



Université de Bourgogne
Dijon-France
UFR Sciences Vie



Université Abdou Moumouni
Niamey-Niger
Faculté des Sciences et Techniques

THESE
EN COTUTELLE INTERNATIONALE

Pour obtenir le grade de
Docteur des Universités de Bourgogne et d'Abdou Moumouni

Discipline: *Sciences de la Vie*

Spécialité : *Physiologie de la Nutrition*

Par

Souleymane ABDOUL-AZIZE

Implication de la signalisation calcique et
des MAP kinases dans la perception
gustative lipidique

Soutenue à Niamey, le 23 Septembre 2013

Membres de Jury:

M. Hamani DAOUDA	Professeur, Université Abdou Moumouni (<i>Niger</i>), <i>Président</i>
M. Marcel CREST	Directeur de recherche, CNRS UMR 6150 (<i>France</i>), <i>Rapporteur</i>
M. Ambaliou SANNI	Professeur, Université d'Abomey-Calavi (<i>Bénin</i>), <i>Rapporteur</i>
M. Naim A. KHAN	Professeur, INSERM UMR U866 (<i>France</i>), <i>Directeur de thèse</i>
M. Hassimi SADOU	MCF, Université Abdou Moumouni (<i>Niger</i>), <i>Co-directeur de thèse</i>

Année 2012-2013

A ma Mère et mon Père

A mon Epouse

A toute ma Famille

A tous mes Amis

Remerciements

J'aimerais en tout premier lieu adresser ma plus sincère gratitude à mon directeur de thèse, Monsieur le **Professeur Naim A. KHAN** (Université de Bourgogne, France), un homme de science passionné, dévoué et perspicace qui a à cœur la formation et la réussite de ses disciples. Mille mercis *CHEF* pour votre soutien, vos conseils, votre enseignement et votre confiance inébranlable.

À mon co-directeur de thèse, Monsieur le **Maitre de Conférences Hassimi SADOU** (Université d'Abdou Moumouni, Niger). Merci d'avoir accepté de codiriger ma thèse et pour tous les soutiens, de toute nature, en particulier votre effort dans l'attribution de ma bourse pour le financement de ma troisième année. Soyez assuré de mon grand respect et de ma profonde gratitude.

J'exprime ma profonde gratitude et mes plus vifs remerciements à Monsieur le Directeur **Marcel CREST** (Directeur de recherche, CNRS UMR 6150, Université de Marseille, France) et à Monsieur le **Professeur Ambaliou SANNI** (Université d'Abomey-Calavi, Bénin) qui m'ont fait l'honneur d'accepter d'être rapporteurs de ce travail.

Au **Professeur Hamani DAOUDA** (Université Abdou Moumouni, Niger), j'exprime toute ma vive reconnaissance pour l'honneur que vous m'avez fait en acceptant de présider mon jury de thèse. Soyez assuré de ma profonde gratitude et de ma haute considération.

Un grand Merci au **Docteur Aziz Hichami**, MCF-HDR, pour m'avoir initié aux techniques expérimentales et pour son soutien permanent tant scientifique que moral, aux membres de l'équipe NuTox « Physiologie de la Nutrition et Toxicologie » : Au **Professeur Philippe Besnard** pour son aide de l'attribution du complément de bourse, à Mme Anne-Marie Simonin-Guengard, Assistant-Ingénieur, M. Gado Dramane, M. Selvakumar Subramaniam, merci pour votre collaboration et votre amitié.

A nos collaborateurs du projet tassili (Franco-Algérien) et en particulier le **Professeur Ahmed E. Kocier** et Mme Feriel Mebarki-Atek.

Merci à tous ceux qui ont cru, croient et croiront toujours en moi : mes parents, mes frères et sœurs, leur soutien indéfectible, leur appui à mes projets m'incitent à continuer et à réaliser tous mes rêves. Sans oublier évidemment mon trésor, ma femme pour son affection, sa bonté, son soutien, et surtout sa patience.

Je remercie également tous mes amis qui m'ont soutenu, et tous ceux que je n'ai pas pu citer.

Dans ce travail, nous démontrons que STIM1, un senseur calcique activé par la déplétion du Ca^{2+} intracellulaire du réticulum endoplasmique, est indispensable pour la signalisation calcique et la préférence oro-sensorielle du gras. Nous observons que l'acide linoléique (LA), en activant les phospholipases A_2 *via* CD36, produit de l'acide arachidonique (AA) et de la lyso-phosphatidylcholine (lyso-PC). Cette activation déclenche un influx calcique dans les cellules CD36-positives, et induit la production du facteur CIF (*Ca²⁺ Influx Factor*). CIF, AA et lyso-PC exercent différentes actions sur l'ouverture des canaux SOC (*Stored Operated Calcium Channel*) constitués de protéines Orai et contrôlés par STIM1. Par ailleurs, les souris au phénotype *Stim1*^{-/-} perdent la préférence spontanée pour les lipides et la libération de la sérotonine à partir des cellules gustatives dans le milieu extracellulaire chez les animaux sauvages. Nous démontrons aussi que la signalisation calcique médiée *via* CD36 est doublement modulée lors de l'obésité. L'augmentation de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ dans les cellules gustatives observée chez le *Psammomys obesus*, un modèle d'obésité nutritionnelle, est fortement diminuée chez les souris rendues obèses par un régime hyperlipidique. Nous avons constaté également que l'interaction de LA avec le CD36 induit l'activation des MAP Kinases de la voie MEK1/2/ERK1/2/Elk-1 qui est non seulement à l'origine de l'activation des aires cérébrales telles que le NTS, le noyau arqué, l'hippocampe mais aussi indispensable pour la préférence spontanée pour les lipides alimentaires.

Nos résultats suggèrent pour la première fois, que la voie ERK1/2 des MAPK et la signalisation calcique lipidique contrôlée par STIM1 sont impliquées dans la perception oro-gustative des lipides.

Mots-clés : *AL, CD36, Papille caliciforme, PLA2, Stim1, Orai1/3, Préférence gustative lipidique, sérotonine, MAPK, Zif268, BDNF, Glut1, NTS, Noyau arqué, Hippocampe.*

In this work, we demonstrate that stromal interaction molecule 1 (STIM1), a sensor of Ca^{2+} depletion in the endoplasmic reticulum, mediates fatty acid-induced Ca^{2+} signaling in the mouse tongue and fat preference. We showed that linoleic acid (LA) induced the production of arachidonic acid (AA) and lysophosphatidylcholine (Lyso-PC) by activating multiple phospholipase A₂ isoforms *via* CD36. This activation triggered Ca^{2+} influx in lingual CD36-positive taste bud cells (TBCs) purified from mouse CVP. LA also induced the production of Ca^{2+} influx factor (CIF). STIM1 was found to regulate LA-induced CIF production and the opening of store-operated Ca^{2+} (SOC) channels. Furthermore, CD36-positive TBCs from *Stim1*^{-/-} mice failed to release serotonin, and *Stim1*^{-/-} mice lost the spontaneous preference for fat that was observed in wild-type animals. We also demonstrate that the calcium-mediated signaling *via* CD36 is doubly modulated in obesity. The increase in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in taste bud cells observed in *Psammomys obesus*, a model of nutritional obesity is strongly reduced in diet-induced obese (DIO) mice. We also found that the interaction of LA with CD36 induces activation of MAP Kinases MEK1/2/ERK1/2/Elk-1 pathway that is not only responsible for the activation of NTS, arcuate nucleus, and the hippocampus in the brain but also essential for the spontaneous preference for fat food.

Our results suggest for the first time, that ERK1/2 MAPK pathway and lipid-induced calcium signaling controlled by STIM1 are involved in oro-gustatory perception of dietary lipids.

Key-words: *LA, CD36, Circumvallate papillae, PLA2, Stim1, Orai1/3, Lipid taste perception, Serotonin, MAP Kinases, Zif268, BDNF, Glut1, NTS, Arcuate nucleus, Hippocampus.*

Remerciements	3
Résumé	4
Abstract	5
Liste des abréviations	9
Liste des tableaux	11
Liste des Figures	12
INTRODUCTION	13
PREMIÈRE PARTIE : ETAT ACTUEL DES CONNAISSANCES SCIENTIFIQUES	19
Chapitre I : Physiologie du système gustatif	20
1- Rôle du goût	20
2- Papilles gustatives et bourgeons du goût	20
3- Mécanismes de transduction des différentes modalités de goût	22
3-1- Stimulus et modalités des goûts	22
* Goût salé	23
* Goût acide	23
* Goût sucré	23
* Goût amer	23
* Goût umami	23
3-2 Récepteurs du goût	25
4- Voies afférentes et centres gustatifs	25
Chapitre II : Détection des lipides par le système gustatif	28
1- Lipides alimentaires	28
1-1- Groupes de lipides	28
1-2- Sources des lipides alimentaires	29
1-3- Biosynthèse des AGPI	30
1-4- Rôles biologiques des acides gras alimentaires	32
1-4-1- Rôle de lipides de constitution	32
1-4-2- Rôle énergétique	32
1-4-3- Rôle régulateur de l'activité cellulaire	32
1-5- Effets de la consommation des AGPI sur la santé	33
1-5-1- Effets bénéfiques des AGPI de la famille n-3	33
1-5-1-1- Cardio-protecteur	33
1-5-1-2- Anticancéreux	34
1-5-1-3- AGPI et apoptose	34
1-5-1-4- Effets sur le système nerveux central	35
1-5-1-5- AGPI n-3 et acuité visuelle	35
1-5-1-6- Action des AGPI n-3 sur le système immunitaire	35
1-5-2- Effets mitigés des AGPI de la famille n-6	35
1-6- Hydrolyse des lipides alimentaires	36
2- Détection des lipides alimentaires	37
2-1 Comment les acides gras sont-ils détectés ?	38
2-1-1- Canal potassique (Kv1.5) sensible aux acides gras polyinsaturés	38
2-1-2- GPCR activés par les acides gras (GPR120 et GPR40)	39
2-1-3- CD36: un récepteur du goût du gras	40
2-2- Existe-t-il une perception gustative des lipides alimentaires chez l'Homme ?	43
3- Mécanisme de signalisation cellulaire dans les cellules gustatives	44
3-1- Signalisation calcique	44
3-1-1- Déclenchement de la signalisation	45
3-1-2- Entrée du calcium selon le modèle capacitatif	45
3-1-3- La nature des canaux impliqués dans l'influx SOC	46
3-2- Transduction du signal lipidique médié par le CD36 lingual	48

3-3- La signalisation <i>via</i> GPCR	50
3-4- Implication des aires cérébrales dans la perception gustative lipidique	51
Chapitre III : Voies de signalisation des MAPKs	54
1- Voies de signalisation de JNK et p38	54
1-1- Voie JNK	54
1-2- Voie p38	55
2- Voie Ras/Raf/MAPK	56
2-1- L'activation de Ras par les récepteurs à activité tyrosine kinase	57
2-2- La kinase Raf	57
3- Les kinases MEK1 et MEK2	58
3-1- L'activation des MEK	59
3-2- Les inhibiteurs pharmacologiques de MEK et leurs limites	60
4- Les MAPK1/3	61
5- Le contrôle de l'activité des MAPK par les phosphatases	61
6- Localisation des MAPK	62
7- La durée d'activation des MAPK	62
8- Les fonctions de la voie des MAPK	63
8-1- MAPK et prolifération cellulaire	63
8-2- La différenciation cellulaire	63
8-3- La migration cellulaire	63
8-4- Fonctions neuronales	64
9- Les MAPKs jouent-elles un rôle dans la perception du signal gustatif	64
Chapitre IV : Obésité : modèle d'étude	66
1- Obésité induite	66
1-1- Généralités	66
1-2. Les différents types de régime induisant l'obésité	67
1-3- Résistance à l'obésité	68
2- Obésité nutritionnelle : Exemple de <i>Psammomys obesus</i>	69
2-1- Introduction	69
2-2- <i>Psammomys obesus</i>	69
2- 3- Caractéristiques et répartition géographique	70
2-4- Le régime naturel du <i>Psammomys</i>	71
4-5- Aspects écologiques	72
DEUXIÈME PARTIE : APPORTS PERSONNELS	73
Chapitre I : Procédure expérimentale	74
1- Matériels biologiques	74
2- Matériels Chimiques	74
3- Isolement des papilles caliciformes et purification des cellules CD36 positives	75
Chapitre II : Liste des Publications et Communications	78
<i>PUBLICATION N°1</i>	80
STIM1 regulates calcium signaling in taste bud cells and preference for fat in mice	
Objectif de l'étude	80
Article	81
<i>PUBLICATION N°2</i>	97
STIM1 is indispensable for the lingual CD36-mediated Ca²⁺ signaling and spontaneous preference for fat	
Objectif de l'étude	97
Article	98
<i>PUBLICATION N°3</i>	101
Oro-gustatory perception of dietary lipids and calcium signaling in taste bud cells are altered in nutritionally obesity-prone <i>Psammomys obesus</i>	

Objectif de l'étude	101
Article	102
PUBLICATION N°4	129
Obesity alters the gustatory perception of lipids in the mouse: plausible involvement of the lingual CD36	
Objectif de l'étude	129
Article	130
PUBLICATION N°5	163
Ca²⁺ signaling in taste bud cells and spontaneous preference for fat: unresolved roles of CD36 and GPR120.	
Objectif de l'étude	163
Article	164
<i>Résultats non publiés</i>	170
MAP Kinase signaling is involved in oro-gustatory lipid taste perception in mice	
Objectif de l'étude	170
Article en préparation	171
TROISIÈME PARTIE : DISCUSSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES	192
Discussion générale	193
Conclusions & Perspectives	203
Références bibliographiques	206

- **5-HT** : 5-hydroxytryptamine (sérotonine)
- **AA** : acide arachidonique
- **ABT** : aminobenzotriazole
- **AGLC** : acide gras à longue chaîne
- **AGPI** : acide gras polyinsaturé
- **ARC** : *Arachidonic acid Regulated Calcium channel*
- **ARNm** : *Acide ribonucléique ribosomique*
- **ATK** : Arachidonyle cétone trifluorométhyle
- **BAPTA** : *1,2-bis (2-aminophenoxy)-ethane-N, N, N', N'-tetraacetic acid*
- **BDNF** : *brain-derived neurotrophic factor*
- **BEL** : Bromoenol lactone
- **BPB** : 4-bromo bromure de phénacyle
- **[Ca²⁺]_i** : calcium libre intracellulaire
- **CCK** : cholécystokinine
- **CD36** : *Cluster of Differentiation 36*
- **CIF** : *calcium influx factor*
- **cPLA₂** : phospholipase A₂ cytosolique
- **CLA-1** : *CD36 and LIMPII Analogous-1*
- **CRAC** : *Ca²⁺ Release Activated Ca²⁺*
- **DAG** : diacylglycérol
- **DHA** : acide docosahexanoïque
- **EDTA** : Ethylène diamine tétraacétique
- **ELK** : *E twenty-six (ETS)-like transcription factor*
- **EPA** : acide éicosapentaénoïque
- **ERK1/2** : *extracellularly regulated kinases 1/2*
- **FAT/CD36** : *Fatty Acid Transporter/CD36*
- **GLP-1** : *glucagon-like peptide- 1*
- **GPR** : *G protein-coupled receptor*
- **HDL** : *High Density Lipoprotein*
- **HEPES** : *hydroxyethyl piperazineethanesulfonic acid*
- **JNK** : c-Jun N-terminal Kinase
- **IL-n** : Interleukine-n
- **IP₃** : inositol-1, 4, 5-triphosphate
- **IP₃R** : Récepteur à l'IP₃
- **iPLA₂** : phospholipase A₂ calcium indépendante

- **K⁺** : ion potassium
- **KO** : *Knock Out*
- **LA** : acide linoléique
- **LysoPC** : Lyso Phosphatidyl Choline
- **MAP kinase** : mitogen-activated protein kinase
- **MEK**: MAPK-Extracellular-Kinase
- **NTS** : Noyau du Tractus Solitaire
- **OLA** : Acide oléique
- **ORAI**: *Calcium release-activated calcium channel protein 1*
- **PI3K** : Phosphoinositol-3 kinase
- **PIP** : phosphatidyl Inositol-4-phosphates
- **PIP2** : phosphatidylinositol-4,5-biphosphates
- **PLA₂**: phospholipase A₂
- **PTK** : Protéine Tyrosine Kinase
- **RCPG** : Récepteur Couplé à la Protéine G
- **RE** : Réticulum Endoplasmique
- **RT-qPCR** : *Reverse Transcription-quantitative Polymerase Chain Reaction*
- **SAA**: serum amyloid A
- **siRNA** : *small interfering-RNA*
- **SNC**: système nerveux central
- **SOC** : *Stored Operated Calcium Channels*
- **sPLA₂** : phospholipase A₂ sécrétée
- **SR-B1**: Class B scavenger receptors
- **SSO** : sulfo-N-succinimidyle oléate
- **STIM**: *Stromal interaction molecule*
- **TR** : *Taste Receptor*
- **TCR** : *Taste cell Receptor*
- **TG**: thapsigargine
- **TH**: Tyrosine Hydroxylase
- **TLR** : *Toll-like receptor*
- **TNF- α** : *Tumor necrosis factor α*
- **TPH**: Tryptophane Hydroxylase
- **TRP** : Transient Receptor Potential
- **TRPM5** : Transient receptor potential cation channel subfamily M member 5
- **Zif268**: zinc finger family 268

Liste des tableaux

Tableau 1: Classification de l'indice de masse corporelle	14
Tableau 2: Nomenclature des acides gras.....	29
Tableau 3: Teneurs (mg/100g) en acide linoléique et α -linoléique des principales huiles d'origine végétales et animales.....	30

Figure 1: Prévalence de l'obésité dans le monde entier chez les adultes	15
Figure 2: Prévalence de l'obésité dans quelques pays	16
Figure 3: Différentes papilles gustatives	22
Figure 4: Mécanismes de transduction des différentes modalités du goût	24
Figure 5: Récepteur des goûts.	25
Figure 6: Les voies et les centres gustatifs	26
Figure 7: Biosynthèse des acides gras insaturés	31
Figure 8: L'hydrolyse des lipides alimentaires	37
Figure 9: Position et présentation du CD36.....	41
Figure 10: Perception oro-sensorielle des lipides alimentaires chez la souris : modèle de travail AGCL	43
Figure 11: Les trois hypothèses de l'influx SOC	46
Figure 12: La chorégraphie moléculaire de l'activation du canal CRAC	48
Figure 13: Voies probables de transduction du signal lipidique dans la cellule réceptrice gustative chez la souris	49
Figure 14: Rôle du CD36 dans la perception gustative des lipides alimentaires chez la souris	53
Figure 15: La voie des kinases de stress JNK/p38MAPK.....	55
Figure 16: La voie de signalisation Raf/MAPK	56
Figure 17: L'activation de Ras	57
Figure 18: Les trois isoformes de Raf	58
Figure 19: La kinase MEK	59
Figure 20: Les différentes étapes de purification des cellules CD36-positives	76

INTRODUCTION

«Quel que soit le père de la maladie, un mauvais régime en fut la mère.»

