sensitivity and hedonic response to taste. A better understanding of regulatory loops controlling the function of lipid receptors expressed in taste buds and the subsequent gustatory pathway might open novel avenues in the pharmacological and/or nutritional treatment of obesity.

Acknowledgments

This work was supported by the Burgundy Council and Centre National Interprofessionnel de l'Economie Laitière (CNIEL) (HumanFATaste program to P.B.). M.C. is a PhD fellow of HumanFATaste program. This work was also supported by a French Government grant managed by the National Research Agency (ANR) under the program "Investissements d'Avenir" with reference ANR-11-LABX-0021/LipSTIC Labex.

References

- [1] A. Chale-Rush, J.R. Burgess, R.D. Mattes, Evidence for human orosensory (taste?) sensitivity to free fatty acids, *Chem. Senses* 32 (2007) 423–431.
- [2] R.D. Mattes, Oral detection of short-, medium-, and long-chain free fatty acids in humans, *Chem. Senses* 34 (2009) 145–150.
- [3] J.E. Stewart, C. Feinle-Bisset, M. Golding, C. Delahunty, P.M. Clifton, R.S. Keast, Oral sensitivity to fatty acids, food consumption and BMI in human subjects, *Br. J. Nutr.* 104 (2010) 145–152.
- [4] T.E. Finger, Cell types and lineages in taste buds, *Chem. Senses* 30 (Suppl. 1) (2005) i54–i55.
- [5] R.D. Mattes, Oral fatty acid signaling and intestinal lipid processing: support and supposition, *Physiol. Behav.* 105 (2011) 27–35.
- [6] M. Tsuruta, T. Kawada, T. Fukuwatari, T. Fushiki, The orosensory recognition of long-chain fatty acids in rats, *Physiol. Behav.* 66 (1999) 285–288.
- [7] T. Fukuwatari, K. Shibata, K. Iguchi, T. Saeki, A. Iwata, K. Tani, E. Sugimoto, T. Fushiki, Role of gustation in the recognition of oleate and triolein in anosmic rats, *Physiol. Behav.* 78 (2003) 579–583.
- [8] T. Kawai, T. Fushiki, Importance of lipolysis in oral cavity for orosensory detection of fat, *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 285 (2003) R447–R454.
- [9] M.Y. Pepino, L. Love-Gregory, S. Klein, N.A. Abumrad, The fatty acid translocase gene CD36 and lingual lipase influence oral sensitivity to fat in obese subjects, *J. Lipid Res.* 53 (2012) 561–566.
- [10] F. Laugerette, P. Passilly-Degrace, B. Patris, I. Niot, M. Febbraio, J.P. Montmayeur, P. Besnard, CD36 involvement in orosensory detection of dietary lipids, spontaneous fat preference, and digestive secretions, *J. Clin. Invest.* 115 (2005) 3177–3184.
- [11] T. Fukuwatari, T. Kawada, M. Tsuruta, T. Hiraoka, T. Iwanaga, E. Sugimoto, T. Fushiki, Expression of the putative membrane fatty acid transporter (FAT) in taste buds of the circumvallate papillae in rats, *FEBS Lett.* 414 (1997) 461–464.
- [12] P.J. Simons, J.A. Kummer, J.J. Luiken, L. Boon, Apical CD36 immunolocalization in human and porcine taste buds from circumvallate and foliate papillae, *Acta Histochem.* 113 (2011) 839–843.
- [13] A. El-Yassimi, A. Hichami, P. Besnard, N.A. Khan, Linoleic acid induces calcium signaling, Src kinase phosphorylation, and neurotransmitter release in mouse CD36-positive gustatory cells, *J. Biol. Chem.* 283 (2008) 12949–12959.
- [14] G. Dramane, S. Abdoul-Azize, A. Hichami, T. Vogtle, S. Akpona, C. Chouabe, H. Sadou, B. Nieswandt, P. Besnard, N.A. Khan, STIM1 regulates calcium signaling in taste bud cells and preference for fat in mice, *J. Clin. Invest.* 122 (2012) 2267–2282.
- [15] D. Gaillard, F. Laugerette, N. Darcel, A. El-Yassimi, P. Passilly-Degrace, A. Hichami, N.A. Khan, J.P. Montmayeur, P. Besnard, The gustatory pathway is involved in CD36-mediated orosensory perception of long-chain fatty acids in the mouse, *FASEB J.* 22 (2008) 1458–1468.
- [16] J.E. Stewart, C. Feinle-Bisset, R.S. Keast, Fatty acid detection during food consumption and digestion: Associations with ingestive behavior and obesity, *Prog. Lipid Res.* 50 (2011) 225–233.
- [17] C. Cartoni, K. Yasumatsu, T. Ohkuri, N. Shigemura, R. Yoshida, N. Godinot, J. le Coutre, Y. Ninomiya, S. Damak, Taste preference for fatty acids is mediated by GPR40 and GPR120, *J. Neurosci.* 30 (2010) 8376–8382.
- [18] M.M. Galindo, N. Voigt, J. Stein, J. van Lengerich, J.D. Raguse, T. Hofmann, W. Meyerhof, M. Behrens, G protein-coupled receptors in human fat taste perception, *Chem. Senses* 37 (2012) 123–139.
- [19] S. Matsumura, T. Mizushige, T. Yoneda, T. Iwanaga, S. Tsuzuki, K. Inoue, T. Fushiki, GPR expression in the rat taste bud relating to fatty acid sensing, *Biomed. Res.* 28 (2007) 49–55.
- [20] J.P. Montmayeur, C. Fenech, S. Kusumakshi, F. Laugerette, Z.H. Liu, A. Wiencis, U. Boehm, Screening for G-protein-coupled receptors expressed in mouse taste papillae, *Flavour Fragrance J.* 26 (2011) 223–230.
- [21] T.T. Tran, H. Poirier, L. Clement, F. Nassir, M.M. Pelsers, V. Petit, P. Degrace, M.C. Monnot, J.F. Glatz, N.A. Abumrad, P. Besnard, I. Niot, Luminal lipid regulates CD36 levels and downstream signaling to stimulate chylomicron synthesis, *J. Biol. Chem.* 286 (2011) 25,201–25,210.
- [22] C. Martin, P. Passilly-Degrace, D. Gaillard, J.F. Merlin, M. Chevrot, P. Besnard, The lipid-sensor candidates CD36 and GPR120 are differentially regulated by dietary lipids in mouse taste buds: impact on spontaneous fat preference, *PLoS One* 6 (2011) e24014.
- [23] E.T. Rolls, The neurophysiology of feeding, *Int. J. Obes.* 8 (Suppl. 1) (1984) 139–150.