Géorge Herbert, poète anglais (1593-1633)

A la fin des années 1990, l'Organisation Mondiale de la Santé déclare : « *l'obésité est devenue un problème de santé publique majeur, encore plus important que la malnutrition et les maladies infectieuses. La prévalence de l'obésité (définie par un Indice de Masse Corporelle (IMC) égal ou supérieur à 30) a augmenté au cours de la dernière décennie de 10 % à 40 % dans la majorité des pays européens, à l'exception de la Finlande, de la Suède et des Pays-Bas. Cette épidémie ne peut être la conséquence de mutations génétiques, mais reflète plutôt des changements profonds de la société et des comportements individuels. Les causes fondamentales de l'obésité sont sociales et résultent d'un environnement toxique qui fait la promotion d'un mode de vie sédentaire et de la consommation d'une alimentation riche en graisse* ».

La surcharge pondérale est habituellement définie en fonction de l'IMC, celui-ci exprimant le rapport entre le poids (en Kg) et la taille (en m), elle-même exposée au carré.

$$\text{IMC} = \frac{\text{Poids (Kg)}}{\text{Taille}^2 \text{ (m)}}$$

Testé à grande échelle, l'IMC le plus favorable pour la santé se situe entre 18,5 et 24,9. En deçà et surtout au-delà de ces chiffres, il est étroitement corrélé à des pathologies multiples. Différents stades de surcharge pondérale sont définis par rapport à l'IMC comme le montre le tableau suivant (Tableau1).

Tableau 1: Classification de l'indice de masse corporelle

Classification en fonction de l'indice de masse corporelle	
Insuffisance pondérale	< 18.5
Éventail normal	18.5 - 24.9
Surpoids	≥ 25.0
Préobésité	25.0 - 29.9
Obésité	≥ 30.0
Obésité, classe I	30.0 - 34.9
Obésité, classe II	35.0 - 39.9
Obésité, classe III	≥ 40.0

D'après « World Health Organisation »

Autrefois considérés comme des problèmes propres aux pays à hauts revenus, le surpoids et l'obésité augmentent de façon spectaculaire dans les pays à faibles ou moyens revenus, surtout en milieu urbain. A l'échelle mondiale, 2,8 millions de personnes au moins décèdent chaque année du fait de leur surpoids ou de leur obésité. Globalement, plus d'un adulte sur 10 dans le monde était obèse et environ 40 millions d'enfants de moins de cinq ans présentaient un surpoids en 2011. Plus de 75 % d'enfants présentant un surpoids habitent dans des pays en développement et 25 % dans des pays développés. Cette augmentation se poursuit. Plus de 55 % des Européens et 70 % des Américains, tous âges confondus, sont actuellement en surpoids, dont 10 % à 30 % d'obèses (Figures 1 et 2).

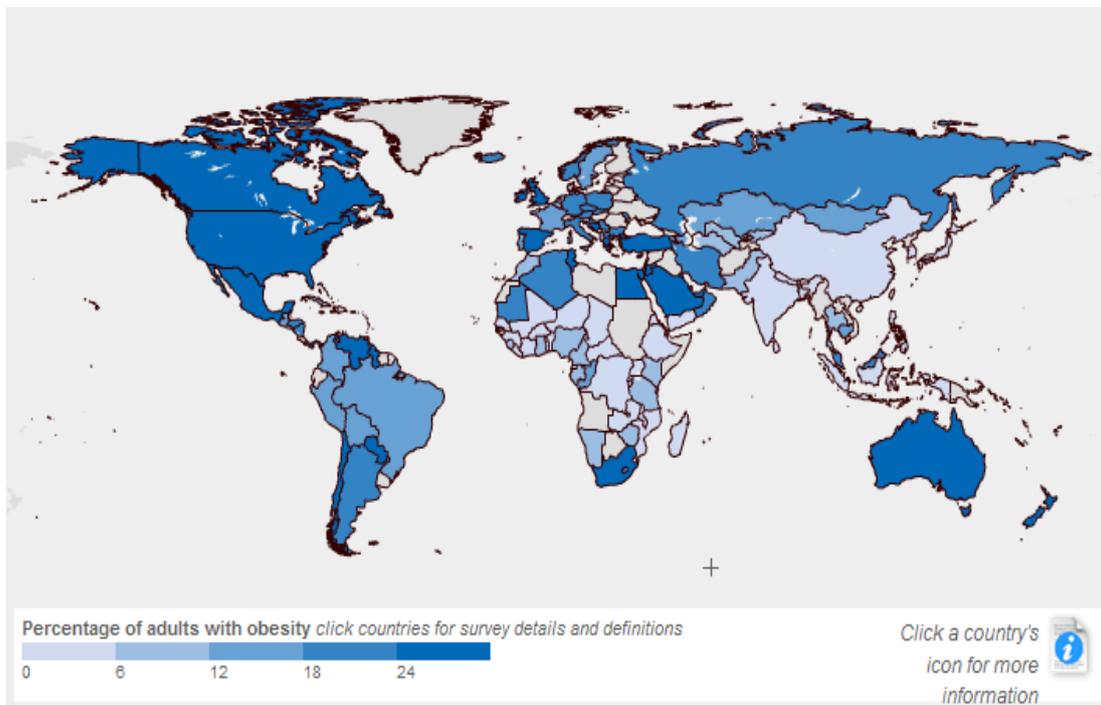


Figure 1: Prévalence de l'obésité dans le monde entier chez les adultes

D'après « the International Obesity Task force »

Prévalence de l'obésité
 Pourcentage de la population dont l'IMC
 est supérieur ou égal à 30

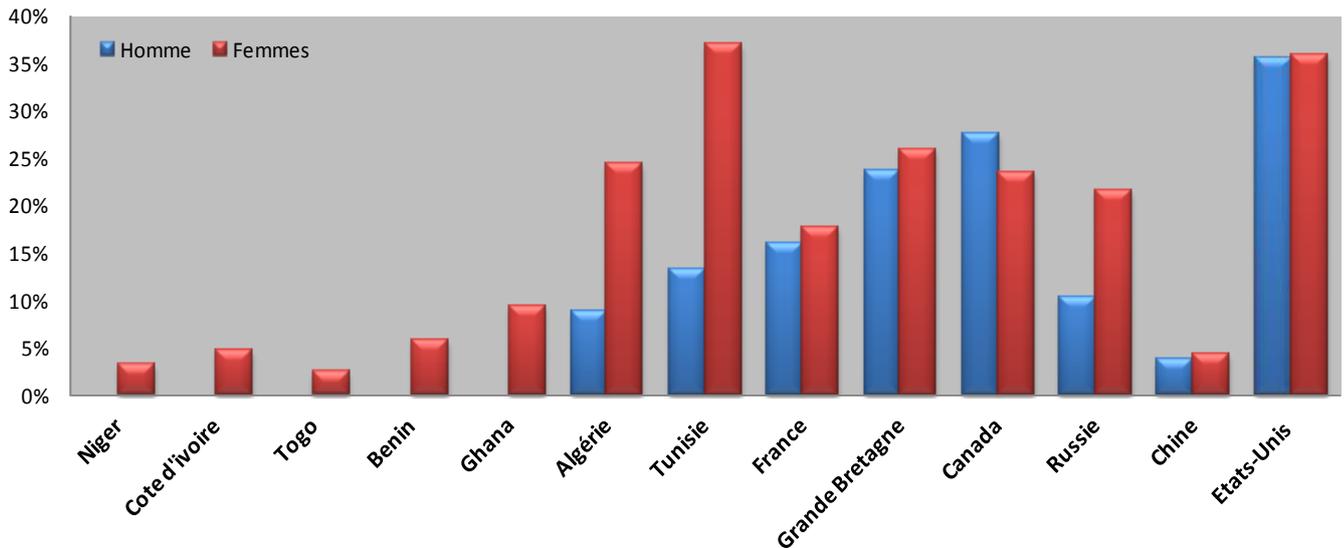


Figure 2: Prévalence de l'obésité dans quelques pays

(Les chiffres sont tous postérieurs à 2003, sauf pour la Côte d'Ivoire et le Togo qui datent de 1998)

D'après « the International Obesity Task force »

L'une des causes fondamentales de l'obésité et du surpoids est un déséquilibre énergétique entre les calories consommées et dépensées. Au niveau mondial, on a assisté à une plus grande consommation d'aliments très caloriques riches en graisses. En effet, dans le régime occidental, les lipides alimentaires représentent près de 40% des apports caloriques journaliers alors que les recommandations nutritionnelles sont plus faibles de 5 à 10%. Cet excès de consommation des lipides, associé à un déséquilibre qualitatif (excès d'acides gras saturés et de cholestérol, rapport des acides gras polyinsaturés $\omega 6/\omega 3$ trop élevé), participe, sans nul doute, à l'augmentation de la prévalence de l'obésité et des pathologies associées (atteintes vasculaires, diabète de type II, hypertension, cancers, etc...). Chez l'homme, des études ont montré que certains sujets obèses ont une préférence des lipides alimentaires par rapport aux sujets minces (Drewnowski *et coll.*, 1985 ; Mela *et coll.*, 1991), ce qui suggère que la consommation inappropriée des lipides pourrait influencer le risque d'obésité. Cette attirance pour les corps gras n'est pas spécifique à l'homme. Des études comportementales indiquent clairement que les rats et les souris présentent également une préférence spontanée pour les boissons et les aliments enrichis en lipides (Tsuruta *et coll.*, 1999 ; Takeda *et coll.*; 2000). L'origine de cet attrait est encore mal connue. Jusqu'à une période récente, on pensait que seules la texture et l'odeur des lipides étaient responsables de leur perception orosensorielle. En effet, les perceptions tactiles (le crémeux, l'onctuosité) et olfactives augmentent la palatabilité de l'aliment et donc le plaisir de le consommer. Cette vision restrictive a été récemment battue en brèche par une série d'études comportementales réalisées notamment chez les humains et les rongeurs montrant que la préférence pour les lipides dépend également de leur

perception gustative (Stratford *et coll.*, 2006 ; Gaillard *et coll.*, 2008, Steward *et coll.*, 2010 ; Drewnowski *et coll.*, 1985 ; Mela *et coll.*, 1988). Le fait que cette attirance spontanée soit indépendante de la texture, de la perception olfactive et des régulations métaboliques post-ingestives (Takeda *et coll.*, 2001 ; Fukawatari *et coll.*, 2003) suggère l'existence d'un système orosensoriel dédié à la reconnaissance des lipides alimentaires.

En théorie, la perception orale des lipides requiert la présence d'un détecteur/récepteur au niveau des cellules neurosensorielles des bourgeons du goût. Ainsi Fukuwatari *et coll.*, et Laugerette *et coll.*, ont rapporté que la protéine CD36 (Cluster of Differentiation 36), également appelée Fatty Acid translocase (FAT), présente les caractéristiques structurales et fonctionnelles requises pour être un lipido-récepteur gustatif. En effet, cette protéine membranaire, qui lie les AGLC avec une très haute affinité (Baillie *et coll.*, 1996), a été identifiée au niveau de la papille caliciforme chez le rat (Fukuwatari *et coll.*, 1997) et chez la souris (Laugerette *et coll.*, 2005). Ces derniers auteurs ont fourni la première preuve que les cellules des papilles caliciformes exprimant CD36 joueraient un rôle important dans la perception des lipides alimentaires chez la souris. Ainsi, l'inactivation du gène CD36 abolit totalement la préférence spontanée pour les acides gras à longue chaîne observée chez les souris. Cet effet est spécifique aux lipides, puisque la préférence pour le sucré et l'aversion pour l'amertume dans les contrôles n'ont pas été modifiées chez les souris CD36-KO. Ces observations sur l'implication de CD36 dans la perception du goût des lipides alimentaires sont confirmées par Sclafani *et coll.* (2007). La preuve expérimentale du rôle de la protéine CD36 dans la perception des acides gras alimentaires a été récemment apportée par Pepino *et coll.* (2012).

Au sein de notre équipe, il a été démontré que, dans les cellules gustatives lipidiques de souris, la liaison des AGLC avec le CD36 déclenche son activation qui induirait une cascade de signalisation. La conséquence de l'activation du CD36 par un acide gras à longue chaîne (AGLC) est l'augmentation du calcium libre intracellulaire ($[Ca^{2+}]_i$) (Gaillard *et coll.*, 2008) *via* les canaux calciques SOC (*stored operated calcium channels*) en réponse à une déplétion des réserves de calcium (El-Yassimi *et coll.*, 2008). ***Cependant, comment ces canaux sont-ils activés ? La question reste posée. En effet, l'ensemble des mécanismes impliqués dans la signalisation déclenchée par les AGLC, lors de l'activation des cellules gustatives qui expriment CD36, n'a pas encore été complètement élucidé. Par conséquent, cette étude est menée afin de caractériser les canaux et autres éléments impliqués dans cette signalisation calcique induite par les AGLC via CD36.***

Dans cette thèse, nous avons aussi étudié la modulation de la signalisation calcique dans des situations d'obésité. Ainsi, nous avons travaillé sur deux modèles de l'obésité : l'obésité

*induite par un régime riche en gras et l'obésité nutritionnelle qui apparaît avec le temps chez le *Psammomys obesus* sous régime standard de laboratoire.*

En réponse à un stimulus, les voies de signalisation des MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase) permettent l'engagement rapide d'expression génique. Ces voies de signalisation sont constituées de protéines kinases qui s'activent en cascade et transmettent le signal par une suite d'interactions entre protéines. Les voies de signalisation des MAPK, comme celles de p38 (ERK6, SAPK3), de JNK et de MAPK1/3 (ERK1/2) peuvent donc jouer un rôle important dans le stimulus induit par CD36 lingual. En effet, dans les cellules HEK293, transfectées par un plasmide contenant le CD36, l'activation du CD36 induit la phosphorylation des ERK1/2 (Baranova *et coll.*, 2010). Le même phénomène est observé dans les mêmes conditions dans les cellules monocytaires (Baranova *et coll.*, 2005). Une dernière étude a encore renforcé l'idée du couplage entre le CD36 et les MAP Kinases dans les cellules CHO où la phospholipase A₂ est activée par la phosphorylation des ERK1/2 *via* un mécanisme CD36-dépendant (Kuda *et coll.*, 2011). *Partant du fait que dans les cellules neuronales, l'activation des MAP Kinases facilite l'exocytose des neurotransmetteurs et augmente le recyclage des vésicules (Bloch-Schilderman et coll., 2001), il est possible que, dans les cellules gustatives, le CD36 soit couplé à l'activation des MAP Kinases, particulièrement des ERK1/2.* Ainsi dans ce contexte, *nous nous sommes intéressés à savoir si les AGLC induisent, via CD36, l'activation des MAP Kinases dans les cellules gustatives des papilles caliciformes et de voir si leur phosphorylation est impliquée dans l'activation de différentes aires cérébrales du système nerveux (le noyau arqué, l'hippocampe et le noyau du tractus solitaire) pour ainsi favoriser la perception oro-gustative des lipides alimentaires.*

Dans cette étude, **la première partie** permettra d'aborder l'état actuel des connaissances scientifiques sur la physiologie du système gustatif, sa détection des lipides, son mécanisme de signalisation cellulaire, le rôle des MAPKs dans la perception et la transduction du signal gustatif et enfin la relation entre l'obésité et la perception gustative lipidique en étudiant quelques modèles d'étude de l'obésité. Puis **la deuxième partie** se consacrera aux publications issues des résultats de nos travaux. Ainsi **la troisième partie** présentera la discussion des différents résultats publiés dans les articles, les conclusions et les perspectives qu'offrent les résultats de nos expériences.

PREMIÈRE PARTIE

***ETAT ACTUEL DES CONNAISSANCES
SCIENTIFIQUES***

Chapitre I

Physiologie du système gustatif

L'homme est en permanence stimulé par des molécules chimiques libérées dans l'environnement. Celles-ci sont détectées par des récepteurs qui sont des chémoccepteurs. Elles sont détectées soit à la suite d'un contact direct, c'est comme cela que fonctionne la gustation, soit à distance, comme pour l'olfaction. Ces deux sens sont globalement appelés sens chimiques. Chez l'homme, le système gustatif est très développé du fait que, l'homme étant omnivore, il doit reconnaître une grande palette de goûts différents. D'un point de vue phylogénétique, le système gustatif est issu des systèmes sensoriels primitifs. Si actuellement, le système gustatif sert essentiellement à goûter, originellement, il participait au comportement complexe de recherche de nourriture.

1- Rôle du goût

Les hommes sont omnivores et, dès le début, ils ont du faire la différence entre des nourritures potentielles et toxiques. Ils ont donc, pour assurer leur survie, développé un système de la détection du goût performant. La réaction d'éviter les substances amères ou acides vient du fait que la plupart des substances amères sont mauvaises pour l'organisme (poisons) et que la nourriture avariée devient acide. Goûter protège ainsi contre les poisons.

D'un autre côté, nous aimons le goût du sucré parce que l'organisme a un besoin absolu d'hydrates de carbone (sucres, etc.). De même, le goût pour le sel vient du fait que nous devons avoir du chlorure de sodium (sel commun) dans notre régime. Enfin, nous avons un besoin absolu de protéines, et les acides aminés sont les constituants des protéines ; c'est le rôle des récepteurs à l'umami.

2- Papilles gustatives et bourgeons du goût

Les bourgeons du goût sont situés dans toute la cavité buccale, sur l'épithélium dorsal de la langue (l'organe du goût principal) où ils sont les plus nombreux (4600 bourgeons, tous types confondus sur la langue), dans le pharynx, l'épiglotte laryngée et à l'entrée de l'œsophage. Les bourgeons du goût sont des agrégations de 30 à 100 cellules réceptrices neuroépithéliales, allongées (50-60 microns de hauteur, 30-70 microns de largeur), qui sont incluses dans les spécialisations de

Chapitre I : Physiologie du système gustatif

l'épithélium environnant, nommées des papilles. À l'apex du bourgeon du goût, des microvillosités dépassent dans le milieu buccal par une petite ouverture, le pore de goût. Juste au-dessous de l'apex du bourgeon de goût, les cellules du goût sont connectées par des jonctions serrées. Les cellules réceptrices des bourgeons du goût sont soutenues par des cellules basales qui jouent un rôle dans la transmission de l'information et dans le renouvellement des récepteurs. À la base du bourgeon du goût, les dendrites des neurones secondaires envahissent le bourgeon et se ramifient fortement, chaque fibre faisant synapse avec les multiples cellules réceptrices (Figure 3). Il existe quatre grands types de papilles :

- **Les papilles fungiformes** sont situées sur la partie la plus antérieure de la langue et contiennent généralement un à plusieurs bourgeons de goût par papille. Ils sont innervés par la corde du tympan, branche du nerf facial (VII). Ils sont responsables des goûts salé et sucré. Ces papilles apparaissent comme des taches rouges sur la langue parce qu'elles sont fortement vascularisées. Il y a environ 200 papilles fungiformes sur la langue qui totalisent environ 1120 bourgeons du goût. Les papilles à l'avant de la langue ont plus de cellules du goût comparés à la mi-région.

- **Les papilles foliées** sont situées sur le bord postérieur de la langue. Elles sont principalement sensibles au goût acide. On compte entre 5 et 6 papilles foliées par côté de la langue, qui comprennent chacune environ 120 bourgeons qui sont innervées par le nerf glossopharyngien (IX).

- **Les papilles caliciformes** sont des grosses papilles entourées d'un sillon les séparant du mur environnant. Elles forment le V lingual. Les bourgeons sont situés sur le bord interne du sillon des papilles, et confèrent une sensibilité à l'amer au 2/3 postérieur de la langue. Ils sont innervés par le nerf glossopharyngien (IX). On compte de 3 à-9 papilles caliciformes sur la langue, avec 250 bourgeons du goût par papille chez la souris.

- On décrit également des **papilles filiformes**, qui ont un rôle mécanique et non-gustatif.

En outre il y a 2500 bourgeons de goût sur l'épiglotte, le pharynx palatin et, laryngé. Le nombre de bourgeons de goût diminue avec l'âge

Autres cellules des papilles

On trouve également d'autres cellules au niveau des papilles:

Les cellules support, qui contiennent les microvillosités, semblent sécréter des substances dans la lumière du bourgeon de goût.

Les cellules basales, qui jouent un rôle dans la transmission de l'information, se différencient en de nouvelles cellules réceptrices. Elles sont dérivées de l'épithélium environnant. Les cellules réceptrices sont ainsi, sans interruption, remplacées tous les 10 jours.

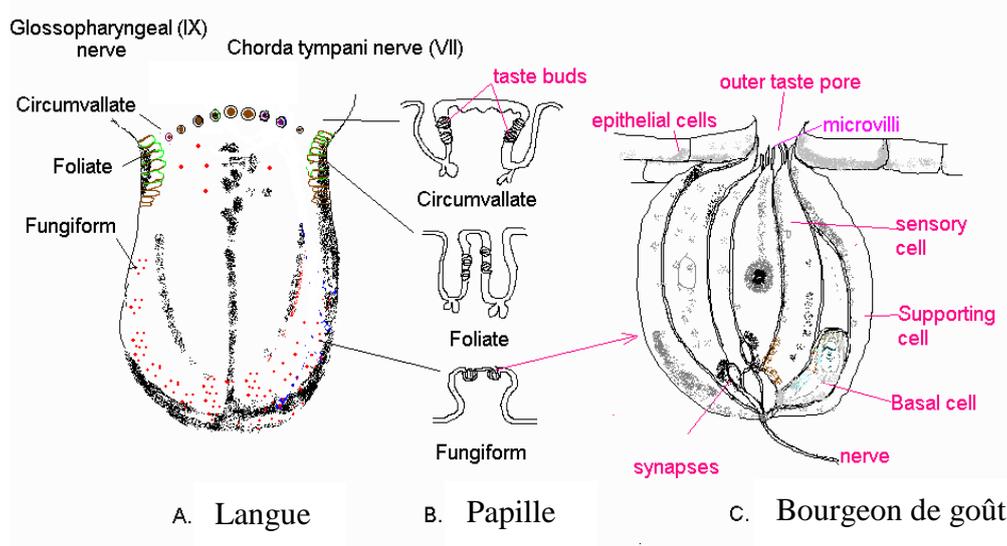


Figure 3: Différents types de papilles gustatives : cette Figure montre les papilles gustatives (à gauche) - il ya des papilles fongiformes, foliates et caliciformes. Les papilles gustatives sont situées sur les papilles du goût (partie médiane). A la base du bourgeon du goût, des axones afférents envahissent l'œuf et se ramifient largement, chaque fibre nerveuse forme une synapse généralement avec les cellules réceptrices multiples au sein du bourgeon du goût.

3- Mécanismes de transduction des différentes modalités de goût

3-1- Stimulus et modalités des goûts

Le stimulus activant les récepteurs du goût sont des molécules de substances organiques et inorganiques, principalement non volatiles, et solubles dans la salive. La source du stimulus doit être proche ou en contact direct avec les récepteurs. Le nombre de stimuli discernables est faible (cinq), et la sensibilité absolue est assez faible (il faut en moyenne plus de 10^{16} molécules par ml pour assurer une détection). Le goût est un sens de contact.

Le nombre des substances chimiques est infini et donc la variété des saveurs incalculable. Il semble que nous ne reconnaissons que quelques goûts de base. On en décrit classiquement quatre qui sont le salé, l'acide, le sucré et l'amer. On décrit maintenant chez l'homme un cinquième goût, moins familier, l'umami, qui signifie « délicieux » en japonais, et qui est en fait le goût du glutamate (le glutamate de sodium est utilisé en cuisine japonaise). La correspondance entre la chimie et le goût est généralement évidente (les acides sont acides, les sels salés, les sucres sucrés), mais ce n'est pas toujours vrai. Le sel (NaCl) peut paraître sucré à faible concentration, des acides aminés peuvent être très sucrés (comme l'aspartame, constitué de deux acides aminés). Les seuils de détection de ces substances varient en fonction de la molécule considérée. Ainsi, la quinine, amère, est détectée à partir d'une concentration de 8 mM alors que la saccharine, sucrée, est détectée à partir d'une concentration de 23 mM.

Pour pouvoir être perçues les substances doivent être dissoutes dans la salive. Celle-ci

Chapitre I : Physiologie du système gustatif

contient une protéine capable de se combiner à de nombreuses substances, et ainsi capable de transporter ces substances jusqu'aux récepteurs sensoriels où s'opère la transduction.

*** Goût salé**

La transduction des stimulations par les substances salées (NaCl) s'effectue directement à partir du passage d'ions Na^+ au travers de la membrane des cellules réceptrices. L'entrée de Na^+ induit une dépolarisation, qui entraîne l'entrée de Ca^{2+} par les canaux calciques voltage-dépendant, qui mobilise et libère le neurotransmetteur à la base de la cellule.

*** Goût acide**

Le goût acide provient des protons (H^+). Les ions H^+ entrent directement au travers de la membrane des cellules réceptrices, sans intervention de récepteurs membranaires spécifiques. Ils bloquent alors les canaux voltage-dépendant (Na^+ , Ca^{2+} et K^+). La répartition de ces canaux à la surface de la membrane des cellules est telle que les canaux potassiques, localisés à la région apicale, sont plus facilement bloqués que les canaux Na^+ et Ca^{2+} localisés au pôle basolatéral. Les ions H^+ agissent donc essentiellement en fermant les canaux potassiques, ce qui provoque une dépolarisation de la cellule, une entrée de calcium et la libération des neuromédiateurs. (Huang *et coll.*, 2006).

*** Goût sucré**

Les substances sucrées (glucose, sucrose et autres hydrates de carbone) se combinent à des récepteurs membranaires spécifiques de type « récepteur à second messenger ». La liaison aux récepteurs membranaires provoque l'activation d'une adényl cyclase, ce qui augmente le taux intracellulaire d'AMPc qui va provoquer la fermeture d'un canal potassique, normalement ouvert au repos, ce qui entraîne une dépolarisation de la cellule. La dépolarisation induite entraîne une entrée de calcium et la libération des neuromédiateurs (Chandrashekar *et coll.*, 2006).

*** Goût amer**

Les substances amères agissent sur des récepteurs spécifiques qui provoquent la mobilisation du Ca^{2+} des réserves intracellulaires, soit par la voie de l' IP_3 , soit par celle de l'AMPc. Cette augmentation du taux intracellulaire de calcium provoque alors la libération des neuromédiateurs au pôle basal du récepteur.

*** Goût umami**

Le goût umami est celui de certains acides aminés (par exemple glutamate, aspartate et les composés dérivés). Il a d'abord été identifié par Kikunae Ikeda à l'Université impériale de Tokyo en 1909. Il a été montré que le récepteur métabotropique du glutamate (mGluR4) médie le goût umami (Chaudhari *et coll.*, 1996; Kurihara & Kashiwayanagi, 1998). Le glutamate se fixe sur un récepteur

Chapitre I : Physiologie du système gustatif

métabotropique du glutamate (mGluR4) et active une G-protéine, ce qui élève le taux de Ca^{2+} intracellulaire. Plus récemment, il a été constaté que les récepteurs T1R1 et T1R3 sont impliqués dans le goût umami (Nelson *et coll.*, 2002). Le glutamate monosodique, qui est ajouté à beaucoup de nourriture pour augmenter leur goût (et qui est l'ingrédient principal de la sauce de soja), stimule ainsi ces récepteurs. Mais, il existe également les récepteurs ionotropiques du glutamate (ou récepteurs NMDA, liés à un canal sodique). Une fois activés par ces composés au goût d'umami, les canaux sodiques s'ouvrent, dépolarisant de ce fait la cellule, entraînant l'ouverture des canaux calciques voltage-dépendant, et donc la libération des neurotransmetteurs.

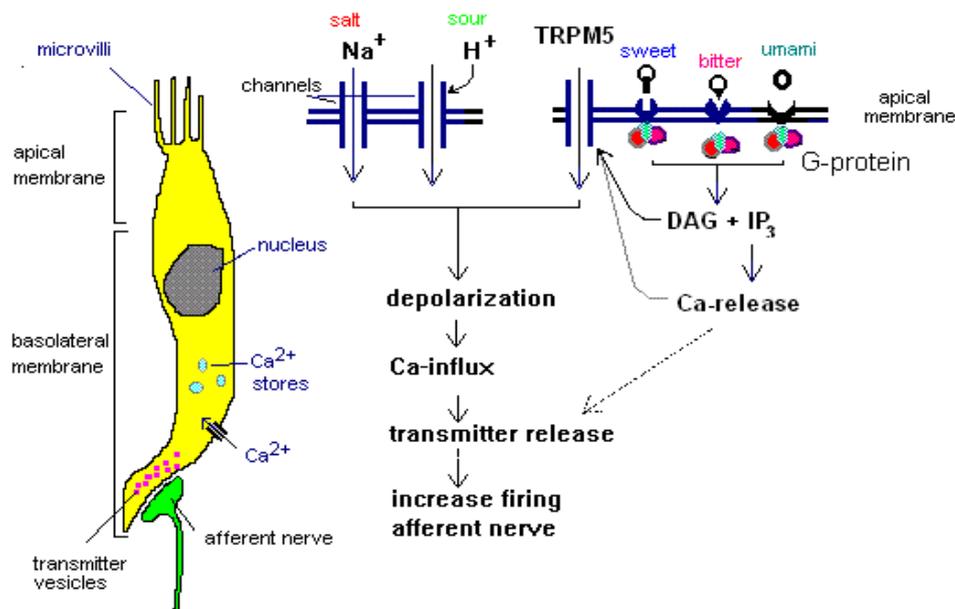


Figure 4: Mécanismes de transduction des différentes modalités du goût

La réflexion actuelle (en 2008), est que le goût sucré, umami et, amer convergent sur une voie de transduction commune, le canal de transient receptor potential M5 (TRPM5), via la phospholipase C (PLC) (Figure 4). TRPM5 est un TRP (*transient receptor potential*) nouvellement découvert, lié à d'autres canaux dans le système de signalisation sensorielle (Chandrashekar *et coll.*, 2006). Il a été montré (Zhang *et coll.*, 2003) que PLC, un effecteur majeur de signalisation aux récepteurs couplés aux protéines G (RCPG), et TRPM5 sont co-exprimés avec T1Rs et T2RS et sont vitaux pour la transduction du goût sucré, umami et amer. L'activation des récepteurs T1R ou T2R, par leurs molécules sapides respectives, stimulerait les protéines G, et à son tour, PLC (PLC- β 2). L'activation de la PLC génère deux messagers intracellulaires : IP_3 et diacylglycérol (DAG), à partir de l'hydrolyse du phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PIP_2), ouvrent le canal TRPM5, ce qui entraîne la dépolarisation potentiel du récepteur.

3-2 Récepteurs du goût

Les récepteurs du goût sont localisés sur la langue. Chaque récepteur est innervé par une ramification d'une fibre nerveuse afférente, laquelle donne de nombreux filets qui vont faire synapse avec de nombreuses cellules réceptrices appartenant à différents bourgeons du goût de différentes papilles. Les informations provenant des deux tiers antérieurs de la langue sont transmises par la corde du tympan, une branche du nerf facial (VII). Les informations provenant des récepteurs du tiers postérieur sont transmises par des fibres du nerf glossopharyngien (IX). Les récepteurs des goûts sucrés, umami et amer ont été clonés (Liao *et coll.*, 2003). Un résumé des différents types de récepteurs responsables de chacune des cinq modalités du goût est donné ci-dessous (Figure 5). Les récepteurs amers expriment T2Rs (*taste receptor*, TR), ils sont exprimés en petit sous-ensembles dans toutes les papilles de goût, mais fortement dans les papilles caliciformes. Les récepteurs au goût sucré et umami sont composés d'une combinaison de différentes sous unités, codées par une petite famille de gènes T1R (T1R2+3 pour le sucré, (Nelson *et coll.*, 2001) et T1R1+3 pour l'umami, (Nelson *et coll.*, 2002)). Umami est aussi médié par les récepteurs mGluR4. Le récepteur au sel (canal épithélial de sodium (Na)) est exprimé de manière omniprésente, mais est seulement fonctionnel sur la langue antérieure. Le goût acide ne passe pas par un récepteur, mais provient de l'entrée directe de H⁺ dans la cellule, soit en passant par des canaux sodiques, soit par un canal de proton.

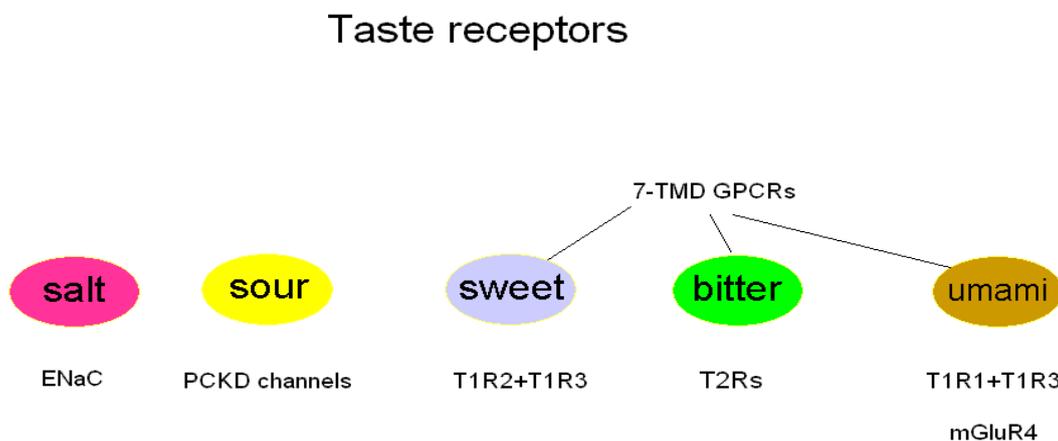


Figure 5: Récepteur des goûts : Un résumé des différents types de récepteurs responsables de chacune des cinq modalités de goût. Chandrashekar *et coll.* (2006).

4- Voies afférentes et centres gustatifs

Les cellules réceptrices du goût n'ont pas d'axone. Elles libèrent un neuromédiateur qui fait décharger les dendrites du neurone secondaire. L'information est transmise ensuite *via* les cellules des ganglion des nerfs crâniens VII (corde du tympan, une branche du facial) et IX

Chapitre I : Physiologie du système gustatif

(glossopharyngé). Les informations gustatives sont transmises, depuis les récepteurs gustatifs jusqu'au noyau du tractus solitaire (NTS), dans le bulbe, où elles font un premier relais, puis de là elles montent jusqu'à la région gustative du gyrus post central, après avoir fait relais dans le noyau ventral postérieur médian (VPM) du thalamus (Figure 6). L'aire de projection des informations gustatives se situe en position ventrale antérieure de la représentation somesthésique de la langue. Cependant, contrairement aux informations somesthésiques, les informations gustatives se projettent sur le cortex homolatéral et non controlatéral. Il existe une zone gustative primaire, située au dessus d'une zone gustative secondaire. L'information est également transmise à l'hypothalamus, à l'amygdala et à l'insula, donnant la composante affective du goût, responsable des réponses comportementales, par exemple aversion, sécrétion gastrique. Le décodage central des informations s'effectue, comme pour les autres systèmes sensoriels, par une intégration entre les informations provenant de plusieurs fibres sensorielles, elles-mêmes sensibles à différents composés. En particulier, les sensations olfactives et gustatives sont étroitement liées, et jouent un rôle important dans le contrôle de la prise de nourriture et de boisson, et donc dans la survie (à titre d'exemple, la recherche de substances salées devient particulièrement importante lors d'un dysfonctionnement des glandes cortico-surrénales).