- [24] J.E. Stewart, R.S. Keast, Recent fat intake modulates fat taste sensitivity in lean and overweight subjects, *Int. J. Obes. (Lond.)* 36 (2012) 834–842.
- [25] Y.K. Shin, B. Martin, E. Golden, C.D. Dotson, S. Maudsley, W. Kim, H.J. Jang, M.P. Mattson, D.J. Drucker, J.M. Egan, S.D. Munger, Modulation of taste sensitivity by GLP-1 signaling, *J. Neurochem.* 106 (2008) 455–463.
- [26] T. Shen, N. Kaya, F.L. Zhao, S.G. Lu, Y. Cao, S. Herness, Co-expression patterns of the neuropeptides vasoactive intestinal peptide and cholecystokinin with the transduction molecules alpha-gustducin and T1R2 in rat taste receptor cells, *Neuroscience* 130 (2005) 229–238.
- [27] S. Herness, F.L. Zhao, N. Kaya, T. Shen, S.G. Lu, Y. Cao, Communication routes within the taste bud by neurotransmitters and neuropeptides, *Chem. Senses* 30 (Suppl. 1) (2005) i37–38.
- [28] F.L. Zhao, T. Shen, N. Kaya, S.G. Lu, Y. Cao, S. Herness, Expression, physiological action, and coexpression patterns of neuropeptide Y in rat taste-bud cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102 (2005) 11100–11105.
- [29] M.D. Hurtado, A. Acosta, P.P. Riveros, B.J. Baum, K. Ukhanov, A.R. Brown, C.D. Dotson, H. Herzog, S. Zolotukhin, Distribution of Y-receptors in murine lingual epithelia, *PLoS One* 7 (2012) e46358.
- [30] B. Martin, Y.K. Shin, C.M. White, S. Ji, W. Kim, O.D. Carlson, J.K. Napora, W. Chadwick, M. Chapter, J.A. Waschek, M.P. Mattson, S. Maudsley, J.M. Egan, Vasoactive intestinal peptide-null mice demonstrate enhanced sweet taste preference, dysglycemia, and reduced taste bud leptin receptor expression, *Diabetes* 59 (2010) 1143–1152.
- [31] Y.K. Shin, B. Martin, W. Kim, C.M. White, S. Ji, Y. Sun, R.G. Smith, J. Sevigny, M.H. Tschop, S. Maudsley, J.M. Egan, Ghrelin is produced in taste cells and ghrelin receptor null mice show reduced taste responsiveness to salty (NaCl) and sour (citric acid) tastants, *PLoS One* 5 (2010) e12729.
- [32] L.L. Baggio, D.J. Drucker, Biology of incretins: GLP-1 and GIP, *Gastroenterology* 132 (2007) 2131–2157.
- [33] C. Martin, P. Passilly-Degrace, M. Chevrot, D. Ancel, S.M. Sparks, D.J. Drucker, P. Besnard, Lipid-mediated release of GLP-1 by mouse taste buds from circumvallate papillae: putative involvement of GPR120 and impact on taste sensitivity, *J. Lipid Res.* 53 (2012) 2256–2265.
- [34] A. Hirasawa, K. Tsumaya, T. Awaji, S. Katsuma, T. Adachi, M. Yamada, Y. Sugimoto, S. Miyazaki, G. Tsujimoto, Free fatty acids regulate gut incretin glucagon-like peptide-1 secretion through GPR120, *Nat. Med.* 11 (2005) 90–94.
- [35] B. Martin, C.D. Dotson, Y.K. Shin, S. Ji, D.J. Drucker, S. Maudsley, S.D. Munger, Modulation of taste sensitivity by GLP-1 signaling in taste buds, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1170 (2009) 98–101.
- [36] K. Kawai, K. Sugimoto, K. Nakashima, H. Miura, Y. Ninomiya, Leptin as a modulator of sweet taste sensitivities in mice, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97 (2000) 11,044–11,049.
- [37] M. Umabiki, K. Tsuzaki, K. Kotani, N. Nagai, Y. Sano, Y. Matsuoka, K. Kitaoka, Y. Okami, N. Sakane, A. Higashi, The improvement of sweet taste sensitivity with decrease in serum leptin levels during weight loss in obese females, *Tohoku J. Exp. Med.* 220 (2010) 267–271.
- [38] R. Yoshida, T. Ohkuri, M. Jyotaki, T. Yasuo, N. Horio, K. Yasumatsu, K. Sanematsu, N. Shigemura, T. Yamamoto, R.F. Margolskee, Y. Ninomiya, Endocannabinoids selectively enhance sweet taste, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107 (2010) 935–939.
- [39] J.E. Stewart, R.V. Seimon, B. Otto, R.S. Keast, P.M. Clifton, C. Feinle-Bisset, Marked differences in gustatory and gastrointestinal sensitivity to oleic acid between lean and obese men, *Am. J. Clin. Nutr.* 93 (2011) 703–711.
- [40] G.A. Bray, B.M. Popkin, Dietary fat intake does affect obesity!, *Am. J. Clin. Nutr.* 68 (1998) 1157–1173.
- [41] A. Drewnowski, Food perceptions and preferences of obese adults: a multi-dimensional approach, *Int. J. Obes.* 9 (1985) 201–212.
- [42] W.C. Miller, A.K. Lindeman, J. Wallace, M. Niederpruem, Diet composition, energy intake, and exercise in relation to body fat in men and women, *Am. J. Clin. Nutr.* 52 (1990) 426–430.
- [43] E. Stice, S. Spoor, C. Bohon, M.G. Veldhuizen, D.M. Small, Relation of reward from food intake and anticipated food intake to obesity: a functional magnetic resonance imaging study, *J. Abnorm. Psychol.* 117 (2008) 924–935.
- [44] A.C. Shin, H. Zheng, P.J. Pistell, H.R. Berthoud, Roux-en-Y gastric bypass surgery changes food reward in rats, *Int. J. Obes. (Lond.)* 35 (2011) 642–651.
- [45] M. Chevrot, A. Bernard, D. Ancel, M. Buttet, C. Martin, S. Abdoul-Azize, J.-F. Merlin, H. Poirier, I. Niot, N.A. Khan, P. Passilly-Degrace, P. Besnard, Obesity alters the gustatory perception of lipids in the mouse: plausible involvement of the lingual CD36, *J. Lipid Res.* (2013).
- [46] H.R. Berthoud, H. Zheng, Modulation of taste responsiveness and food preference by obesity and weight loss, *Physiol. Behav.* 107 (2012) 527–532.
- [47] A.D. Miras, C.W. le Roux, Bariatric surgery and taste: novel mechanisms of weight loss, *Curr. Opin. Gastroenterol.* 26 (2010) 140–145.
- [48] L.H. Epstein, A. Valoski, R.R. Wing, K.A. Perkins, M. Fernstrom, B. Marks, J. McCurley, Perception of eating and exercise in children as a function of child and parent weight status, *Appetite* 12 (1989) 105–118.
- [49] Z.J. Cohn, A. Kim, L. Huang, J. Brand, H. Wang, Lipopolysaccharide-induced inflammation attenuates taste progenitor cell proliferation and shortens the life span of taste bud cells, *BMC Neurosci.* 11 (2010) 72.

Original Research Communications

Obesity interferes with the orosensory detection of long-chain fatty acids in humans¹⁻³

Michael Chevrot, Patricia Passilly-Degrace, Deborah Ancel, Arnaud Bernard, Géraldine Enderli, Marlène Gomes, Isabelle Robin, Sylvie Issanchou, Bruno Vergès, Sophie Nicklaus, and Philippe Besnard

ABSTRACT

Background: The association between the orosensory detection of lipids, preference for fatty foods, and body mass index (BMI; in kg/m²) is controversial in humans.

Objective: We explored the oral lipid-sensing system and the orosensory-induced autonomic reflex system in lean and obese subjects.

Design: Lean (BMI: 19 to <25; n = 30) and obese (BMI >30; n = 29) age-matched men were enrolled. Their oral threshold sensitivity to linoleic acid (LA) was determined by using a 3-alternative forced-choice ascending procedure, and their eating habits were established by the analysis of 4 consecutive 24-h food-consumption diaries. The effect of brief oral lipid stimulations on plasma triglyceride [(TG)pl] concentrations was analyzed in overnight-fasted lean and obese individuals subjected to a whole-mouth stimulation (sip-and-spit procedure) with a control or 1% LA emulsions for 5 min according to a within-subject randomized design.

Results: A large distribution of LA detection was shown in both groups. Mean detection thresholds were 0.053% (wt:wt) and 0.071% (wt:wt) in lean and obese subjects, respectively. No relation between the LA detection threshold and BMI was observed. The 5 subjects who detected only the higher concentration of LA (5% wt:wt) or were unable to distinguish properly between control and LA emulsions were obese. An analysis of dietary habits showed that these obese LA nontasters consumed more lipids and energy than did all other subjects. Brief whole-mouth stimulations (sip-and-spit procedure) with a control or 1% LA emulsion revealed an LA-mediated rise in (TG)pl concentrations in overnight-fasted, lean subjects. The origin of this change seemed to be hepatic. This (TG)pl upregulation was not shown in obese subjects, which suggested that obesity led to disturbances in the oral-brainstem-periphery loop.

Conclusion: Altogether, these data strongly suggest that obesity may interfere with the orosensory system responsible for the detection of free long-chain fatty acids in humans. This trial was registered at clinicaltrials.gov as NCT02028975. *Am J Clin Nutr* 2014;99:975-83.