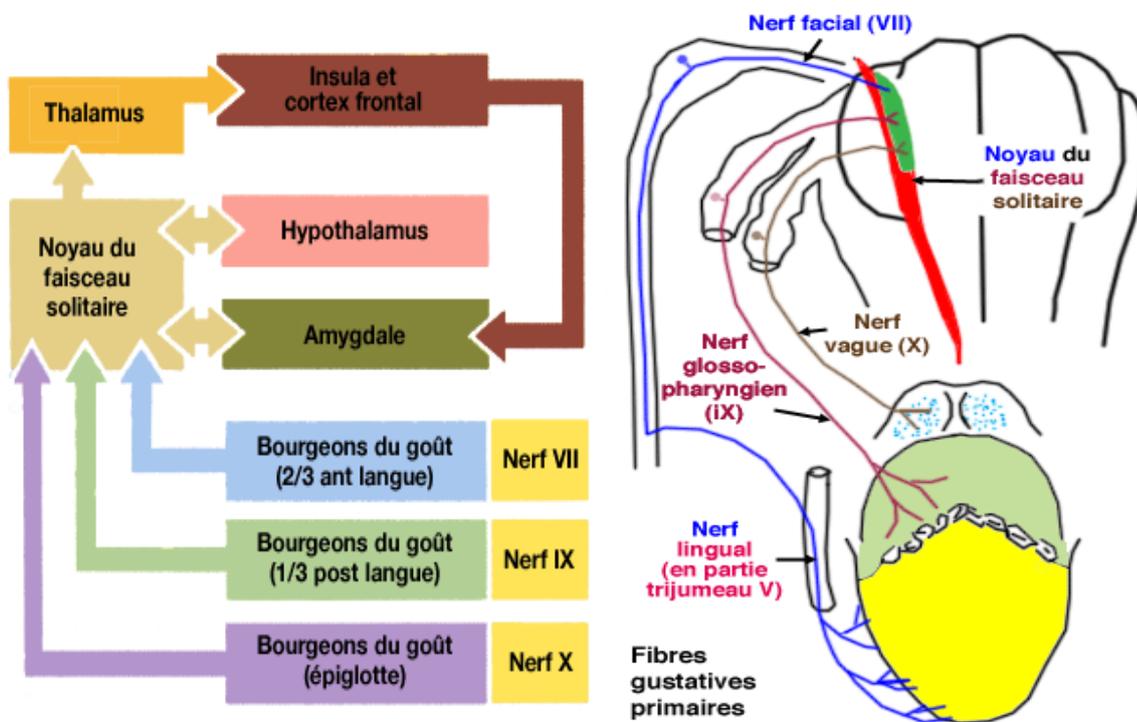


Figure 6: Les voies et les centres gustatifs : Chaque cellule gustative transmet de l'information à plusieurs fibres afférentes amyéliniques, et chacune de ces dernières reçoit de l'information de plusieurs cellules sensorielles. Les fibres gustatives cheminent dans trois nerfs crâniens :

Chapitre I : Physiologie du système gustatif

- Les fibres gustatives du nerf facial (VII) innervent les récepteurs des papilles fungiformes et foliées des deux tiers antérieurs de la langue. Ces fibres empruntent la corde du tympan.
- Les fibres du nerf glosso-pharyngien (IX) innervent, par les rameaux linguaux, le tiers caudal de la langue et de la muqueuse pharyngienne et sensorielle, en particulier les papilles circumvallées (caliciformes).
- Les fibres du nerf vague (X), par l'intermédiaire des rameaux pharyngés, assurent: l'innervation des bourgeons gustatifs de la gorge, la glotte, l'épiglotte et le pharynx et, l'innervation sensitive des muqueuses trachéale, oesophagienne et épiglottique.

Les prolongements centraux de ces trois neurones pénètrent dans le bulbe pour se terminer dans le noyau gustatif, partie du noyau du faisceau solitaire. Kahle *et coll.* (1998).

Chapitre II

Détection des lipides par le système gustatif

De très nombreux signaux sont générés par l'apport de nutriments à l'organisme. Il faut distinguer différents niveaux d'intégration des signaux associés à la perception des nutriments. Certains signaux sont générés avant même que les aliments ne soient ingérés (perception visuelle), d'autres signaux sont issus de l'interaction des nutriments avec des récepteurs qui sont localisés au niveau lingual. Il existe de plus un retentissement des signaux générés par la détection des nutriments ou leur métabolisme au niveau d'un organe, sur la fonction d'autres organes. Ainsi, la plupart des signaux générés depuis la bouche contribuent à informer l'organisme et, en particulier, le système nerveux central, l'intestin, de la quantité et de la qualité des nutriments ingérés, ce qui aboutira à la perception des sensations de rassasiement et de satiété.

L'objectif de ce chapitre est de faire le point sur ce que l'on sait actuellement des différents systèmes moléculaires et des acteurs impliqués dans la détection des lipides alimentaires. Dans les études rapportées ci-dessous, les lipides concernés ont été étudiés individuellement, selon la séquence d'étude : un lipide, un récepteur ou un stimulus, un médiateur, et n'ont pas pris en compte le mécanisme d'action des lipides et toute la signalisation qui en découle.

1- Lipides alimentaires

1-1- Groupes de lipides

Les lipides sont classés en six groupes, les triglycérides, les glycéro-phospholipides, les sphingolipides, les terpénoïdes, les stérols et stéroïdes, et enfin, les acides gras selon la classification de Hennen (1995). Les acides gras sont des acides carboxyliques à chaîne aliphatique hydrophobe, saturés ou non. Les acides gras sont constitués d'une chaîne hydrocarbonée de longueur variable et d'un groupement carboxylique à une des extrémités. La formation des phospholipides et des triglycérides est rendue possible grâce à la fonction carboxyle qui permet une liaison ester entre l'acide gras et les groupements hydroxyles du glycérol, squelette de base des triglycérides et des phospholipides. La chaîne hydrocarbonée des acides gras peut contenir une ou plusieurs doubles liaisons, les insaturations.

La nomenclature des acides gras est définie par la longueur de la chaîne carbonée, le nombre d'atomes de carbone et le nombre de doubles liaisons (insaturations). La famille est identifiée par

Chapitre II : Détection des lipides par le système gustatif

le sigle *n*- ou *ω*- suivi d'un chiffre indiquant la position de la première double liaison par rapport à l'extrémité méthyle (-CH₃) de la chaîne de carbone. Il existe quatre familles d'acides gras insaturés : la famille *n*-9, *n*-7, *n*-6 et *n*-3. (Tableau 2).

Tableau 2: Nomenclature des acides gras

Nbe de C	Nbe de dl°	Dénomination	Nom commun	Formule abrégé
4	0	Butanoïque	Butyrique	C4:0 (beurre, rumen)
6	0	Héxanoïque	Ac caproïque	C6:0
8	0	Octanoïque	Caprylique	C8:0
10	0	Décanoïque	Ac caprique	C10:0
12	0	Dodécanoïque	Ac laurique	C12:0 (huile de coco)
14	0	Tétradécanoïque	Ac myristique	C14:0
16	0	Héxadécanoïque	Ac palmitique	C16:0 (huile de palme)
16	1	<i>cis</i> -9 héxadécénoïque	Ac palmitoléique	C16:1
18	0	Octadécanoïque	Ac stéarique	C18:0
18	1	<i>cis</i> -9 octadécénoïque	Ac oléique	C18:1 ^{Δ9} ou C18:1 ω9 (huile d'olive)
18	2	<i>cis</i> -9-12 octadécadiénoïque	Ac linoléique	C18:2 ^{Δ9,12} ou C18:2, ω6
18	3	<i>cis</i> -9-12-15 Octadécatriénoïque	ac α -linoléique	C18:3 ^{Δ9,12,15} ou C18:3, ω3
20	0	Eicosanoïque	Ac arachidique	C20:0 (arachide)
20	4	ttes <i>cis</i> -5,8,11,14eicosatétraénoïque	Ac arachidonique	C20:4 ^{Δ5,8,11,14} ou C20:4, ω6
20	5	ttes <i>cis</i> -5,8,11,14,17 Eicosapentaénoïque	Ac EPA	C20:5 ^{Δ5,8,11,14,17} ou C20:5, ω3
22	1	<i>cis</i> 13- docosénoïque	Érucique	C22:1 ^{Δ13} (colza, moutarde)
22	6	Ttes <i>cis</i> 4,7,10,13,16,19 docosahexaénoïque (DHA)	ac cervonique ou DHA	C20:6 ^{Δ4,7,10,13,16,19} ou C20:6, ω3 (huile de poissons)
24	0	Tétracosanoïque	Lignocérique	C24:0 (cerveau)
	1	Cis 15-tétracosénoïque	Nervonique	C24:1 ^{Δ15} (cerveau)

1-2- Sources des lipides alimentaires

Les lipides alimentaires sont présents dans divers produits d'origine animale, les produits laitiers entiers ou partiellement écrémés (beurre, crème, fromage...), dans les viandes (bœuf, agneau, porc...), la charcuterie, et certains poissons (saumon, thon, anguille, anchois...). Les produits d'origine végétale contenant des lipides sont les oléagineux (amandes, noix, arachides...), mais aussi certains fruits ou légumes, comme l'avocat, sont riches en lipides. L'huile, qu'elle soit végétale ou animale, est constituée entièrement de lipides. De nombreux produits industrialisés, biscuits, gâteaux, confiseries, viennoiseries, fritures, hamburgers, pizzas et plats préparés en général sont très riches en lipides.

Chapitre II : Détection des lipides par le système gustatif

En ce qui concerne les deux principales familles d'acides gras alimentaires, *n-6* et *n-3*, les AGPI de la famille *n-6* proviennent essentiellement des huiles végétales et animales (Tableau 3). Les huiles de maïs, noix, tournesol contiennent 50 à 70 % d'acide linoléique (C18:2n-6). Quant à l'acide α -linoléique (C18:3n-3), il est contenu essentiellement dans les huiles de soja, de colza et de noix. L'acide α -linoléique peut être synthétisé dans les chloroplastes de phytoplancton. Lorsqu'il est consommé par les poissons, il est transformé, par une série de réactions de désaturation et d'élongation, en EPA puis en DHA.

Tableau 3: Teneurs (mg/100g) en acide linoléique et α -linoléique des principales huiles d'origine végétale et animale. Martin *et coll.* (2001).

Origine alimentaire (végétale et animale)	Acides gras essentiels (mg/100 g)	
	Acide linoléique (<i>n-6</i>)	Acide α -linoléique (<i>n-3</i>)
- arachide	20 à 29	traces
- colza		90
- maïs	55	
- noix	69 à 78	3 à 13
- olive	7	traces
- pépin de raisin	70	traces
- soja	50 à 60	6 à 10
- tournesol	55 à 65	traces
- bœuf	2	0,5
- oie	6,5	
- poisson		contient des dérivés
- porc (saindoux)	8	contient des traces
- beurre	3 à 5	
- lait	4 à 8	
- jaune d'œuf		

1-3- Biosynthèse des AGPI

Il existe deux grandes familles d'acides gras alimentaires, la famille des acides gras *n-6* et celle des *n-3* (Figure7). Les acides gras polyinsaturés (AGPI) de la famille *n-6* présents dans la viande et dans les huiles végétales sont synthétisés à partir de leur précurseur, l'acide linoléique (LA ; 18:2n-6). L'acide arachidonique (AA ; C20:4n-6) est le membre le plus actif de cette famille ; il permet la biosynthèse et l'activation des eicosanoïdes (prostaglandines, thromboxanes, leucotriènes et lipoxines) de la série *n-6*. Les AGPI de la famille *n-3*, quant à eux, sont contenus dans le poisson et les algues marines. Leurs membres les plus importants sont l'acide docosahexaénoïque (DHA ; C22:6n-3) et l'acide eicosapentaénoïque (EPA ; C20:5n-3). Le DHA est un composant de la membrane phospholipidique de la plupart des cellules, particulièrement dans

Chapitre II : Détection des lipides par le système gustatif

la rétine, le cerveau et les spermatozoïdes (Chalon *et coll.*, 2001 ; Polit *et coll.*, 2001). L'EPA est transformé en différents métabolites par les voies de la cyclo-oxygénase et de lipoxygénase. Les AGPI des deux familles sont synthétisés en plusieurs étapes, qui impliquent des désaturases et des élongases. Les élongases augmentent la longueur de la chaîne, les désaturases augmentent le nombre d'insaturations. Les désaturases agissent dans des régions spécifiques des acides gras, de manière aléatoire, d'un acide gras à l'autre. Il existe donc une compétition de substrat vis-à-vis de ces enzymes. Il existe cinq désaturases, les $\Delta 9$, $\Delta 6$, $\Delta 5$, communes aux animaux et végétaux et les $\Delta 12$, $\Delta 15$ spécifiques aux végétaux. Les $\Delta 12$, $\Delta 15$ sont impliquées dans la synthèse de l'acide linoléique, précurseur des AGPI de la famille *n-6* et de l'acide α -linoléique, précurseur des AGPI de la famille *n-3*. La compétition de substrat, dans les voies de désaturation et d'élongation, impose un équilibre d'apport de précurseurs. L'âge de l'organisme et la qualité alimentaire déterminent le potentiel enzymatique. Pour un acide gras plus insaturé, une configuration spatiale complexe est imposée à la molécule. Les phospholipides membranaires s'empilent et augmentent la fluidité membranaire. (Figure7).

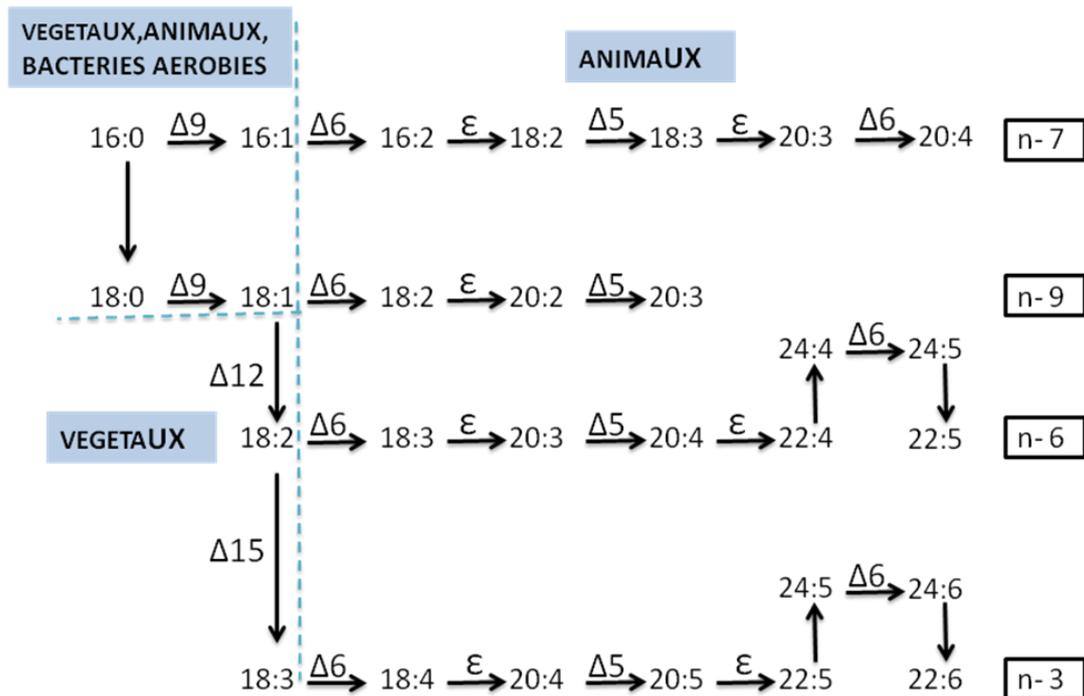


Figure 7: Biosynthèse des acides gras poly-insaturés : Le symbole Δ indique une désaturation avec la place de la double liaison introduite repérée à partir du groupe carboxyle COOH. Le symbole ϵ indique une élongation. Les familles n-7 et n-9 ne sont pas essentielles car leur précurseur est synthétisable par l'homme (et l'animal). Les familles n-6 et n-3 constituent les acides gras essentiels. Kelley *et coll.* (1991).

1-4- Rôles biologiques des acides gras alimentaires

Les lipides représentent environ 20 % du poids du corps. S'il existe des acides gras essentiels pour l'organisme, les acides gras doivent jouer en général un rôle très important. En effet, en dehors du rôle incontournable dans l'apport énergétique, les acides gras sont impliqués dans la structure et la signalisation cellulaires, et dans l'expression génique. Nous décrivons brièvement ci-dessous quelques fonctions des AGPI.

1-4-1- Rôle de lipides de constitution

Les membranes cellulaires sont constituées d'une double couche phospholipidique. Les AGPI essentiels, LA (C18 :2 *n*-6), AA (C20:4 *n*-6), DHA (C22 :6 *n*-3), et les acides gras mono insaturés, OLA (C18 :1 *n*-9), en sont les constituants fondamentaux. Les acides gras insaturés permettent la fluidité membranaire et régulent l'activité des protéines, enzymes, récepteurs, transporteurs, canaux, de la membrane plasmique. Les acides gras saturés, en association avec le cholestérol dans les cellules animales ou les sphingolipides dans les cellules végétales, favorisent la formation de zones rigides, telles que les radeaux lipidiques (*lipids rafts*) et les calvéoles, qui régulent l'activité des protéines membranaires.

D'après Otten *et coll.* (1997), le régime alimentaire détermine la distribution des phospholipides membranaires. En effet, lorsque les phospholipides sont saturés, la membrane cellulaire est rigide, et lorsque le taux de cholestérol est élevé, la fluidité de la membrane diminue pareillement.

1-4-2- Rôle énergétique

Le rôle énergétique des acides gras a déjà été montré. Tous les acides gras sont une bonne source d'énergie, car les liaisons qu'ils possèdent, libèrent de l'énergie cellulaire lorsqu'elles sont rompues par action enzymatique, 1 gramme de lipides fournit 9 Kilocalories à l'organisme, une grande partie de l'énergie fournie est stockée sous forme de réserves disponibles.