INTRODUCTION

Growing evidence supports the existence of a gustatory component in the orosensory detection of dietary lipids in humans (1). Effective stimuli are long-chain fatty acids (LCFAs)⁴ released by the lipase hydrolysis of triglycerides (2) and present in low concentrations in foodstuffs (3). The LCFA membrane receptor

CD36, which has been identified in the apical side of human taste buds (4), seems to play a significant role in this system because subjects who carry the variant allele rs1761667-AA, which is known to reduce the *CD36* gene expression (5), display a higher LCFA-detection threshold (ie, a lower sensitivity) than did G/G controls (2). An involvement of this oral LCFA-sensing system in the food selection is likely because an inverse association between *CD36* gene expression and acceptance of added fat in foods was recently reported (6). Brief oral lipid stimulations (with no ingestion) also elicited a transient rise in plasma triglyceride [(TG)pl] concentrations in healthy subjects (7, 8). Presumably, this change, which was a result of the release of triglycerides stored from the previous meal (9), provides a metabolic signal that prepares the body for the lipid arrival.

It was recently reported in rats and mice that diet-induced obesity impairs the orosensory response to free LCFAs, which leads to a lower attraction for lipids (10, 11). The fact that this phenomenon was reversible and tightly linked to the size of the fat mass suggested that obesity can alter the orosensory detection of lipids in rodents. Such a phenomenon might also exist in humans. Indeed, weight loss induced by bariatric surgery alters taste sensitivity and modifies taste preferences, making high-fat

¹ From Physiologie de la Nutrition et Toxicologie (MC, PP-D, DA, AB, MG, and PB) and Physiopathologie des Dyslipidémies (IR and BV), Unité Mixte de Recherche (UMR) U866, Institut National de la Santé et de Recherche Médicale (INSERM), Université de Bourgogne/AgroSup Dijon, Dijon, France; the Centre National de la Recherche Scientifique, UMR6265 (GE, MG, SI, and SN) and the Institut National de la Recherche Agronomique, UMR1324 Centre des Sciences du Goût et de l'Alimentation, Dijon, France (GE, MG, SI, and SN); and the Université de Bourgogne, UMR Centre des Sciences du Goût et de l'Alimentation, Dijon, France (GE, MG, SI, and SN).

² Supported by the Burgundy Council and Centre National Interprofessionnel de l'Economie Laitière (HumanFATaste program; to PB). MC is a PhD fellow of the HumanFATaste program.

³ Address correspondence to P Besnard, Physiologie de la Nutrition et Toxicologie, AgroSup Dijon, 1, Esplanade Erasme, F-21000 Dijon, France. E-mail: pbesnard@u-bourgogne.fr.

⁴ Abbreviations used: LA, linoleic acid; LCFA, long-chain fatty acid; LNT, lean nontaster; LT, lean taster; ONT, obese nontaster; OT, obese taster; PPY, polypeptide Y; (TG)pl, plasma triglyceride.

Received October 3, 2013. Accepted for publication January 27, 2014.

First published online February 12, 2014; doi: 10.3945/ajcn.113.077198.

and high-sugar foods less pleasant (12). Moreover, a negative association between the orosensory perception of dietary lipids and BMI was reported in normal-weight volunteers (13–15). It was extrapolated that higher BMI might impair the detection of lipids in the oral cavity. Nevertheless, claims that oral LCFA detection is causally related to obesity are premature. The impact of BMI as a factor of variations in oral lipid sensitivity remains under debate because no association was shown in other trials (1, 16). None of these studies was designed to assess this issue, except one trial that showed no association between overweight or obesity and a sensitivity to LCFAs (16). Likewise, whether obesity interferes with the (TG)pl rise triggered by an oral stimulation with LCFAs shown in lean subjects is also unknown.

With the use of well-defined subject groups [lean BMI (in kg/m²): <25; obese BMI: >30], the current study aimed to assess the impact of obesity on the oral detection of LCFAs. To do this assessment, oral detection thresholds of linoleic acid (LA), changes in (TG)pl concentrations secondary to brief oral LA stimulations, and food-consumption habits were compared in lean and obese, age-matched men.

SUBJECTS AND METHODS

Subjects

A power analysis was conducted before the study to determine an appropriate sample size to achieve a power of 0.90 on the basis of a 0.5 mmol/L difference in mean threshold between lean and obese subjects, which was consistent with a previous report of LA-threshold variation with BMI in healthy subjects (13). Thirty lean (BMI: 19 to <25) and 29 obese (BMI ≥30) age-matched, adult, white men participated in the current study. For lean subjects, eligibility criteria were as follows: no regular drug intake and triglyceridemia and glycemia concentrations <1.50 g/L and <6.10 mmol/L, respectively. Because type 2 diabetic patients have blunted taste responses (17), obese, nondiabetic subjects were selected according to the following inclusion criteria: no hypoglycemic drug intake or surgical treatment of obesity, fasted glycemia concentration <6.10 mmol/L, and glycosylated hemoglobin <6.0%. Smokers or former smokers (<3 mo) were excluded as were subjects with severe digestive pathologies, pancreatic, renal, hepatic failures, type 1 diabetes, or treated with inhibitors of proton pumps, insulin, glucagon-like peptide 1 analogs, or dipeptid peptidase-IV inhibitors. All subjects received detailed information about the study and gave written consent at the first visit. The study was approved by a local ethics committee (volunteers protection committee Est1). Participants were subjected to 4 successive sessions. Session 1 included a medical exploration (BMI determination and blood variable analyses) and a sensory screening [European Test of Olfactory Capabilities (18)]. Session 2 was devoted to the threshold determination of LA. Sessions 3 and 4 consisted of the exploration of the impact of brief oral stimulations with a control or 1% LA emulsion on blood variables. Experiments were performed in the morning in overnight-fasted subjects. The interval between sessions 3 and 4 was ≥2 wk. Dietary intakes were estimated by 2-d dietary recalls at sessions 3 and 4. Subjects were naive to psychophysical tests.

Preparation of LA emulsion

LA was chosen rather than oleic acid because the Western diet is characterized by an overconsumption of LA, which contributes

to a high ω -6: ω -3 ratio that is responsible for chronic disturbances (eg, inflammation and hypertension) (19). Moreover, LA is known to bind and activate lipid receptors (ie, CD36 and GPR120) expressed in gustatory papillae (20, 21). Finally, many experiments performed in rodents that unraveled the mechanisms responsible for the orosensory detection of dietary lipids were conducted by using LA (22). LA (Sigma Aldrich) oil-in-water emulsions were prepared in a solution of 5% acacia gum (wt:wt; Fluka), 5% mineral oil (wt:wt; Cooper), and 0.01% EDTA (wt:wt; VWR International) diluted in evian mineral water (evian). Acacia gum and paraffin oil were added to limit viscosity and lubricity differences between control and experimental samples. EDTA was added to prevent the oxidation of LA (23). Samples were mixed conventionally by using a stirrer (Corning) and homogenized by using a sonicator (Misonix sonicator model S-4000; QSonica LLC). The duration of sonication was adapted to LA concentrations to obtain a similar particle size. In all cases, sonication was conducted by lapses of 30 s separated by a 1-min pause. Sonication was conducted in a hermetic chamber saturated with nitrogen, and beakers were cooled by using an ice bath to limit the formation of oxidized compounds during emulsion preparation. All samples were prepared the day before the session and stored in propylene light-protected sealed bottles under nitrogen and at 4°C. Granulometric analyses (Mastersizer 2000; Malvern Instruments Ltd) and microscopic observations (phase-contrast microscopy) of the 1% LA emulsion (1.45-min sonication) and the control emulsion (3.30-min sonication) were performed on freshly prepared emulsions and 24 h later to assess the stability of the emulsions.

LA-threshold determination

Threshold determination was conducted in sensory evaluation rooms at the Centre des Sciences du Goût et de l'Alimentation at the second session. Subjects were installed in an air-conditioned room (21 ± 1°C) in an individual sensory booth. Participants were asked to refrain from the consumption of food or beverages and the use of oral care products for ≥2 h before the session. The methodology was based on previous work described by Chalé-Rush et al (23). Thresholds were determined by using the 3-alternative forced-choice procedure, in which participants were provided with successive sets of 3 samples. Each set contained 2 control samples and one stimuli sample. Within each set, participants had to indicate which sample was different from the 2 other samples. Sets were presented in an ascending concentration from 0.00028% to 5% LA (wt:wt) spaced by 0.25 log units (18 solutions in total), which meant that participants began to evaluate the set that contained the stimuli sample with the lowest LA concentration toward the highest concentration. When the participant could not identify the stimuli sample, the LA concentration was increased for the following set. When the participant correctly identified the stimuli sample, a second set at the same LA concentration was provided. This procedure stopped when the participant identified correctly the stimuli sample at a given concentration 3 consecutive times. This concentration represented the detection-threshold value of the participant.

Samples were presented as 5-mL portions in opaque cups and were tested at room temperature. Subjects were instructed to hold

the 5-mL solution in their mouth for 7 s, spit the solution out, and wait for 20 s before tasting the next sample. The interval between 2 sets was 60–120 s, during which participants were asked to rinse their mouths with water heated to 50°C and served at ~40°C. Testing was conducted under red lighting and with participants wearing a nose clip to limit visual and olfactory inputs, respectively. To verify the ability of participants to comply with the tasting protocol, training tests were conducted before the threshold measurement. Two training sets were performed with water samples and one set with the test samples.

Oral LA stimulation

The impact of an oral fat stimulation on various blood variables was explored during sessions 3 and 4 at the Centre Hospitalier Universitaire de Dijon. Individuals were subjected to a whole-mouth stimulation (sip-and-spit procedure) with a control or 1% LA emulsions for 5 min, according to a within-subject randomized design. During these sessions, subjects wore a nose clip to avoid olfactory cues. Blood samples were collected from an indwelling catheter 20 and 10 min before oral stimulations (= control values) and 5, 7.30, 10, 15, 20, 25, and 35 min after the end of the stimulation period. The patient had to sip and spit 5 times in a row the solutions that did or did not contain the LA (1%). Blood collection was performed by using an evacuated tube containing EDTA. All samples were placed on ice and centrifuged in a refrigerated centrifuge before being stored at -20°C until assays.

Dietary intake determination

During sessions 3 and 4, subjects had to report their food intakes during the 2 previous days by filling out 2 consecutive 24-h food-consumption diaries. During these 4 d, participants had to maintain their eating habits and avoid food or alcohol excess. Subjects were asked by the dietitian to record all foods and drinks consumed by being as precise as possible when reporting the type of food or drink consumed (eg, skimmed milk or full-fat milk) and specifying the seasoning or additions made to food (eg, sugar, butter, oil, or sauce), the type of cooking applied (eg, baking, steaming, or frying), and the amounts of all foods, drinks, and seasoning consumed.

Dietary records were analyzed by a registered dietitian. The CIQUAL 2012 table, which is published by the Agence Nationale de Sécurité Sanitaire des Aliments and relevant for foods consumed in France, was used to assess the nutritional composition of foods (<http://www.anses.fr/TableCIQUAL/index.htm>). This database includes details about the fatty acid content in foods. When needed, this database was supplemented with new foods by calculating the nutritional composition with the use of food data from the database and standard recipes, and when this was not possible, with the use of manufacturer information. Ingested amounts were converted into grams by using reference amounts from a commonly used French reference (24). For each subject, dietary intake was calculated for each of the 4 reported days and averaged.

Western blotting

Plasma from subjects blood samples were ultracentrifuged ($100,000 \times g$ for 3 h with a Beckman rotor 100.2; Beckman

Coulter). The supernatant fluid, which contained chylomicrons and the VLDL, was collected and stored at -20°C. After the denaturation of the collected fraction (2 μ L), a separation by using SDS-PAGE (4–12%) was performed. The transfer to a polyvinylidene fluoride membrane was achieved by electroblotting. After membranes were blocked overnight with a Tris-buffered saline buffer that contained 5% bovine serum albumin and 0.1% Tween 20, membranes were incubated overnight at 4°C with an anti-apolipoprotein B antibody (sc 11795, 1:200 dilution; Santa Cruz Biotechnologies). After a set of washes, the appropriate peroxidase-conjugated secondary antibody was added (sc 2020, 1:12000; Santa Cruz Biotechnologies). Antibody labeling was detected by chemiluminescence (ECL-plus reagent; Perkin Elmer).

Biochemical analysis

Concentrations of plasma glucose and triglyceride were assayed by using standard commercial kits (Biomérieux). Plasma leptin concentrations were determined by using Enzyme-ImmunoAssay kits (Phoenix Pharmaceuticals).

Statistics

Results are expressed as means \pm SEMs. We first checked that data for each group were normally distributed and that variances were equal. Then, we carried out a 2-tailed Student's *t* test. One-factor ANOVA and the Student-Newman-Keuls test were used in dietary intake analyses to compare group data [obese taster (OT), obese nontaster (ONT), lean taster (LT), and lean nontaster (LNT) groups]. Nutrient intakes were analyzed with SAS System for Windows software (version 9.3; SAS Institute Inc).

RESULTS

Physicochemical and microbiological characteristics of emulsions

The droplet size and stability of emulsions are important variables for oral lipid sensation (25). To avoid changes in these physicochemical characteristics that might interfere with the orosensory detection of LA, the duration of sonication was adapted to produce a similar particle size across the LA concentration range and with a control emulsion. As shown in **Figure 1A**, the droplet size varied in function of the duration of sonication. Consequently, the duration of sonication was adapted to the LA concentration used. Granulometric analyses (Mastersizer 2000 granulometer; Malvern Instrument) showed that sonications of 3.30 and 1.45 min for control and 1% LA solutions, respectively, produced emulsions with droplets of a similar size and an average diameter $\sim 3 \mu$ m (Figure 1, A and B). Droplet profiles of these 2 emulsions were very close but not fully similar because of a subpopulation of large droplets in the control solution (Figure 1C). Control and experimental emulsions remained stable ≥ 24 h (Figure 1C). Moreover, to determine whether the protocol used to prepare samples did not lead to the oxidation of free LCFAs, emulsions that contained the higher LA concentration (5% wt:wt) were analyzed after sonication by using solid-phase microextraction headspace gas chromatography. A comparison of chromatograms obtained with the pure LA compound and 5% LA emulsion did not revealed

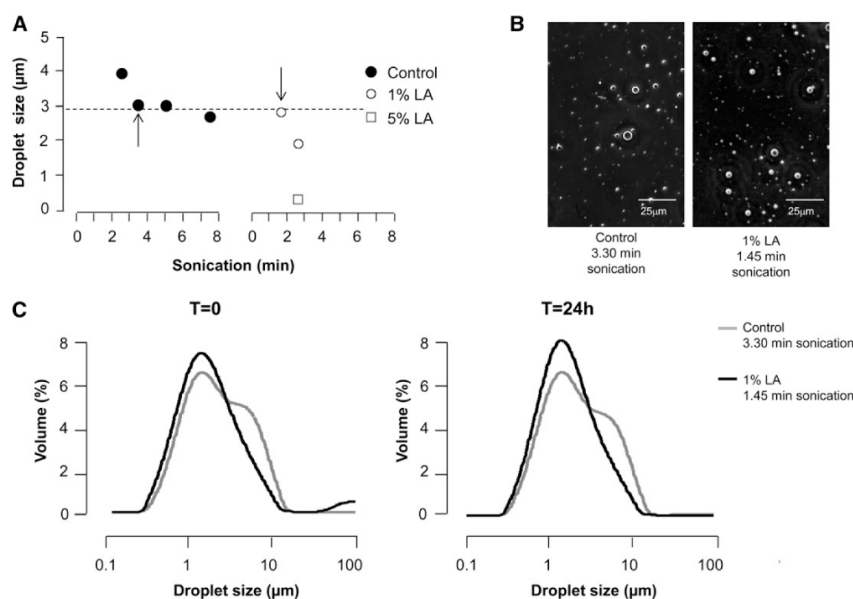


FIGURE 1. Granulometric analyses of emulsions. A: Effect of the duration of the sonication on the droplet size of control and LA emulsions. Each dot represents the median value of the droplet size. Arrows illustrate the duration of sonications used to obtain a similar emulsion between control and 1% LA solutions. B: Droplets produced by 3.30 min of sonication of control emulsion and 1.45 min of sonication of 1% LA emulsion (1:10 dilution). C: Granulometric distribution of droplets in control and 1% LA emulsions at the end of sonication ($t = 0$) and 1 d later ($t = 24$ h). LA, linoleic acid.

differences in oxidation-related volatiles (data not shown). Finally, microbiological tests indicated that these samples and their processes were safe for human consumption.