1-4-3- Rôle régulateur de l'activité cellulaire

Certains acides gras polyinsaturés jouent un rôle de précurseurs des éicosanoïdes, prostaglandines, leucotriènes, thromboxanes et prostacyclines. L'AA est le principal précurseur des éicosanoïdes. L'action de la phospholipase A₂ sur un phospholipide membranaire libère un acide gras et un lysophospholipide. La transformation en produit actif est assurée par les oxygénases. Les cycloxygénases forment les prostanoides (prostaglandines, prostacyclines et thromboxanes) et les lipoxygénases forment les leucotriènes. Les produits de ces précurseurs sont impliqués dans

Chapitre II : Détection des lipides par le système gustatif

diverses fonctions cellulaires, telles que l'inflammation, la cicatrisation, la coagulation, ou les réponses immunitaires.

Les acides gras polyinsaturés sont des régulateurs de la transduction d'un stimulus cellulaire. L'AA peut agir comme second messenger activateur de la PKC, régulatrice de fonctions cellulaires (Nishizuka, 1988). Les AGLC peuvent réguler l'expression génique (Niot *et coll.*, 1997). Des facteurs de transcription, tels que le PPAR (*Peroxisome Proliferator Activated Receptor*), participent à la régulation de gènes du métabolisme lipidique ou de la β oxydation dans le foie par les AGPI (Dreyer *et coll.*, 1993). Les récepteurs comme LXR (*Liver X Receptor*) impliqué dans la lipogenèse, ont pour antagonistes des AGPI qui bloquent son activation de manière compétitive.

1-5- Effets de la consommation des AGPI sur la santé

Bien que les AGPI de la famille $n-3$ et ceux de la famille $n-6$ soient métabolisés par les même désaturases, ils n'ont pas le même effet sur l'organisme.

1-5-1- Effets bénéfiques des AGPI de la famille $n-3$

L'acide docosahexaénoïque (DHA) est un acide gras à 22 atomes de carbone, comportant 6 doubles liaisons, dont la première se situe au niveau du 3^{ième} atome de carbone à partir de l'extrémité $-CH_3$. Il appartient donc à la famille $n-3$ et est symbolisé $22:6n-3$. Sa consommation, ainsi que les membres de la même famille, prévient l'installation et la progression de diverses pathologies.

1-5-1-1- Cardio-protecteur

Les acides gras de la famille $n-3$ sont favorables à la prévention de maladies cardiovasculaires (Kromann et Green, 1980; Kromhout *et coll.*, 1989). Parmi les actions cardio-protectrices, il y a la prévention des arythmies, l'action anticoagulante, la modulation de la croissance cellulaire dans la paroi des artères, l'amélioration de l'hémodynamique vasculaire, et la régulation de la pression artérielle.

Le cholestérol est un composant indispensable de la cellule qui participe à la structure de la membrane plasmique des cellules. Le cholestérol est aussi indispensable dans la formation de la bile, de certaines hormones et de divers composés comme la vitamine D. la différenciation du cholestérol se fait par rapport aux lipoprotéines responsables de son transport. On distingue les HDL (*High Density Lipoprotein*) qui, par leur forte densité, accumulent et débarrassent les artères des dépôts lipidiques ; les LDL (*Low Density lipoprotein*) et VLDL (*very low density lipoprotein*), quant à elles, leur faible densité provoque une accumulation des vésicules de cholestérol et la formation des plaques d'athérosclérose.

Chapitre II : Détection des lipides par le système gustatif

Les acides gras de la famille *n-3* diminuent les triglycérides plasmatiques (action hypolipémiante) et limitent la synthèse de lipoprotéines de très faible densité, VLDL mais favorisent celle des lipoprotéines de haute densité, HDL (Fumeron *et coll.*, 1991 ; Sanchez-Muniz *et coll.*, 1999). A ces actions s'ajoutent des effets vasodilatateurs exercés par ces acides gras sur les endothéliums (De Caterina *et coll.*, 2000).

1-5-1-2- Anticancéreux

Des études réalisées *in vitro* et *in vivo* ont mis en évidence que le DHA et l'EPA inhibent le développement de certains cancers. Dans les modèles d'études de cancérogenèse mammaire, les huiles de poisson inhibent la croissance tumorale et la prolifération des métastases (Carroll *et coll.*, 1992). Il a été démontré que l'acide α -linoléique (ALA), précurseur des acides gras *n-3*, a un plus fort effet inhibiteur de la croissance des tumeurs mammaires et des métastases que l'EPA et le DHA. A l'opposé, les acides gras *n-6*, en l'absence des *n-3*, sont des promoteurs de cancer du sein. Les acides gras *n-3* n'exercent pas d'effet inhibiteur sur ce type de cancer lorsque les *n-6* sont en apport trop élevés. Ce n'est que lorsque les apports en *n-3* et *n-6* sont équivalents que les effets anti-tumoraux des acides gras *n-3* sont visibles. Ainsi, les acides gras *n-3* exercent des effets antagonistes sur la stimulation tumorale induite par les *n-6*. Les effets anticancéreux des acides gras sont liés à la régulation des cellules tueuses ou à l'effet apoptotique des AGPI (Begin *et coll.*, 1986; Reddy *et coll.*, 1991).

1-5-1-3- AGPI et apoptose

L'AA, l'EPA, le DHA et leurs métabolites peuvent induire l'apoptose des cellules tumorales sans affecter les cellules normales (Siegel *et coll.*, 1987; Calviello *et coll.*, 1998; Finstad *et coll.*, 1998). Cet effet semble dépendre de l'habilité des acides gras à générer des radicaux libres et du processus de peroxydation des lipides (Das, 1991 et 1999). Calviello *et coll.* (1998) ont montré que l'EPA et le DHA agissent selon deux mécanismes différents sur le contrôle du développement des tumeurs. L'effet anti-tumoral de l'EPA est un processus antiprolifératif, alors que le DHA induit l'apoptose cellulaire des cellules cancéreuses (Calviello *et coll.*, 1998). A l'opposé, ces AGPI semblent avoir un effet protecteur contre le processus d'apoptose dans les cellules normales soumises à des acides gras saturés, tels que l'acide palmitique (16:0) (Calviello *et coll.*, 1998).

Le mécanisme d'action du DHA n'est pas encore connu. Cependant, selon certains auteurs, l'activation de la protéine Fas des cellules Jurkat-T serait impliquée (Weis *et coll.*, 1995; Wolf *et coll.*, 1997; Zhou *et coll.*, 1998). Le système Fas/Fas Ligand est critique pour le déclenchement de l'apoptose dans un nombre important de types cellulaires. Lorsque les cellules

Chapitre II : Détection des lipides par le système gustatif

sont incubées avec le DHA, il en résulte une augmentation de l'expression de Fas et de la sécrétion de son ligand qui induit l'apoptose (Siddiqui *et coll.*, 2001).

1-5-1-4- Effets sur le système nerveux central

La présence de DHA, en concentration élevée, dans les membranes des cellules cérébrales, rend compte de son importance dans le fonctionnement du système nerveux central. Des expériences de carence en DHA, menées sur les rats et les singes, ont mis en évidence que les capacités d'apprentissage et d'attention dépendent de cet acide gras (Lauritzen *et coll.*, 2001). Au-delà de ces études, des résultats récents suggèrent que des anomalies du métabolisme des AGPI seraient impliquées dans le développement de certains troubles psychiatriques (Horrobin, 1998), tels que la schizophrénie (Horrobin, 1998), la dépression (Bruinsma et Taren, 2000), l'hyperactivité de l'enfant (Burgess *et coll.*, 2000). Certains travaux rendent compte des mécanismes engendrés par une carence en cet acide gras. Outre les modifications des propriétés des membranes, des changements concernant la neurotransmission, notamment la capacité de libérer un ou plusieurs neurotransmetteurs au moment de la stimulation nerveuse, sont observés. Ainsi, l'état de carence en AGPI n-3 affecte la fonction de plusieurs systèmes de neurotransmission, notamment les voies monoaminergiques (dopamine et sérotonine) (Delion *et coll.*, 1997; Chalon *et coll.*, 2001; Zimmer *et coll.*, 2002).

1-5-1-5- AGPI n-3 et acuité visuelle

Comme le cerveau, la rétine est une importante source de DHA. Une carence dans l'alimentation entraîne une diminution des taux de DHA à ce niveau. Il en résulte un électrorétinogramme anormal et une diminution de l'acuité visuelle chez le singe (Neuringer *et coll.*, 1986). De plus, Polit *et coll.* (2001) ont démontré, *in vitro*, que le DHA est essentiel pour la survie et la différenciation des photorécepteurs au cours du développement. En effet, lorsque les photorécepteurs sont cultivés sans DHA, après 4 jours un effet apoptotique est observé (Polit *et coll.*, 2001).

1-5-1-6- Action des AGPI n-3 sur le système immunitaire

Les acides gras alimentaires n-3 ont une variété d'effets anti-inflammatoires et immunomodulateurs (Mori et Beilin, 2004). Ces effets pourraient intervenir dans l'athérosclérose et ses manifestations cliniques, telles que l'infarctus du myocarde, la mort subite, et les accidents vasculaires cérébraux. Certains travaux sur l'obésité révèlent qu'une inflammation chronique est la conséquence d'une trop grande accumulation d'énergie par l'organisme (Ye et Keller, 2010).

1-5-2- Effets mitigés des AGPI de la famille n-6

Les effets bénéfiques des AGPI *n-6* avaient été reconnus. Toutefois, certains travaux suggèrent que leur consommation excessive pourrait inverser les effets bénéfiques et provoquer des risques cardio-vasculaires (Rothrock et Foster, 1990). Chez le nouveau-né nourri uniquement au biberon, il a été observé que 1 % de l'apport énergétique en acide linoléique évitait l'apparition des symptômes physiologiques (dessèchement et épaissement de la peau, desquamation) et biochimique (teneur circulante élevée en acide eicosatriénoïque (20:3n-9) et réduite en AA) qui sont caractéristiques d'une déficience alimentaire en AGPI *n-6* (Holman *et coll.*, 1970).

1-6- Hydrolyse des lipides alimentaires

Les acides gras alimentaires doivent être hydrolysés par des lipases digestives durant le processus d'absorption. Durant ce processus, les lipases libèrent les acides gras dans la cavité buccale (Figure 8) pour permettre leur interaction avec les récepteurs du goût (Kawai et Fushiki, 2003). Il a été observé chez le rat (Hamosh et Scow, 1973, a, b) puis chez l'homme et la souris (Hamosh et Burns, 1977 ; DeNigris *et coll.*, 1988) que la lipase linguale est sécrétée par les glandes de Von Ebner dans la cavité buccale. La muqueuse gastrique libère elle aussi une lipase gastrique, d'une séquence identique à celle de la lipase linguale, (Barrowman *et coll.*, 1970). La lipase gastrique, dont l'activité ne représente que 10 % à 30 % de l'activité lipasique chez l'Homme, permet la digestion des triacylglycérides (Hamosh et Burns, 1977 ; Hamosh et Scow, 1973, a).

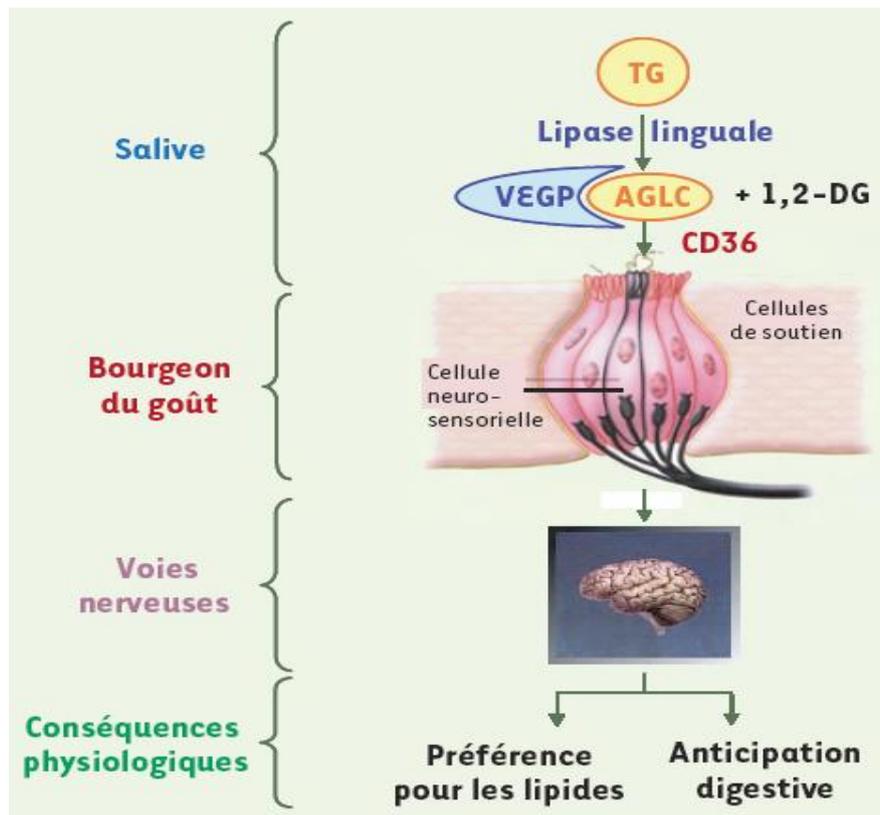


Figure 8: L'hydrolyse des lipides alimentaires : L'hydrolyse de triglycérides (TG) par la lipase linguale libère des acides gras à longue chaîne (AGLC) dans la salive, près des bourgeons du goût, où ils peuvent être solubilisés par la VEGP (Von Ebner's Gland Protein) et/ou captés par le récepteur CD36 situé à la surface de certaines cellules neurosensorielles. L'interaction AGLC/CD36 affecte le comportement alimentaire et les sécrétions digestives. On ignore actuellement la cascade de signalisation mise en route au niveau des bourgeons du goût et les voies nerveuses impliquées. 1,2-DG : 1,2- diglycérides. Laugerette *et coll.* (2007).

2- Détection des lipides alimentaires

Bien que les graisses alimentaires soient très majoritairement composées de triglycérides, ce sont les acides gras à longue chaîne (AGLC, nombre de carbones > 16) qui sont responsables de l'attrance spontanée pour les lipides. En effet, quand des rats ont un libre accès à deux sources de lipides, ils consomment de préférence celle enrichie en AGLC par rapport à celle contenant des triglycérides (Tsuruta *et coll.*, 1999; Fukuwatari *et coll.*, 2003). Cette sélectivité chimique est étroite puisque les AGLC ne sont plus reconnus quand ils sont méthylés (Tsuruta *et coll.*, 1999). La capacité à percevoir, de façon sélective, les AGLC a été confirmée en utilisant la méthode de l'aversion gustative conditionnée qui consiste à rendre un animal aversif à une saveur donnée en associant sa consommation avec un malaise digestif induit par voie chimique. Non seulement on peut facilement rendre un rat (McCormack *et coll.*, 2006) ou une souris (Gaillard *et coll.*, 2008)

Chapitre II : Détection des lipides par le système gustatif

aversif vis-à-vis d'un AGLC donné, mais encore son seuil de perception aboutissant à son rejet est extrêmement faible (de l'ordre du nanomolaire) (McCormack *et coll.*, 2006). La lipase linguale, dont l'expression est particulièrement élevée chez les rongeurs, semble jouer un rôle prépondérant dans cette perception. En effet, son inhibition pharmacologique s'accompagne d'une chute spectaculaire de la préférence pour les lipides (Kawai et Fushiki, 2003).

2-1 Comment les acides gras sont-ils détectés ?

En règle générale, la transmission d'un signal gustatif aboutissant à la perception d'une saveur requiert la présence de protéines spécialisées localisées au sommet des cellules chimioréceptrices des bourgeons du goût (Figure 8). Ces protéines sont soit des canaux ioniques dont la fonction est contrôlée par des ions (Na^+ pour le salé ou H^+ pour l'acide), soit des récepteurs activés par des ligands spécifiques entraînant la production d'un second messager intracellulaire (cas du sucré, de l'amer et de l'*umami*) ou encore des récepteurs canaux dont la liaison avec un ligand spécifique contrôle le flux transmembranaire d'un ion (sucré, *umami*) (Gilbertson et Boughter, 2003). Quel que soit le mécanisme incriminé, il aboutit au final à une variation de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$; ce qui provoque l'exocytose de neuromédiateurs à l'origine de l'activation des fibres nerveuses gustatives sous-jacentes (Gilbertson et Boughter, 2003). En théorie, une perception gustative des lipides doit donc être générée par l'interaction d'un AGLC avec une protéine spécifique portée par les bourgeons du goût. Les travaux dans ce domaine ont permis de cibler, à ce jour, plusieurs candidats plausibles : le canal potassique Kv1.5, les récepteurs GPR120 et GPR40 et la glycoprotéine CD36.