Oral sensitivity to LA decreased only in a few obese subjects

To explore whether obesity affects the orosensory detection of LCFAs, the oral threshold sensitivity to LA was determined by using the 3-alternative ascending concentration procedure in selected subjects. As expected, waist circumference and fasted triglyceridemia and leptinemia were clearly higher in obese than in lean subjects (Table 1). Although fasted plasma glucose and glycated hemoglobin concentrations were slightly more elevated in obese patients, values remained in normal ranges, which

provided support of an absence of glucotoxicity and, therefore, type 2 diabetes in the obese group (Table 1). As shown in Figure 2, a large distribution of LA thresholds covering 4 orders of magnitude was observed in lean and obese subjects. Distributions did not differ from each other ($P = 0.31$; 2-sided Wilcoxon's 2-sample test), and no significant difference in oral sensitivity for LA between lean and obese subjects was observed ($0.403 \pm 0.789\%$ and $1.007 \pm 1.842\%$ wt:wt in lean and obese groups, respectively; $P = 0.11$). Notably, the 5 subjects who detected only the higher concentration of LA (5% wt:wt) or were unable to distinguish properly between control and LA emulsions were obese, which suggested the existence of LA tasters and nontasters in this population.

According to the wide range of detection thresholds shown in Figure 2, it was arbitrarily postulated that subjects who displayed

TABLE 1
Main clinical variables of lean and obese subjects¹

	Lean ($n = 29$)	Obese ($n = 30$)
Age (y)	50.69 ± 2.69	52.27 ± 2.13
BMI (kg/m^2)	22.76 ± 0.37	$36.45 \pm 0.99^{***}$
Waist circumference (m)	0.86 ± 0.02	$1.18 \pm 0.02^{***}$
Fasted plasma triglyceride concentration (g/L)	0.96 ± 0.06	$2.12 \pm 0.27^{***}$
Fasted plasma glucose concentration (mmol/L)	4.99 ± 0.11	$5.37 \pm 0.1^*$
Fasted total cholesterol concentration (mmol/L)	5.15 ± 0.17	5.34 ± 0.16
Fasted Hb A _{1c} ² (%)	5.33 ± 0.06	$5.61 \pm 0.08^*$
Fasted plasma leptin concentration ($\mu\text{g}/\text{L}$)	1.84 ± 0.24	$15.66 \pm 2.23^{***}$

¹ All values are means \pm SEMs. ****Student's t test, * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$.

² Hb A_{1c}, glycated hemoglobin.

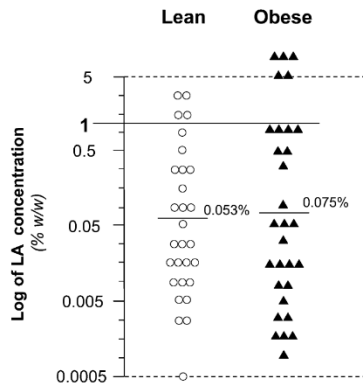


FIGURE 2. Geometric means of the LA detection threshold in lean and obese subjects. A 3-alternative forced-choice ascending concentration procedure was used to determine the LA detection threshold in lean ($n = 29$) and obese ($n = 30$) subjects. This test was carried out on solutions that contained from 0.0005% to 5% LA (wt:wt). LA, linoleic acid.

a sensitivity upper to 1% LA were nontasters. Therefore, the following 4 groups of subjects were distinguished: LTs ($n = 25$) and OTs ($n = 25$), for whom the LA detection threshold was

<1%, and LNTs ($n = 4$) and ONTs ($n = 5$), for whom the LA detection threshold was >1%. When the 4 groups were compared, ages did not differ ($P = 0.43$). BMI was similar in LTs and LNTs (22.71 ± 2.00 compared with 21.99 ± 0.74 , respectively; $P = 0.49$) and between OTs and ONTs (36.85 ± 5.66 compared with 35.26 ± 7.39 , respectively; $P = 0.59$).

ONTs consumed more energy-dense foods

Daily dietary intake was calculated individually by averaging the reported 24-h data and was compared in groups by combining sensitivity and weight status (Figure 3). Energy intake was higher in ONTs than in OTs ($P < 0.0007$). ONTs also consumed more carbohydrates ($P < 0.0003$) and lipids ($P < 0.0079$), especially SFAs ($P < 0.01$), than did OTs (Figure 3). Protein data were similar between groups (data not shown).

Plasma triglyceride response to a brief oral stimulation by LA was lacking in obese subjects

To further explore the putative impact of obesity on the osensory detection of free LCFAs, plasma changes after a sip-and-spit procedure by using an emulsion with or without 1% LA were explored in overnight-fasted subjects according to a randomized within-subject design. With the activation of a vagal

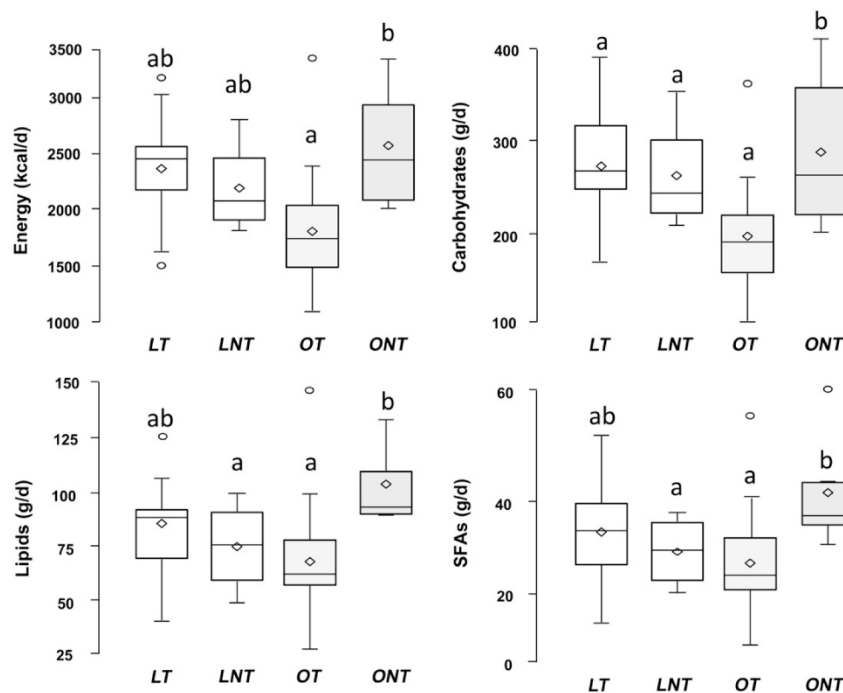


FIGURE 3. Analysis of food-consumption diaries. Box-plot representations of daily consumption of energy, carbohydrates, lipids, and SFAs in LT ($n = 25$), LNT ($n = 4$), OT ($n = 25$), and ONT ($n = 5$). Box outlines represent lower and upper quartiles, outermost points correspond to smallest and largest observations, horizontal lines are median values, and diamonds in boxes are mean values. Means with the same lowercase letter were not different, $P < 0.05$ (Student-Newman-Keuls test). LNT, lean linoleic acid nontasters; LT, lean linoleic acid tasters; ONT, obese linoleic acid nontasters; OT, obese linoleic acid tasters.

reflex loop, this physiologic investigation provided information on the functioning of the tongue-brainstem-periphery axis. For this aspect, blood samples of 23 LT, 21 OT, 4 LNT, and 4 ONT subjects present in both sessions 3 and 4 were analyzed. In LTs, the orosensory stimulation with 1% LA led to a progressive rise in (TG)pl concentrations. This phenomenon occurred rapidly after oral stimulation and was specific to LA because it was not reproduced with the control emulsion (Figure 4A). To our surprise, no change in (TG)pl concentrations was observed in OTs given an oral stimulation with 1% LA (Figure 4B). A statistical comparison between LTs and OTs highlighted that obesity impaired the (TG)pl responsiveness to 1% LA ($P < 0.001$; Figure 4C). By contrast, no difference was shown in LNTs compared with ONTs (Figure 4D). The LA-mediated rise in (TG)pl concentrations shown in the LT group appeared to be specific to triglycerides because plasma glucose concentrations were unchanged secondary to an oral LA stimulation (Figure 5).