2-1-1- Canal potassique (Kv1.5) sensible aux acides gras polyinsaturés

Timothy Gilbertson et ses collègues de l'Université de l'Utah (USA) ont appliqué la technique du « patch clamp » à des cellules réceptrices gustatives isolées à partir de papilles fongiformes de rat pour comprendre comment un signal lipidique pourrait être transmis par la voie gustative. Cette technique permet de mesurer des variations de courant électrique extrêmement faible (de l'ordre du picoampère) générées par les flux ioniques existant de part et d'autre de la membrane cellulaire. Ils ont pu ainsi montrer que les acides gras polyinsaturés (AGPI) bloquent les canaux potassiques DRK (*Delayed-rectifying potassium channels*) déjà connus pour être impliqués dans la transduction de stimuli sensoriels (Gilbertson *et coll.*, 1997). Il en résulte une dépolarisation transitoire de la cellule réceptrice gustative due à l'accumulation intracellulaire de charges positives (Gilbertson *et coll.*, 1997). Il faut souligner que la fermeture des canaux potassiques n'est obtenue que lorsque les AGPI sont présents du côté extracellulaire de la membrane de la cellule gustative, ce qui est le cas dans le contexte physiologique. Ces données *in vitro* suggèrent donc que la présence

Chapitre II : Détection des lipides par le système gustatif

d'AGPI dans l'alimentation peut modifier le fonctionnement de cellules gustatives, ce qui pourrait, au final, affecter le comportement alimentaire, voire la masse corporelle. Pour explorer cette dernière hypothèse, ces auteurs ont comparé l'impact des AGPI sur la polarisation électrique de cellules gustatives isolées à partir de papilles fongiformes de rats résistants (S5B/P1) ou sensibles (Osborne-Mendel) à l'obésité. De façon inattendue, la dépolarisation des cellules gustatives, induite par les AGPI, est plus importante chez les rats résistants à l'obésité, connus pour consommer de préférence des glucides que chez les rats obèses qui ont une nette attirance pour les lipides (Gilbertson *et coll.*, 2005). Ce résultat suggère que les animaux obèses auraient une hyposensibilité gustative pour les acides gras, ce qui pourrait expliquer qu'ils consomment plus de lipides. Ce phénomène pourrait participer à la mise en place de l'obésité. Il a été également montré que l'addition d'une faible concentration d'AGPI à une solution contenant une molécule sapide, comme la saccharine, abaisse fortement son seuil de perception favorisant ainsi sa consommation (Gilbertson *et coll.*, 2005). Des résultats comparables ont été obtenus avec d'autres substances sapes renforçant ainsi leur effet attractif ou aversif (Pittman *et coll.*, 2006). Les AGPI se comporteraient donc comme des exhausteurs de goût, leur action dépolarisante intrinsèque sur la cellule gustative due à l'inhibition des DRK s'additionnant à celle induite par la molécule sapide. Les papilles fongiformes de rat expriment une dizaine d'isoformes différentes de canaux DRK pouvant être inhibés par diverses molécules sapes. Il a été proposé par Gilbertson et ses collègues que le canal Kv1.5, dont l'expression est particulièrement soutenue dans les cellules réceptrices gustatives des papilles fongiformes, pourraient être la structure relais des AGPI (Liu *et coll.*, 2005), à l'instar de ce qui a été rapporté pour les cellules cardiaques (Honore *et coll.*, 1994).

2-1-2- GPCR activés par les acides gras (GPR120 et GPR40)

La perception gustative du sucré, de l'amer et de l'*umami* est médiée par des récepteurs couplés aux protéines G (GPCR) (Figure 4). Il s'agit d'une famille de protéines dont chacun des membres est activé par un ligand spécifique qui peut être d'origine endogène (*e.g.* hormones, acides biliaires, endocannabinoïdes, amines biogènes) ou exogène (*e.g.* nutriments, phéromones, odorants). De nombreux GPCR sont encore considérés comme orphelins, leurs ligands naturels n'étant pas identifiés. Il a été récemment montré que les récepteurs GPR120 et GPR40 (ou FFAR1 pour *free fatty acid receptor 1*) sont capables de lier et d'être activés par les AGLC.

Le GPR120 est abondamment exprimé au niveau de cellules entéroendocrines localisées principalement dans l'iléon et le côlon chez la souris et l'Homme. Son activation par les AGLC provoque la sécrétion du *glucagon-like peptide-1* (GLP-1) (Hirasawa *et coll.*, 2005) et de la cholécystokinine (CCK) (Tanaka *et coll.*, 2008), deux hormones impliquées notamment dans le contrôle de la prise alimentaire. Le GPR120 est aussi spécifiquement exprimé dans les cellules

Chapitre II : Détection des lipides par le système gustatif

réceptrices des papilles gustatives où il joue un rôle dans la détection oro-sensorielle des lipides alimentaires. En effet, des souris dépourvues de ce gène ont une préférence pour les lipides diminuée (Cartoni *et coll.*, 2010). On ignore actuellement quel est le mécanisme responsable de ce comportement. L'invalidation du gène codant pour le GPR40 s'accompagne également d'une chute de la préférence spontanée pour les lipides chez la souris (Cartoni *et coll.*, 2010). Comme ce GPCR lie à la fois les acides gras à chaîne moyenne et à chaîne longue (Briscoe *et coll.*, 2003), il a été proposé qu'il pourrait également jouer un rôle dans la perception oro-sensorielle des lipides alimentaires (Cartoni *et coll.*, 2010). Cependant, cette hypothèse est actuellement grevée par des résultats contradictoires concernant la présence ou non du GPR40 au niveau des papilles gustatives chez le rongeur (Matsumura *et coll.*, 2007; Cartoni *et coll.*, 2010).

2-1-3- CD36: un récepteur du goût du gras

On peut imaginer qu'il existe un avantage physiologique à une détection orale des lipides pour une préparation fonctionnelle du tractus digestif à leur arrivée et à leur prise en charge, qui nécessite, comme nous l'avons vu précédemment, la fonctionnalité de voies métaboliques très complexes. En théorie, une perception gustative de lipides alimentaires peut être générée par l'interaction d'un AGLC avec un récepteur spécifique localisé au niveau des bourgeons du goût. La protéine CD36 (Cluster of Differentiation 36) appelée également FAT (Fatty Acid Translocase) appartient à la famille des récepteurs "scavengers" de classe B. CD36 est une protéine transmembranaire de 88 kDa, fortement N-glycosylée, exprimée dans de nombreux types cellulaires, notamment les plaquettes, les monocytes, les cellules endothéliales capillaires, les érythroblastes, les adipocytes, et les cellules épithéliales intestinales, mammaires et de la rétine. La structure prédictive de CD36 oriente la quasi-totalité de la protéine du côté extracellulaire, à l'exception de deux courtes extrémités cytoplasmiques (de 9 à 13 acides aminés) qui peuvent être palmitoylées (Gruarin *et coll.*, 2000). La protéine CD36, qui lie les AGLC avec une très haute affinité (Baillie *et coll.* 1996), a été identifiée au niveau de la papille caliciforme chez le rat (Fukuwatari *et coll.*, 1997) et chez la souris (Laugerette *et coll.*, 2005). CD36 présente les caractéristiques structurales et fonctionnelles requises pour être un récepteur gustatif aux lipides (Glatz et Lagarde, 2007). Ces caractéristiques sont :

1) dans l'épithélium lingual des rongeurs, l'expression du gène CD36 est strictement restreinte aux bourgeons du goût. Elle est particulièrement élevée dans la partie postérieure de la langue, au niveau des papilles caliciformes et dans une moindre mesure des foliées (Figure 9). En revanche, CD36 n'est que faiblement exprimé dans les papilles fongiformes. La protéine CD36 est localisée au niveau de la partie apicale de certaines cellules sensorielles bordant le pore gustatif. Ce positionnement est particulièrement adéquat pour générer un signal gustatif puisque la lipase

Chapitre II : Détection des lipides par le système gustatif

linguale peut libérer des AGLC à proximité immédiate des bourgeons du goût, et donc de CD36, dans les papilles caliciformes et foliées.

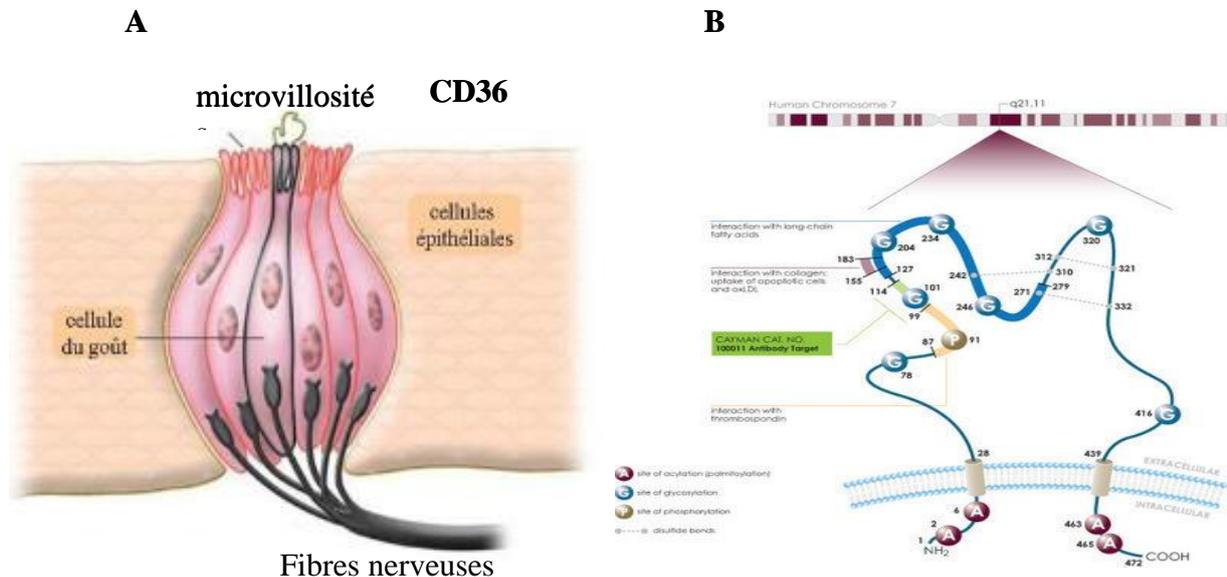


Figure 9: Position et présentation du CD36 : Le bourgeon du goût (A) et la structure prédictive du récepteur au goût du gras, CD36 (B), exprimé à la surface apicale des cellules du goût. Abumrad (2005).

2) CD36 a une structure de type récepteur avec une large poche hydrophobe extracellulaire flanquée de deux courts segments transmembranaires plongeant dans le cytoplasme (Figure 9). Son extrémité C-terminale peut s'associer avec des kinases Src constituant ainsi un ensemble fonctionnel pouvant potentiellement permettre la transduction d'un signal lipidique.

3) Les AGLC induisent de façon sélective, rapide et importante, une élévation de la concentration intracellulaire de Ca^{2+} dans les cellules gustatives isolées à partir de papilles caliciformes. Or ce changement est connu pour être à l'origine de l'activation des voies nerveuses gustatives afférentes. Cet effet est dépendant de CD36 puisque l'inhibition pharmacologique de son site de liaison supprime totalement la réponse calcique induite par les AGLC (Abdoul-Azize *et coll.*, 2012). En accord avec ce processus, les acides gras à chaîne moyenne, qui ne sont pas des ligands de CD36, sont incapables d'induire un changement calcique dans les cellules gustatives. Le mécanisme moléculaire à l'origine de la transduction du signal dans les cellules gustatives est actuellement inconnu. Une implication de la voie des tyrosines kinases est cependant plausible. En effet, certaines kinases Src comme lyn ou fyn, connues pour contrôler les flux calciques intracellulaires, peuvent également interagir avec CD36 (Huang *et coll.* 1991). De même, les résultats récents obtenus avec l'inactivation du canal calcique TRPM5, similaires à ceux obtenus avec l'inactivation de CD36 (Laugerette *et coll.*, 2005) concernant l'abolition de la préférence

Chapitre II : Détection des lipides par le système gustatif

spontanée des rongeurs pour le gras, suggèrent que TRPM5 peut faire partie de la voie de signalisation activée par la liaison d'acides gras sur CD36 (Sclafani, 2007).

4) Les souris, dont le gène codant pour CD36 a été invalidé, n'ont plus de préférence pour une solution enrichie en AGLC par rapport à une solution aqueuse. En revanche, leur attirance pour le sucré et leur aversion pour l'amer restent équivalentes à celles de souris de type sauvage. En absence de CD36, le système gustatif semble donc fonctionner normalement sauf pour la détection de s AGLC (Laugerette *et coll.*, 2005).

5) L'augmentation du flux pancréato-biliaire et du contenu en protéines du suc pancréatique induit par le dépôt oral d'AGLC chez les souris de type sauvage n'existe plus chez les souris dépourvues de CD36. La présence de CD36 au niveau lingual semble donc indispensable pour préparer l'organisme à recevoir des graisses (Laugerette *et coll.*, 2005).

6) La présence d'AGLC au niveau oral entraîne une activation neuronale du noyau du tractus solitaire dans des zones connues pour être en relation avec le nerf IX et le nerf VII. Une fois encore, cette activation est dépendante de CD36 puisque l'activation neuronale observée chez les souris sauvages soumises à un stimulus lipidique oral n'est plus reproduite chez des animaux dont le gène codant pour CD36 a été invalidé (Laugerette *et coll.*, 2007).

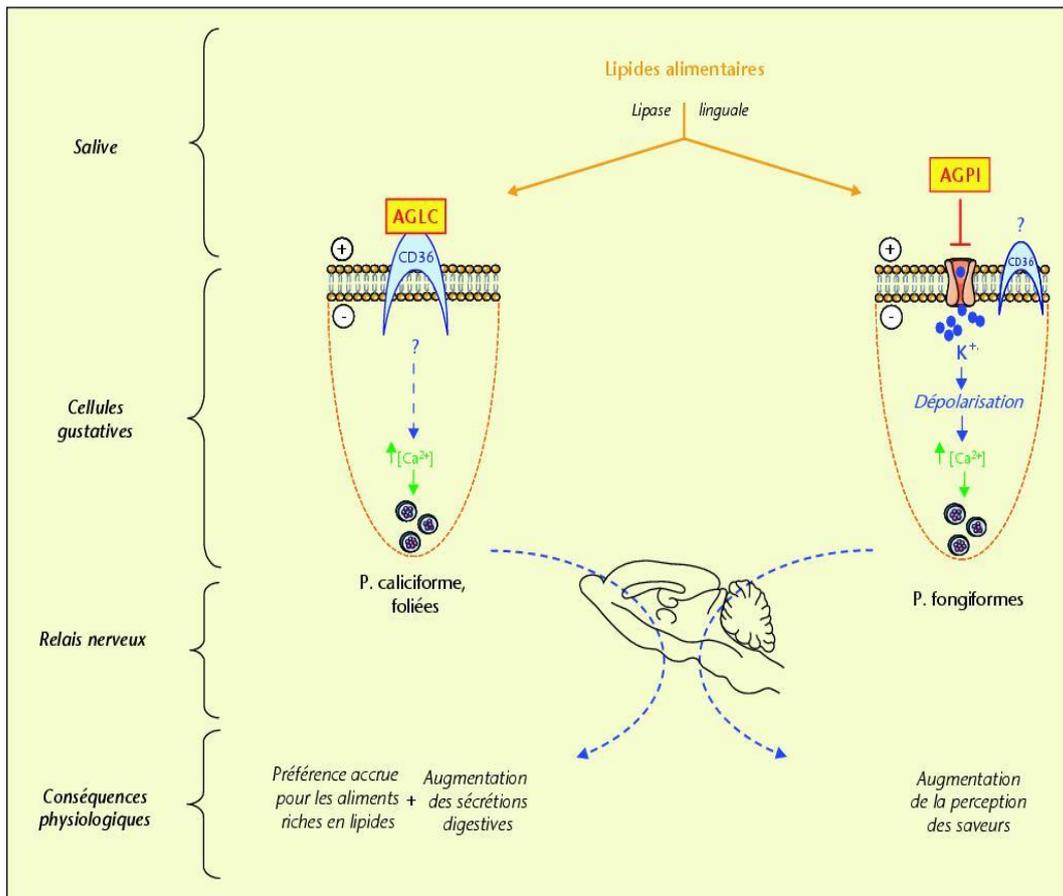


Figure 10: Perception oro-sensorielle des lipides alimentaires chez la souris : modèle de travail AGCL : acides gras à longue chaîne. Laugerette *et coll.* (2007).

2-2- Existe-t-il une perception gustative des lipides alimentaires chez l'Homme ?

Bien que les études humaines soient encore peu nombreuses, les données psycho-physiques de Richard Mattes et de ses collaborateurs du Département Aliments et Nutrition de l'Université de Purdue aux USA suggèrent qu'il existe également une dimension gustative dans la perception oro-sensorielle des lipides chez l'Homme. En effet, des sujets adultes en bonne santé sont capables de percevoir, de façon spécifique, des AGLC et ceci quel que soit leur degré de saturation. Le protocole utilisé minimisant les influences olfactives et somatosensorielles (texture, piquant) a été attribué à la gustation (Chale-Rush *et coll.*, 2007). Il est intéressant de noter que le seuil de détection des AGLC dans cette expérience est très bas (0.028% w/v en moyenne) comparé à celui des huiles (5.6 et 17.3% w/v en moyenne chez les sujets jeunes et âgés, respectivement) (Schiffman *et coll.*, 1998). Les AGLC semblent donc être les molécules responsables de la perception gustative des lipides alimentaires chez l'Homme comme chez les rongeurs. Puisque les aliments riches en lipides peuvent contenir jusqu'à 0.5% d'acides gras libres (Mattes, 2005), certains auteurs estiment que l'hydrolyse des triglycérides par la lipase linguale n'est pas une étape pouvant limiter cette

Chapitre II : Détection des lipides par le système gustatif

détection. Cette observation est importante puisqu'il existe une controverse sur la présence d'une lipase linguale active chez l'Homme. Cependant, les bases moléculaires de cette perception gustative ne sont pas encore connues. On peut penser qu'un système de détection semblable à celui en cours de décryptage chez les rongeurs existe également chez l'Homme. En effet, les cellules réceptrices gustatives humaines sont pourvues du CD36 (Simons *et coll.*, 2010) et probablement du récepteur GPR120.

Comme chez la souris, la perception gustative de lipides s'accompagne de modifications physiologiques chez l'Homme. En effet, la présence de lipides en bouche est suffisante pour affecter la triglycéridémie post-prandiale chez des volontaires sains. En effet, l'augmentation de la triglycéridémie consécutive à une charge lipidique, réalisée avec une huile encapsulée pour éviter tout contact oral, est plus importante quand la stimulation orale (*l'aliment est mis en bouche, mastiqué mais pas ingéré*) est réalisée avec un aliment test contenant des lipides (Mattes, 1996). Ce changement semble être indépendant de la texture de la matrice alimentaire utilisée (Mattes, 2001a) et de toute perception olfactive (Mattes, 2001b), suggérant que la présence de lipides dans l'aliment proposé est perçue par la voie gustative (Mattes, 2005). Cette augmentation de la triglycéridémie serait due à un déstockage intestinal de lipides issus du repas précédent l'expérience (Mattes, 2002; Chavez-Jauregui *et coll.*, 2010). Le mécanisme physiologique à l'origine de ces changements est actuellement inconnu. A l'instar de ce qui a été montré chez la souris, une boucle céphalique reliant la détection orale des AGLC à cet effet digestif *via* le nerf vague (nerf X) est probable. Il a été également rapporté que l'ajout de lipides dans un aliment test lors d'un repas fictif (car non ingéré) induit une augmentation de la concentration plasmatique d'une hormone, le peptide pancréatique, plus importante que celle trouvée avec l'aliment dépourvu de lipides mais riche en glucides (Crystal et Teff, 2006). Ce phénomène endocrine est rapide puisque l'effet maximal est atteint 4 mn après la stimulation orale.

3- Mécanisme de signalisation cellulaire dans les cellules gustatives

3-1- Signalisation calcique

Les signaux calciques contrôlent une très grande variété des évènements cellulaires, qui s'étendent de la sécrétion à l'expression des gènes. Le calcium peut contrôler la croissance et la différenciation cellulaire ou induire l'apoptose. La $[Ca^{2+}]_i$ est généralement de l'ordre du nano molaire, mille fois inférieure à celle du milieu extracellulaire. Il existe deux possibilités d'augmentation du calcium intracellulaire ; la première possibilité est qu'il y ait un influx à partir du milieu extracellulaire *via* les canaux calciques de la membrane plasmique. Les ions Ca^{2+} se

Chapitre II : Détection des lipides par le système gustatif

déplacent selon le gradient électro physiologique. La deuxième possibilité est une libération des réserves calciques intracellulaires, constituées par exemple par le réticulum endoplasmique, activé par l'IP₃. Les réserves sont limitées et doivent être reconstituées à partir de l'environnement externe. Le réapprovisionnement s'effectue par les canaux capacitifs calciques (Montell, 1997). L'augmentation de la concentration calcique fait partie des signaux précoces lors de l'activation cellulaire.

3-1-1- Déclenchement de la signalisation

Dans la majorité des cellules animales, le signal calcique commence par une mobilisation calcique des réserves intracellulaires suite à l'activation des canaux dédiés. Les activités tyrosine-kinase induites lors de l'activation des récepteurs produisent une phosphorylation de nombreuses protéines cellulaires, telle que la phospholipase C (PLC) (June *et coll.*, 1990). La PLC hydrolyse la phosphatidyl inositol 4,5diphosphate (PIP₂). Parmi les produits de cette hydrolyse, figurent l'IP₃, et le diacyl-glycéro (DAG). Le DAG est un activateur naturel de la PKC (Nishizuka, 1986). L'IP₃ se fixe sur son récepteur (IP₃R) situés sur la membrane du réticulum endoplasmique et induit la libération des réserves calciques intracellulaires (Berridge, 1984).

3-1-2- Entrée du calcium selon le modèle capacitif

La déplétion des réserves calciques du réticulum endoplasmique (RE) est suivie d'un flux calcique provenant du milieu extracellulaire (Putney et McKay, 1999). Dans les cellules endocrines, il a été démontré pour la première fois que le flux calcique est déclenché par la déplétion des réserves calciques intracellulaires plutôt que par l'action directe de l'IP₃ et, est maintenu, bien après que les taux de réserves intracellulaires en IP₃ soient revenus à ses valeurs basales, jusqu'à ce que les réserves calciques intracellulaires soient réapprovisionnées. Cette opération d'entrée du calcium, nommée *stored operated calcium entry (SOCE)* ou entrée capacitative, est effectuée à travers l'ouverture des canaux calciques appelés *Store-Operated calcium channels (SOC)*. Ces canaux sont strictement activés en réponse à une diminution des réserves calciques intracellulaires (Putney et McKay, 1999). Il est possible d'induire pharmacologiquement l'entrée capacitative du calcium avec la thapsigargine (TG), un inhibiteur sélectif des pompes ATPasique calcique du RE (Thastrup *et coll.*, 1989) ou avec des ionophores lipophiles qui transportent le calcium en dehors du RE et des chélateurs du calcium interférant avec la recapture du Ca²⁺ (Parekh et Penner, 1997 ; Lewis, 1999). Les signaux permettant l'activation des canaux SOC sont encore inconnus, mais trois hypothèses tendent à expliquer cette activation.

- La première hypothèse est celle du couplage conformationnel. Suite à un signal, le récepteur de l'IP₃ situé sur la membrane du réticulum endoplasmique, initierait une interaction

Chapitre II : Détection des lipides par le système gustatif

directe avec les canaux SOC situés sur la membrane plasmique. Cette hypothèse serait confortée par l'existence d'une interaction entre les canaux TRPC1 et TRPC3 et l'IP₃R (Boulay *et coll.*, 1999 ; Rosado *et coll.*, 2002). Toutefois, l'hypothèse du couplage conformationnel est remise en cause par le fait que les canaux TRP sont activés sans l'intervention de l'IP₃R (Jayaraman *et coll.*, 1995).

- D'après l'hypothèse du messager diffusible, les canaux calciques fusionneraient avec la membrane plasmique pour activer l'influx SOC ; ce mécanisme n'a toutefois pas été identifié (Patterson *et coll.* 1999 ; Yao *et coll.*, 1999). D'après cette hypothèse, lorsqu'ils ne sont pas actifs, les canaux SOC ne seraient pas localisés au niveau de la membrane plasmique, et y seraient insérés, suite à une déplétion calcique par un mécanisme d'exocytose.

- La troisième hypothèse, la plus probable (Figure 11), est celle de l'existence d'un facteur, CIF (*calcium influx factor*). Il s'agit d'un composé de faible poids moléculaire purifié à partir de cellules T Jurkat stimulées. Le CIF libéré par le réticulum endoplasmique est de nature non protéique et phosphorylé (Randriamampita et Tsein, 1993). Le CIF peut activer la phospholipase A₂ Ca²⁺-indépendante (iPLA₂) localisée proche de la membrane plasmique (Smani *et coll.*, 2004). Le clivage des phospholipides par iPLA₂ génère l'AA et des lysophospholipides. Les lysophospholipides activeraient directement les canaux SOC.

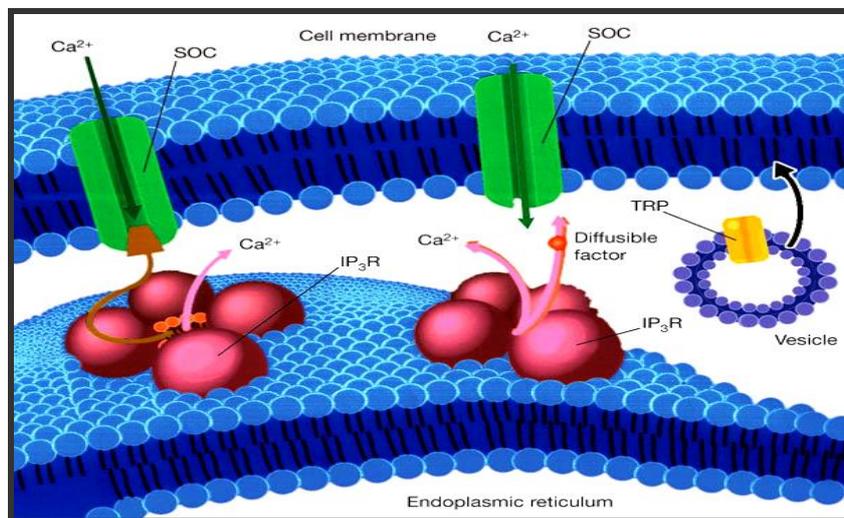


Figure 11: Les trois hypothèses de l'influx SOC : La déplétion du Ca²⁺ dans les réserves du RE induit l'ouverture des canaux SOC. 1, il existe un lien direct avec l'IP₃R qui ouvre le canal SOC, c'est une analogie avec le lien qui existe entre les récepteurs de la ryanodine et les canaux Ca_v. 2, la déplétion du Ca²⁺ induit la fusion des vésicules contenant SOC avec la membrane plasmique. 3, un second messager diffusible libéré, à partir du RE dépleted de Ca²⁺, active les SOC. Clapham (2003).

3-1-3- La nature des canaux impliqués dans l'influx SOC

Dans les cellules électriquement nonexcitables, l'influx calcique est essentiel pour la

Chapitre II : Détection des lipides par le système gustatif

régulation d'une multitude de processus cinétiques distinctes impliquant l'exocytose, le contrôle enzymatique, la régulation des gènes, la croissance et la prolifération cellulaire et l'apoptose. Plusieurs courants possédant une fonctionnalité biophysique distincte ont été signalés, mais le mieux caractérisé est le courant CRAC (*Ca²⁺ Release Activated Ca²⁺*). Ce dernier a été identifié dans les mastocytes et les lymphocytes T (Hoth et Penner, 1992). Des courants CRAC ont depuis été identifiés dans de nombreux types cellulaires (Parekh et Penner, 1997).

Bien qu'il ait été initialement envisagé que les canaux CRAC fonctionnent uniquement dans les cellules nonexcitables, plus de preuves pointent maintenant vers un rôle central pour les courants I_{CRAC}-like dans les cellules excitables aussi. Dans certains systèmes, l'évidence suggère que les canaux fonctionnant pourraient être liés à des homologues du TRP (*Transient Receptor Potential*), mais aucun consensus n'a encore été atteint. Malgré des recherches intenses, le signal qui relaie le Ca²⁺ vers les canaux CRAC dans la membrane plasmique ainsi que l'identité moléculaire du capteur ou senseur du Ca²⁺ vers ses canaux reste insaisissable. Afin de mieux comprendre ce mécanisme, Feske *et coll.*, 2006, ont identifié la molécule STIM1 et la famille ORAI qui existe en trois types. ORAI1 (aussi appelé CRACM1, TMEM142a) appartient à une nouvelle famille de canaux ioniques. Les autres membres de cette famille sont ORAI2 (ou CRACM2, TMEM142b) et ORAI3 (CRACM3, TMEM142c). ORAI1 a été identifié dans les cellules S2 de drosophile (Feske *et coll.*, 2006). Chez l'homme, le gène d'ORAI1 est composé de deux exons et code pour une protéine très conservée de 301 acides aminés, quatre domaines transmembranaires et les extrémités N- et C-terminales intracellulaires (Feske, 2010). D'un point de vue stoechiométrique, les canaux CRAC sont composés de quatre unités d'Orai1 (Ji *et coll.*, 2008)). Une expression simultanée d'Orai1 avec STIM1 (Figure 12) serait la cause de la naissance d'un courant I_{CRAC} (Peinelt *et coll.*, 2006). Quant à la contribution d'Orai2 et Orai3 dans l'influx SOC, en dépit de leur expression simultanée dans de nombreux tissus et organes (Feske *et coll.*, 2009), Orai2 serait incapable de restaurer l'influx SOC dans des cellules dépourvues d'Orai1, alors qu'Orai3 entraîne une partielle restauration (Gwack *et coll.*, 2007).

STIM1 (*stromal interaction molecule*) est essentiel pour l'influx SOC. STIM1 a été initialement identifié comme suppresseur de tumeur nommé GOK, exprimé dans le muscle squelettique, mais absent dans le rhabdomyosarcome où son expression induit la mort cellulaire (Parker *et coll.*, 1996). STIM1 et son analogue STIM2 sont des protéines transmembranaires phosphorylées contenant de multiples domaines protéiques (Manji *et coll.*, 2000).

STIM1 est une protéine transmembranaire à passage unique qui est principalement localisée dans la membrane du RE bien qu'exprimée dans la membrane plasmique (Manji *et coll.*, 2000). Les domaines protéiques de STIM1 comprennent, entre autres, deux domaines nécessaires pour la détection du calcium et un motif SAM (*stérile alpha motif*) (Williams *et coll.*, 2001). Les

dysfonctionnements d'Orai1 provoquent le développement de nombreuses pathologies comme la formation de thrombus (Braun *et coll.*, 2009) et de métastases de cellules cancéreuses (Yang *et coll.*, 2009).

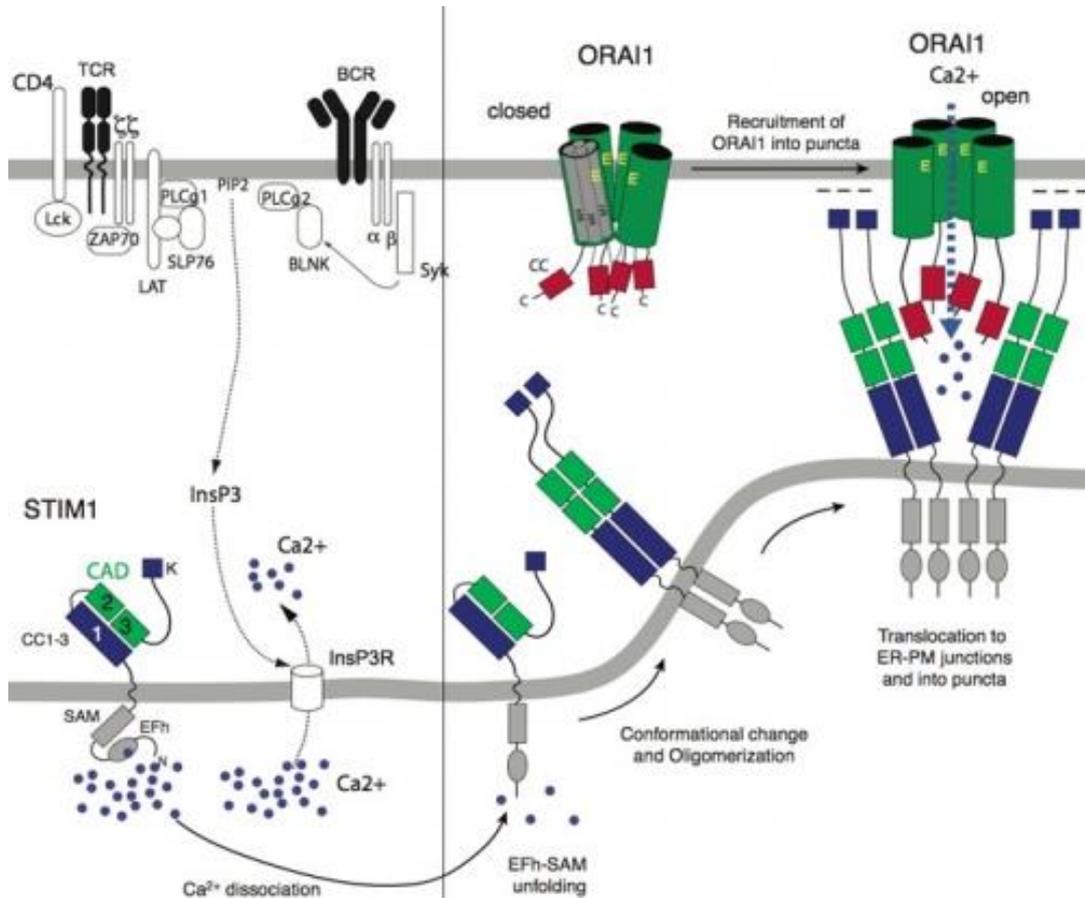


Figure 12: Le mécanisme moléculaire de l'activation du canal CRAC : Dans les lymphocytes au repos, le pool calcique du RE rempli de Ca^{2+} lié au domaine EF-Hand de N-terminale de STIM1. La stimulation des récepteurs de l'antigène provoque l'activation du TCR/BCR suivie d'une cascade de signalisation et la production d'InsP₃, entraînant la libération de Ca^{2+} du RE par les récepteurs InSP₃ qui sont des canaux ioniques non sélectifs. La chute de la concentration de Ca^{2+} du RE conduit à la dissociation du Ca^{2+} à partir du domaine EF-Hand de STIM1, dépliage de la terminaison N de STIM1 et la multimérisation des protéines STIM1. STIM1 multimérisé transloque les sites de jonction du RE dans lesquelles la membrane du RE est juxtaposée à la membrane plasmique. STIM1 multimérisé forme des grappes (ou *puncta*) dans lesquelles il recrute des canaux CRAC Orai1. (Feske , 2012).

3-2- Transduction du signal lipidique médié par le CD36 lingual

L'un des premiers événements de la signalisation cellulaire est l'augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$. Nous avons vu que l'interaction entre une molécule sapide et sa structure de reconnaissance spécifique localisée au niveau du pore gustatif du bourgeon du goût aboutit à une modification de la $[Ca^{2+}]_i$ (Gilbertson et Boughter, 2003). Si le CD36 est bien un lipido-récepteur gustatif, son interaction avec un AGLC devrait également affecter la $[Ca^{2+}]_i$ des cellules réceptrices gustatives

Chapitre II : Détection des lipides par le système gustatif

l'exprimant. Pour explorer cette hypothèse, des cellules CD36-positives ont été purifiées par immuno-magnétisme à partir de papilles caliciformes de souris (Gaillard *et coll.*, 2008). Les AGLC, qu'ils soient saturés ou non, induisent de façon sélective, rapide et importante, une élévation du $[Ca^{2+}]_i$ dans les cellules réceptrice gustatives CD36-positives. Cet effet est strictement dépendant du CD36 puisqu'il n'est pas reproduit dans les cellules gustatives CD36-négatives. De plus, l'inhibition pharmacologique du site de liaison du CD36 par le *sulfo-N-succinimidyl oleate ester* (SSO) (Harmon *et coll.*, 1991) supprime totalement la réponse calcique induite par les AGLC. Finalement, les acides gras à chaîne moyenne, qui ne se lient pas au CD36, sont incapables d'induire un changement calcique dans les cellules gustatives CD36-positives (Gaillard *et coll.*, 2008). En bref, les AGLC sont bien capables d'activer des cellules réceptrices gustatives *via* le CD36.