(TG)pl rise triggered by an oral LA stimulation in LTs was VLDL dependent

To determine the origin of the rise in (TG)pl concentrations observed in LTs, an apolipoprotein B analysis was performed by using Western blotting in subjects who displayed the greater

increase in (TG)pl concentrations in response to 1% LA oral stimulation ($n = 7$). As shown in Figure 6A, only one protein was detected, the molecular mass of which was similar to apolipoprotein B-100. Consistent with the rise in (TG)pl concentrations triggered by the 1% LA emulsion (Figure 4), the amount of apolipoprotein B-100 was increased 5 and 30 min after the whole-mouth stimulation (Figure 6, B and C).

DISCUSSION

The origin of differences in the orosensory detection of lipids and fat consumption remains controversial in human. The current study was designed to address the question of the impact of obesity on oral lipid detection and consumption by using psychophysical and physiologic approaches. In contrast with previously published data (13–15), a clear difference in weight status between our groups was sought to detect a possible difference in the orosensory perception of LCFAs in relation with obesity. The 3-alternative forced-choice tests revealed that the oral detection of LA was highly variable in lean and obese subjects. This large distribution, which reached 4 orders of magnitude, might have been attributable to the fact that participants were naive to psychophysical tests and were inexperienced with this unfamiliar stimulus. Despite these

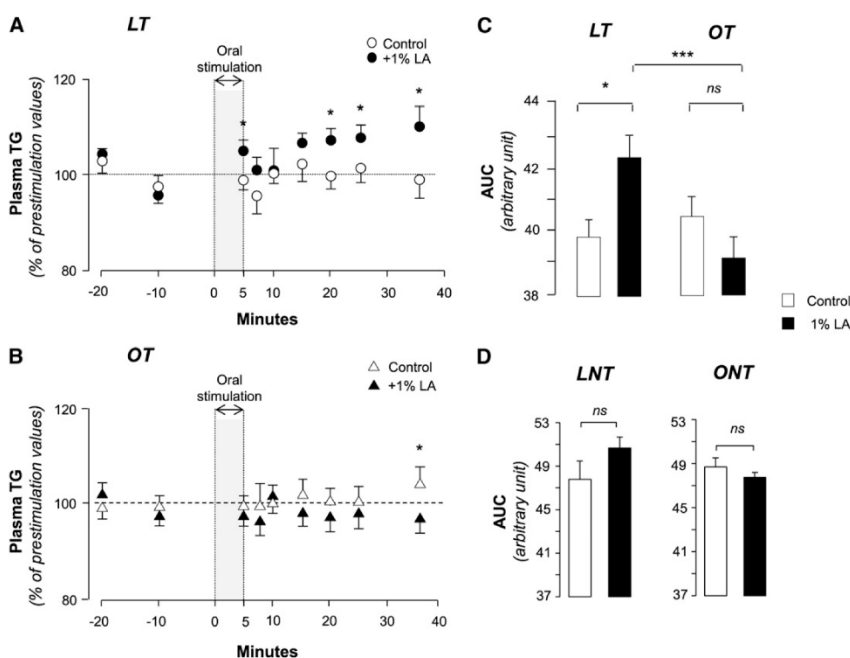


FIGURE 4. Mean (\pm SEM) effects of brief oral LA stimulation on plasma triglyceride concentrations in overnight-fasted lean and obese subjects. Individuals were subjected to a whole-mouth stimulation (sip-and-spit procedure) with a control or 1% LA emulsion for 5 min according to a within-subject randomized design. Blood samples were collected from an in-dwelling catheter 20 and 10 min before oral stimulation (= control values) and at 5, 7.30, 10, 15, 20, 25, and 35 min after the end of the stimulation period. Plasma triglyceride concentrations were assayed according to the procedures described in Subjects and Methods. A: LT ($n = 23$). B: OT ($n = 21$). C: Bar graphs of AUC of plasma TG concentrations from LT and OT subjected to a whole-mouth stimulation with a control or 1% LA emulsion. D: Bar graphs of AUC of plasma TG concentrations from LNT ($n = 4$) and ONT ($n = 4$) subjected to a whole-mouth stimulation with a control or 1% LA emulsion. ****Student's *t* test, * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$. LA, linoleic acid; LNT, lean linoleic acid nontasters; LT, lean linoleic acid tasters; OT, obese linoleic acid tasters; ONT, obese linoleic acid nontasters; TG, triglyceride.

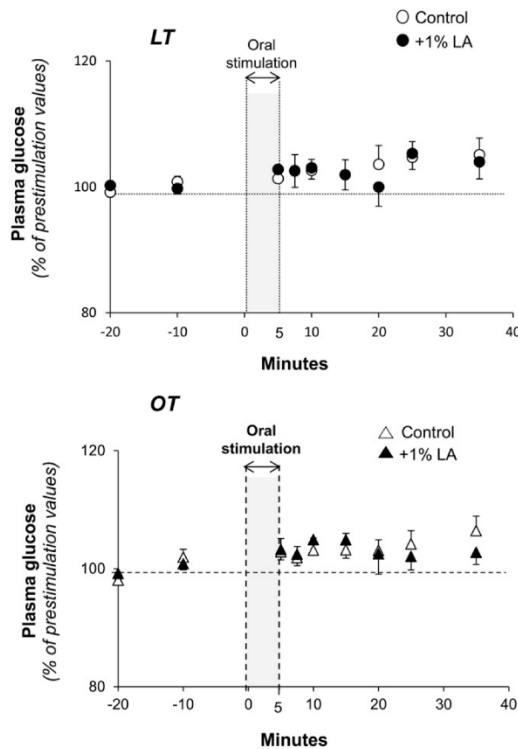


FIGURE 5. Mean (\pm SEM) effects of brief oral LA stimulation on plasma glucose concentrations in overnight-fasted lean and obese subjects (LT: $n = 23$; OT: $n = 21$). Individuals were subjected to a whole-mouth stimulation (sip-and-spit procedure) with a control or 1% LA emulsion for 5 min according to a randomized crossover design. Blood samples were collected from an in-dwelling catheter 20 and 10 min before oral stimulation (= control values) and 5, 7.30, 10, 15, 20, 25, and 35 min after the end of the stimulation period. Plasma glucose concentrations were assayed according to the procedures described in Subjects and Methods. Data obtained from LA tasters (ie, with an LA detection threshold $\leq 1\%$) are shown. * $P < 0.05$ (Student's t test). LA, linoleic acid; LT, lean linoleic acid tasters; OT, obese linoleic acid tasters.

limitations, we have chosen this strategy rather than to undertake experiments with trained subjects (26). A familiarization with the lipid stimulus does not seem to be systematically effective (27). Moreover, the repetition of stimulations during a short period might lead to an oral desensitization of the lipid-sensing system because a lipid-mediated downregulation of the gustatory lipid-sensor candidate CD36 has been reported in the mouse (28). Geometric means of LA-detection thresholds were not different across groups (0.053% in lean groups and 0.075% in obese groups; wt:wt). These values were of the same magnitude of those obtained in other trials that used the same protocol (13, 23). In contrast to what has been suggested in other studies (13–15), but consistent with recent experiments that used emulsions containing stearic acid (18:0) (1) or oleic acid (18:1n-9) (16), no association between the orosensory sensitivity for LA and BMI or waist circumference was shown in this study by contrasting normal weight and obese subjects.

In the mouse, the analysis of preference tests performed during weight-gain and -loss sequences revealed that the detection threshold for oily solutions was tightly related to the fat mass. A significant inverse correlation between a preference for fat and adiposity was shown (11). This finding was likely facilitated by the high genetic and dietary homogeneity of the murine sample, which was likely not the case in the current human sample. Nevertheless, an individual analysis of LA-threshold values revealed that obesity might have been associated with changes in the lipid perception in a few volunteers. Indeed, the 5 subjects who detected only the higher LA concentration (5% wt:wt; $n = 2$) or were insensitive to LA ($n = 3$) were obese, which suggested the existence of LA tasters and LA nontasters in obese subjects (Figure 2). The origin of this dichotomy remains elusive. It might have been attributable to genetics (eg, deleterious mutations in genes that encode for lipid-sensors expressed in the oral cavity). For example, a gene variant (*rs1761667*, AA allele) that decreases CD36 expression has been shown to be associated with a lower sensitivity to LCFAs in obese women (2). Alterations in the composition of saliva (29), in oral microbiota (30), and/or in the oral inflammatory status (31) that affect the chemoreception of LCFAs might be an alternative hypotheses. Future studies are required to better describe this subpopulation and explore the origin of the altered sensitivity to LCFAs.

Overconsumption of energy, especially of lipid-rich foods, was only shown in the 5 ONTs. Impairment of the orosensory detection of LCFAs might lead to a greater fat consumption, either to reach a hedonic fulfillment in individuals poorly sensitive to the presence of free LCFAs in the oral cavity or because these subjects lack the physiologic feedback that would help to limit their lipid consumption. Such a behavior might contribute to create a vicious circle that promotes obesity in these subjects who are already obese, as suggested by a previous work that showed a weakened activation in the reward circuit after the ingestion of energy-dense foods in obese subjects (32). Whether the great variability of the sensitivity to LA of naive participants has a physiologic basis or is a result of variations in their performance remains questionable and constitutes a limitation for a definitive interpretation of psychophysical testing (Figure 7).

To further study the possible association between obesity and lipid sensing in the oral cavity, individuals were subjected to a physiologic test that targeted a reflex loop by an oral lipid stimulation (Figure 7). By the activation of a vagal reflex loop (ie, the tongue-brainstem-periphery axis), this procedure normally induces physiologic changes in the (TG)pl concentration (1, 7–9), which is considered as a biomarker for oral fat sensitivity (8). Therefore, (TG)pl concentrations were assayed in overnight-fasted lean and obese subjects after brief whole-mouth stimulations with a control or 1% LA emulsion according to a within-subject, randomized, crossover design in subjects who were able to discriminate LA at this concentration (detection threshold $\leq 1\%$ LA). Oral exposure to LA elicited a rapid TG rise in LTs. Obesity abrogated this early peak of TG even in OTs. This finding was consistent with a defect in the orosensory lipid signal circuitry in relation to obesity.

The fact that oral lipid exposure alters (TG)pl concentrations has been reported by multiple trials (7–9). This effect is a biphasic phenomenon with an early but modest increase followed by a more sustained and prolonged elevation. The (TG)pl rise observed in the lean group was likely a result of an enhanced

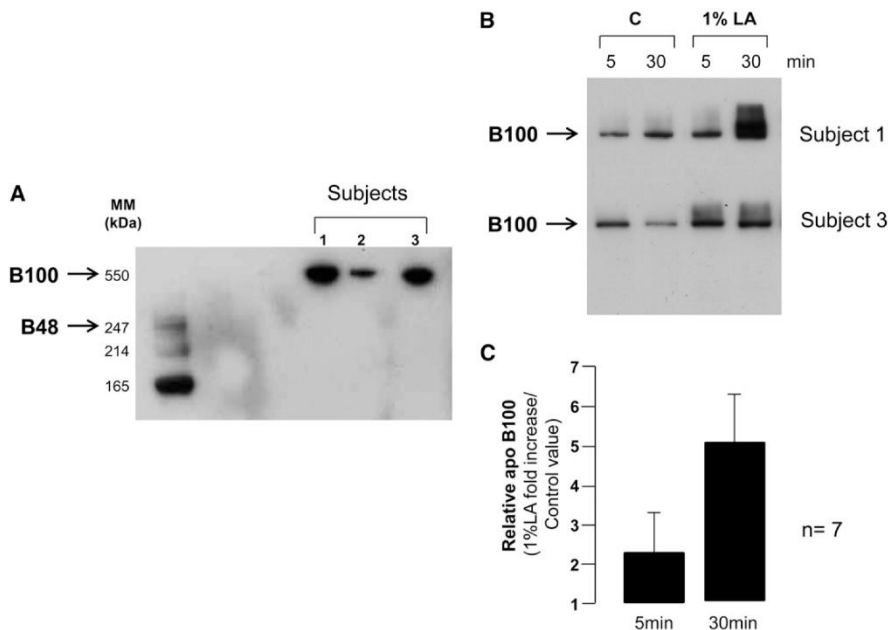


FIGURE 6. Western blotting of plasma apo B concentrations in lean LA tasters subjected to brief stimulations with a 1% LA emulsion. A: Relative apo B expressions in plasma from 3 different subjects. B: Representative data showing the evolution of plasma apo B100 concentrations 5 and 30 min after a whole-mouth stimulation with a control or 1% LA emulsion in 2 different subjects. C: Bar-graph representation of mean \pm SEM changes in the relative apo B expressions in plasma 5 and 30 min after a whole-mouth stimulation with a control or 1% LA emulsion in different subjects. $n = 7$. Student's *t* test was used for the analysis. apo, apolipoprotein; LA, linoleic acid; MM, molecular mass.

secretion of TG-rich lipoparticles generated by the liver (VLDL) because it occurred after an overnight fasting. Consistent with this assumption, the VLDL marker apolipoprotein B-100 was the only one detected in plasma of lean subjects after oral LA stimulation. The involvement of a cephalic phase reflex in this effect has been supported by several observations. First, in overnight-fasted women, oral fat stimulation induced a rapid rise in plasma pancreatic polypeptide Y (PPY) concentrations, which peaked at 5 min (33). Second, the VLDL synthesis and release were enhanced by PPY in rat hepatocytes (34). Third, efferent vagal activation controlled PPY release (35). Fourth, vagal stimulation enhanced postprandial lipemia by affecting mainly the VLDL metabolism in humans (36). A dysfunction in this LA-mediated regulatory loop might exist in obese subjects because a lower PPY responsiveness has been shown during obesity in humans (37). The physiologic significance of an early peak of triglycerides remains elusive. The effect might serve as a signal for the brain to limit the size of the meal. Consistent with this assumption, a preliminary study showed that the infusion of minute quantities of a lipid emulsion into a carotid, to target the brain area preferentially, decreased food intake during the refeeding period in fasted mice (M Chevrot, P Besnard, and S Luquet, unpublished observations, 2010). Whether an obese status interferes with this regulation remains to be explored.

In conclusion, altogether these data obtained by using 2 complementary investigations (ie, psychophysical and physiologic techniques) suggest that obesity may interfere with the sensory circuitry responsible for the detection of LCFAs in humans. Although there is no systematic relation between obesity

and the LA detection threshold, the data show that a lower sensitivity to LA may be associated with an overconsumption of lipid-rich foods in obese subjects only. Whether obesity is the cause or the consequence of such a phenomenon remains to be determined. Moreover, the autonomic control linking oral LCFA detection to the periphery seems to be disturbed during obesity. The current study was not designed to determine where and how this dysfunction takes place. Because inflammation is thought to

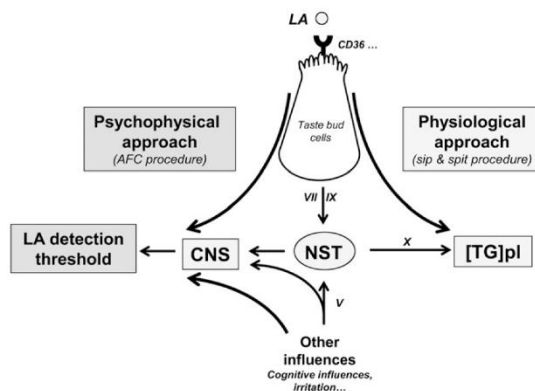


FIGURE 7. Features of psychophysical and physiologic methods used. V, VII, IX, and X denote cranial nerves. AFC, ascending-forced choice method; CNS, central nervous system; LA, linoleic acid; NST, nucleus of solitary tract; [TG]pl, plasma triglyceride.

be an underlying cause of taste disorders (31), obesity-mediated neuroinflammation affecting, eg, the function of the vagal reflex loop is a plausible track for future investigations. Because obesity is a spreading pathology in the world, a better understanding of putative links between obesity, fatty taste, and food choices might open novel avenues for more effective dietary and/or pharmacologic interventions targeting the prevention and the treatment of obesity.

We thank Jean-Marie Perrier-Cornet, Thomas Karbowski, and Pascale Winckler for emulsion analyses and Véronique Grivet and Philippe Loisel for their technical assistance during sessions 3 and 4.

The authors' responsibilities were as follows—MC, PP-D, SI, BV, SN, and PB: designed the research; MC, PP-D, DA, AB, GE, MG, and IR: conducted the research; MC, GE, MG, SN, and PB: analyzed data; MC and PB: wrote the manuscript; PB: had primary responsibility for the final content of the manuscript; and all authors: read and approved the final manuscript. None of the authors had a conflict of interest.

REFERENCES

- Mattes RD. Accumulating evidence supports a taste component for free fatty acids in humans. *Physiol Behav* 2011;104:624–31.
- Pepino MY, Love-Gregory L, Klein S, Abumrad NA. The fatty acid translocase gene CD36 and lingual lipase influence oral sensitivity to fat in obese subjects. *J Lipid Res* 2012;53:561–6.
- Stewart JE, Feinle-Bisset C, Keast SJ. Fatty acid detection during food consumption and digestion: associations with ingestive behavior and obesity. *Prog Lipid Res* 2011;50:225–33.
- Simons PJ, Kummer JA, Luiken JJFP, Boon L. Apical CD36 immunolocalization in human and porcine taste buds from circumvallate and foliate papillae. *Acta Histochem* 2011;113:839–43.
- Love-Gregory L, Sherva R, Schappe T, Qi JS, McCreath, Klein S, Connelly MA, Abumrad NA. Common CD36 SNPs reduce protein expression and may contribute to a protective atherogenic profile. *Hum Mol Genet* 2011;20:193–201.
- Keller KL, Liang LC, Sakimura J, May D, van Belle C, Breen C, Driggin E, Tepper BJ, Lanzano PC, Deng L, et al. Common variants in the CD36 gene are associated with oral fat perception, fat preferences, and obesity in African Americans. *Obesity (Silver Spring)* 2012;20:1066–73.
- Mattes RD. Oral fat exposure alters postprandial lipid metabolism in humans. *Am J Clin Nutr* 1996;63:911–7.
- Mattes RD. Brief oral stimulation, but especially oral fat exposure, elevates serum triglycerides in humans. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2009;296:G365–71.
- Chavez-Jauregui RN, Mattes RD, Parks EJ. Dynamics of fat absorption and effect of sham feeding on postprandial lipemia. *Gastroenterology* 2010;139:1538–48.
- Shin AC, Townsend RL, Patterson LM, Berthoud HR. "Liking" and "wanting" of sweet and oily food stimuli as affected by high-fat diet-induced obesity, weight loss, leptin, and genetic predisposition. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2011;301:R1267–80.
- Chevrot M, Bernard A, Ancel D, Buttet M, Martin C, Abdoul-Azize S, Merlin JF, Poirier H, Niot I, Khan NA, et al. Obesity alters the gustatory perception of lipids via a CD36-mediated mechanism in the mouse. *J Lipid Res* 2013;54:2485–94.
- Berthoud HR, Zheng H. Modulation of taste responsiveness and food preference by obesity and weight loss. *Physiol Behav* 2012;107:527–32.
- Stewart JE, Feinle-Bisset C, Golding M, Delahunty C, Clifton PM, Keast RSJ. Oral sensitivity to fatty acids, food consumption and BMI in human subjects. *Br J Nutr* 2010;104:145–52.
- Stewart JE, Newman LR, Keast RSJ. Oral sensitivity to oleic acid is associated with fat intake and body mass index. *Clin Nutr* 2011;30:838–44.
- Stewart JE, Seimon RV, Otto B, Keast RSJ, Clifton PM, Feinle-Bisset C. Marked differences in gustatory and gastrointestinal sensitivity to oleic acid between lean and obese men. *Am J Clin Nutr* 2011;93:703–11.
- Stewart JE, Keast RSJ. Recent fat intake modulates fat taste sensitivity in lean and overweight subjects. *Int J Obes* 2012; 36:834–42.17.
- Gondivkar SM, Indurkar A, Degwekar S, Bhowate R. Evaluation of gustatory function in patients with diabetes mellitus type 2. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2009; 108:876–80.
- Thomas-Danguin T, Sicard G, Vigouroux M, Farget V, Johanson A, Bengtson A, Hall G, Ormel W, De Graaf C, Rousseau F, et al. Development of the ETOC: a European test of olfactory capabilities. *Rhinology* 2003;41:142–51.
- Simopoulos AP. Essential fatty acids in health and chronic disease. *Am J Clin Nutr* 1999;70:560S–9S.
- Baillie AG, Coburn CT, Abumrad NA. Reversible binding of long-chain fatty acids to purified FAT, the adipose CD36 homolog. *J Membr Biol* 1996;153:75–81.
- Hirasawa A, Tsumaya K, Awaji T, Katsuma S, Adachi T, Yamada M, Sugimoto Y, Miyazaki S, Tsujimoto G. Free fatty acids regulate gut incretin glucagon-like peptide-1 secretion through GPR120. *Nat Med* 2005;11:90–4.
- Passilly-Degrace P, Besnard P. CD36 and taste of fat. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2012;15:107–11.
- Chalé-Rush A, Burgess JR, Mattes RD. Evidence for human orosensory (taste?) sensitivity to free fatty acids. *Chem Senses* 2007;32:423–31.
- Herceberg S, Preziosi P. Manuel du volontaire SU.VI.MAX. [Volunteers' book of SUVIMAX study.] Paris, France: Polytechnica, 1994 (in French).
- Running CA, Mattes RD, Tucker RM. Fat taste in humans: sources of within- and between-subjects variability. *Prog Lipid Res* 2013;52:438–45.
- Tucker RM, Mattes RD. Influences of repeated testing on nonesterified fatty acid taste. *Chem Senses* 2013;38:325–32.
- Tucker RM, Laguna L, Quinn R, Mattes RD. The effect of short, daily oral exposure on non-esterified fatty acid sensitivity. *Chem Percept* 2013;6:78–87.
- Martin C, Passilly-Degrace P, Gaillard D, Merlin JF, Chevrot M, Besnard P. The lipid-sensor candidates CD36 and GPR120 are differentially regulated by dietary lipids in mouse taste buds: impact on spontaneous fat preference. *PLoS ONE* 2011;6:e24014.
- Neyraud E, Palicki O, Schwartz C, Nicklaus S, Féron G. Variability of human saliva composition: possible relationships with fat perception and liking. *Arch Oral Biol* 2012;57:556–66.
- Zeigler CC, Persson GR, Wondimu B, Marcus C, Sobko T, Modéer T. Microbiota in the oral subgingival biofilm is associated with obesity in adolescence. *Obesity (Silver Spring)* 2012;20:157–64.
- Wang H, Zhou M, Brand J, Huang L. Inflammation and taste disorders: mechanisms in taste buds. *Ann N Y Acad Sci* 2009;1170:596–603.
- Stice E, Spoor S, Bohon C, Veldhuizen MG, Small DM. Relation of reward from food intake and anticipated food intake to obesity: a functional magnetic resonance imaging study. *J Abnorm Psychol* 2008;117:924–35.
- Crystal SR, Teff KL. Tasting fat: cephalic phase hormonal responses and food intake in restrained and unrestrained eaters. *Physiol Behav* 2006;89:213–20.
- Wolfe BM. Effects of gastro-entéro-pancreatic hormones upon triglyceride synthesis and secretion by rat hepatocytes. *Clin Invest Med* 1992;15:30–41.
- Schwartz TW, Holst JJ, Fahrenkrug J, Jensen SL, Nielsen OV, Rehfeld JF, de Muckadell OB, Stadil F. Vagal, cholinergic regulation of pancreatic polypeptide secretion. *J Clin Invest* 1978;61:781–9.
- Robertson MD, Mason AO, Frayn KN. Timing of vagal stimulation affects postprandial lipid metabolism in humans. *Am J Clin Nutr* 2002; 76:71–7.
- Lassmann V, Cabrerizzo Garcia L, Vialettes B, Vague P. Impaired pancreatic polypeptide response to insulin hypoglycemia in obese subjects. *Horm Metab Res* 1985;17:663–6.