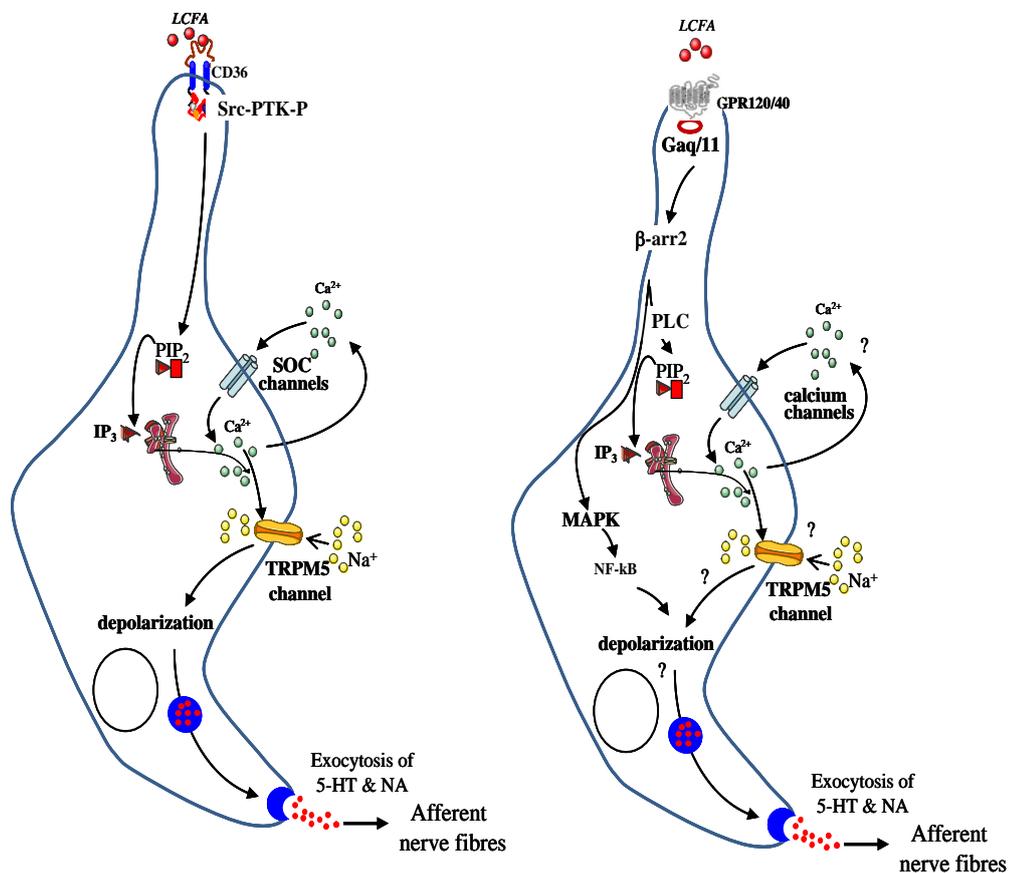


Figure 13: Mécanismes de signalisation dans les cellules gustatives : L'interaction entre un acide gras à longue chaîne (AGLC) et le CD36 induit l'activation de protéines kinases de la famille des Src, ce qui provoque l'ouverture des canaux calciques SOC (Store-Operated Calcium channels). Les AGLC semblent être également capables d'augmenter la concentration en inositol-tri-phosphate (IP3) entraînant ainsi la libération des d'ions Ca^{2+} stockés dans le réticulum endoplasmique. L'augmentation massive de la $[Ca^{2+}]_i$ qui en résulte déclenche l'exocytose de neuromédiateurs à l'origine du signal gustatif probablement *via* une dépolarisation cellulaire dépendante des canaux TRMP5. Dramane *et coll.* (2011).

Notre équipe a démontré que les AGLC, en se liant au CD36, recrutent et activent les protéines Fyn et Yes de la famille des Src protéine-tyrosine kinases (Src-PTK) (El-Yassimi *et coll.*, 2008). L'implication des Src-PTK, dans cette cascade de signalisation, n'est pas étonnante. En effet, l'interaction entre le CD36 et les protéines Fyn, Lyn et Yes a déjà été rapportée dans d'autres modèles cellulaires (Huang *et coll.*, 1991). Cette activation pourrait expliquer l'augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$ dépendante des AGLC observée chez les cellules réceptrices gustatives CD36-positives (Gaillard *et coll.*, 2008). Il apparaît que ce changement est dû à l'ouverture des canaux calciques SOC (*Store-Operated Calcium channels*) localisés au niveau de la membrane plasmique des cellules réceptrices gustatives CD36-positives. Parallèlement à cette cascade d'évènements, la présence d'un AGLC dans le milieu de culture est également capable d'augmenter la concentration en inositol-tri-phosphate (IP3) des cellules CD36-positives. Ce phénomène semble être dépendant du CD36 puisque le SSO inhibe totalement cet effet (El-Yassimi *et coll.*, 2008). Cette observation suggère que la liaison AGLC/CD36 pourrait également mobiliser le Ca^{2+} du réticulum endoplasmique *via* un mécanisme dépendant de la phospholipase C, comme c'est le cas pour le saccharose (Bernhardt *et coll.*, 1996). L'augmentation rapide et massive de la $[Ca^{2+}]_i$ qui résulte de ces évènements déclencherait l'exocytose de neuromédiateurs vers les fibres gustatives afférentes probablement *via* une dépolarisation cellulaire dépendante des canaux TRPM5 (*transient receptor potential melastatin-5*) (Figure 13). En effet, les souris TRPM5^{-/-} ne sont plus capables de faire la différence entre une émulsion lipidique et une solution témoin lors des tests à double choix (Sclafani, 2007). Il est notable que cette voie de signalisation est assez proche de celle responsable de la saveur sucrée (Figure 13).

Bien que TRPM5 soit un canal activé par le calcium, une régulation directe par l'AA a été signalée dans les cellules gustatives de souris (Oike *et coll.*, 2006, b). Par ailleurs, les cellules TRPM5 positives expriment aussi la lipase monoglycéride et la phospholipase A₂-IIA (PLA₂-IIA) responsable de la libération des acides gras libres (principalement AA) à partir des phospholipides membranaires (Oike *et coll.*, 2006, b). Grâce aux techniques de RT-qPCR et de microscopie confocale, nous avons observé que les cellules gustatives lipidiques CD36-positives expriment les différents sous-types de sPLA₂, iPLA₂, et cPLA₂. Ces différentes isoformes de PLA₂ semblent être impliquées dans la régulation de l'homéostasie du calcium dans ces cellules.

3-3- La signalisation *via* GPCR

Les ligands se lient spécifiquement aux RCPG pour stimuler et induire plusieurs types de réponses cellulaires *via* différentes voies de seconds messagers, telles que celles de l'AMPc, la PLC, *via* des canaux ioniques, et les MAPK (Schulte et Fredholm, 2003). Les mécanismes de

Chapitre II : Détection des lipides par le système gustatif

signalisation cellulaire de GPR120 et GPR40 n'ont pas encore été élucidés. Il reste aussi à les caractériser dans les cellules réceptrices du goût. Cependant, on peut citer quelques études qui ont abordé la signalisation par l'intermédiaire GPR120/40 dans différents types de cellules.

Hirasawa *et coll.* (2005) a montré que la stimulation de GPR120 par les acides gras libres conduit à l'élévation de la $[Ca^{2+}]_i$ et l'activation de la cascade des MAPK, notamment ERK. Oh *et coll.* (2010) ont rapporté que GPR120 fonctionne comme un capteur d'acides gras *n-3* et sa stimulation inhibe les deux réponses inflammatoires de TLR4-et le TNF- α . TNF- α et TLR2/3 peuvent également stimuler TAK1, en activant IKK β et JNK (Takaesu *et coll.*, 2003). Les β -arrestines peuvent servir d'échafaudage ou de protéines adaptatrices pour une large gamme de RCPG (Miller *et coll.*, 2001). La région C-terminale de GPR120 contient plusieurs (S/T)X4-5(S/T) caractéristiques des β -arrestines (Cen *et coll.*, 2001). Après la liaison du ligand, les β -arrestines peuvent s'associer avec les domaines cytoplasmiques de GPCR et se coupler au récepteur en l'aval des voies de signalisation spécifique (Luttrell *et coll.*, 2002)

Les autres candidats pour les récepteurs du goût du gras sont les canaux DRK (*delayed rectifying potassium channels*), qui sont inhibés par des acides gras polyinsaturés *in vitro* (Gilbertson *et coll.*, 1997). Ces canaux peuvent contribuer à la réponse du goût du gras, soit de façon indépendante des GPCR, soit en faisant intervenir, en partie, la cascade de transduction initiée par l'activation de GPR40 ou GPR120 (Cartoni *et coll.*, 2010). Dans les cellules du pancréas, l'acide linoléique réduit le courant potassique voltage-dépendant *via* GPR40 (Feng *et coll.*, 2006). Les voies de signalisation en aval de GPR40 et GPR120 restent à être déterminées. GPR120 et GPR40 sont peu susceptibles de se coupler à la gustducine car les souris α -gustducin knock-out ont une réaction normale à l'huile de soja (Oike *et coll.*, 2006, a).

3-4- Implication des aires cérébrales dans la perception gustative lipidique

Les informations sensorielles humorales et vagues des voies afférentes se convergent au niveau d'un centre intégrateur : le noyau du tractus solitaire (NTS). Celui-ci envoie des informations vers les différentes parties du système nerveux central (SNC), telles que l'hypothalamus latéral, le thalamus ou bien d'autres parties du cerveau. Donc le noyau du tractus solitaire (NTS) constitue le premier relais gustatif au niveau du système nerveux central (Figure 1-C). Il était donc légitime de se demander si la perception orale des lipides alimentaires pouvait affecter l'activité neuronale du NTS. Une telle activation peut être étudiée en analysant l'expression du facteur de transcription Fos. En effet, cette protéine, qui est le produit de l'oncogène *c-fos*, est un marqueur précoce de l'activité neuronale (Harrer and Travers, 1996). Nous avons ainsi pu montrer qu'un dépôt oral d'acide linoléique est suffisant pour entraîner une forte activation des parties du NTS innervées par les nerfs gustatifs (Gaillard *et coll.*, 2008). Bien que des axones de la branche mandibulaire du nerf

Chapitre II : Détection des lipides par le système gustatif

trigéminal (nerf V) provenant de la langue antérieure se projettent dans le NTS au niveau des zones innervées par les nerfs gustatifs, une stimulation d'ordre mécanique ou textural reste improbable. En effet dans ces expériences, un dépôt d'eau ou de gomme de xanthane (utilisée pour mimer la texture des lipides) n'a aucun effet stimulant sur l'activité du NTS (Gaillard *et coll.*, 2008). Il est connu que l'activation du NTS par l'acide linoléique est dépendante de la présence du CD36 lingual puisque l'activation neuronale observée chez les souris de type sauvage n'est pas reproduite chez des animaux CD36^{-/-} (Gaillard *et coll.*, 2008). Ainsi, l'information déclenchée par l'interaction du CD36 lingual avec les AGLC transite par le NTS, dont les afférences centrales et périphériques affectent respectivement l'activité des centres nerveux connus pour être impliqués dans le comportement alimentaire et dans les sécrétions digestives (Figure 14).

Selon une étude, l'hippocampe reçoit l'information de toutes les modalités sensorielles dont notamment celles gustatives à travers le cortex parahippocampal. L'analyse des neurones gustatifs a confirmé que l'hippocampe est impliqué dans la préférence des modalités gustatives et que, dans l'hippocampe, la qualité du goût est liée aux valeurs hédoniques (Ho *et coll.*, 2011). L'expression des gènes joue un rôle essentiel dans les changements qui surviennent lors de l'activation des neurones. Les gènes précoces (immediate-early genes) sont principalement induits peu de temps après l'activité neuronale. Certains gènes précoces, comme le Zif268 et le c-fos, sont des régulateurs des facteurs de transcription et sont responsables de la transcription des gènes à réponse tardive. La protéine du Zif268 également appelée EGR-1 (early growth response-1) est un facteur de transcription de la famille des Zif (zinc finger family). L'induction de la mémoire dans l'hippocampe augmente l'expression des ARNm de Zif268. ***L'élimination du gène de Zif268 chez la souris conduit à des déficits dans la mémoire des préférences alimentaires (Jones et coll., 2009).*** Otsubo *et coll.*, 2011 ont montré, pour la première fois, que l'administration intragastrique de glutamate monosodique, de sucre ou encore de NaCl active les aires cérébrales, telles que le noyau arqué et le noyau paraventriculaire *via* l'induction de l'expression du Zif268, du BDNF (brain-derived neurotrophic factor) et du Glut 1 au niveau de ces aires. Le Glut 1 est un transporteur du glucose dont la présence au niveau du cerveau reflète l'intensité de l'activité cérébrale. ***Il améliore la mémoire et l'apprentissage d'autant plus que sa quantité est élevée car l'activation neuronale exige une forte demande en glucose (Choeiri et coll., 2005).***

De plus, Chinnakkaruppan et Rosenblum (2012) ont démontré que l'apprentissage du goût au niveau du cerveau nécessite l'activation de différentes voies de signalisation dont celles des kinases ERK1/2, celles dépendantes du Ca²⁺ et celle du BDNF. ***La cascade ERK1/2 serait donc liée à l'expression du BDNF.***

L'ensemble de ces travaux montre qu'il existe, chez le rongeur, un système gustatif inédit participant à la perception oro-sensorielle des lipides alimentaires où le CD36 joue un rôle

prépondérant (Figure 14). Vu ce qui précède sur l'implication des différentes aires cérébrales, nous nous sommes donc intéressés à étudier l'état des différentes aires (noyau arqué, hippocampe et noyau du tractus solitaire) lors de la perception gustative lipidique chez la souris.

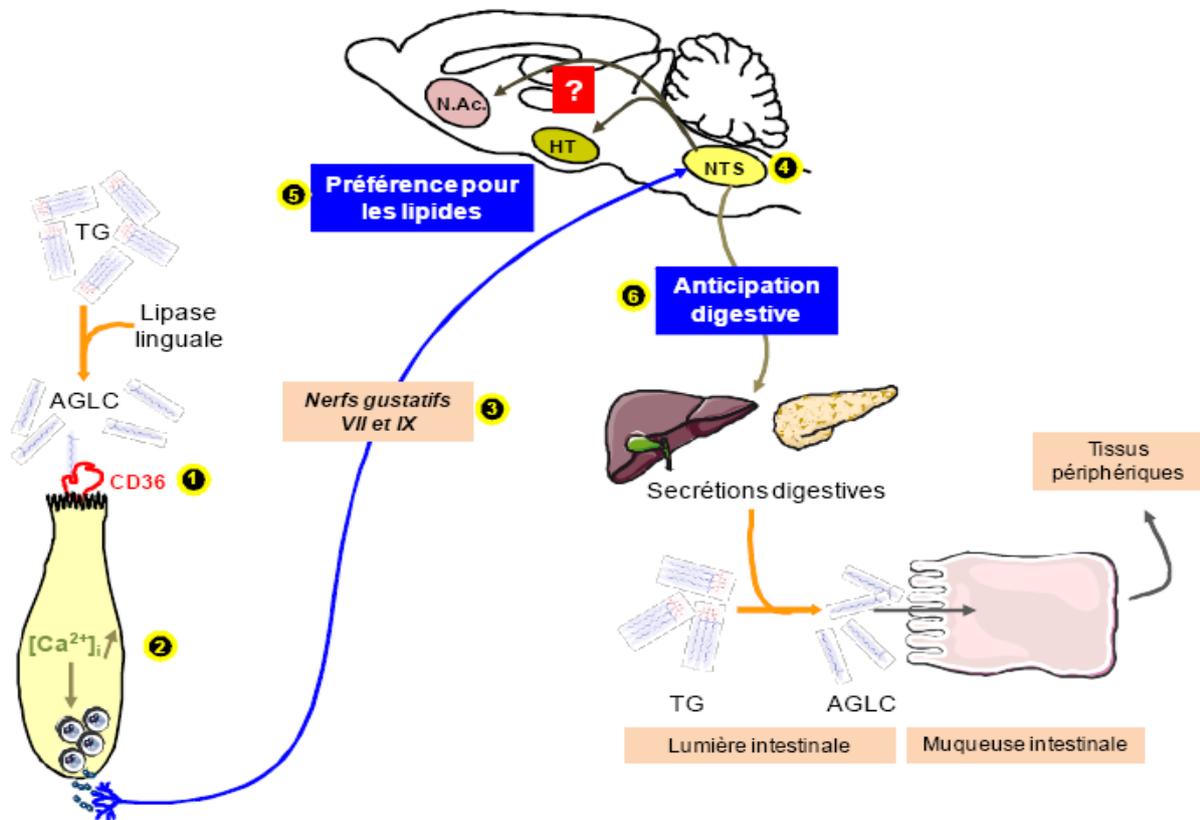


Figure 14: Rôle du CD36 dans la perception gustative des lipides alimentaires chez la souris : modèle de travail. Le CD36 lingual se comporte comme un lipido-récepteur impliqué dans la détection des acides gras à longue chaîne (AGLC) issus de l'hydrolyse des triglycérides (TG) alimentaires par la lipase linguale. (1) La reconnaissance des AGLC par le CD36 est à l'origine d'une augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$. (2) Ce changement déclenche la sécrétion de neuromédiateurs au niveau du pôle basal des cellules gustatives réceptrices. (3) Le signal lipidique est ensuite transmis au cerveau par l'intermédiaire des nerfs gustatifs. (4) Ce signal transite par les zones gustatives du noyau du tractus solitaire (NTS). Les projections efférentes centrales vers des zones connues pour être impliquées dans le comportement alimentaire (Hypothalamus, HT ; Noyau accumbens, N Ac) et périphériques (tractus digestif) peuvent expliquer respectivement la préférence pour les AGLC (5) et l'activation de la phase céphalique de la digestion observée chez des souris soumises à un dépôt lingual de lipides (6).

Chapitre III

Voies de signalisation des MAPKs

Les cellules perçoivent les changements de leur environnement par l'intermédiaire de récepteurs, le plus souvent membranaires. Ces récepteurs vont transmettre le signal extracellulaire à l'intérieur de la cellule en activant une série de modifications protéiques ou « cascade de signalisation » qui va permettre à la cellule de réagir. Les voies de signalisation des MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase) permettent l'engagement rapide d'un programme d'expression génique en réponse à un stimulus. Ces voies de signalisation ont été extrêmement bien conservées au cours de l'évolution et sont constituées de protéines kinases qui s'activent en cascade et transmettent le signal par une suite d'interaction entre protéines. Les voies de signalisation des MAPK, comme celles de p38 (ERK6, SAPK3), de JNK et de MAPK1/3 (ERK2/1, p42p44MAPK) jouent un rôle important dans l'apoptose cellulaire.

1- Voies de signalisation de JNK et p38

Les kinases JNK et p38 appartiennent à la famille des SAPK (Stress-Activated Protein Kinase).

1-1- Voie JNK

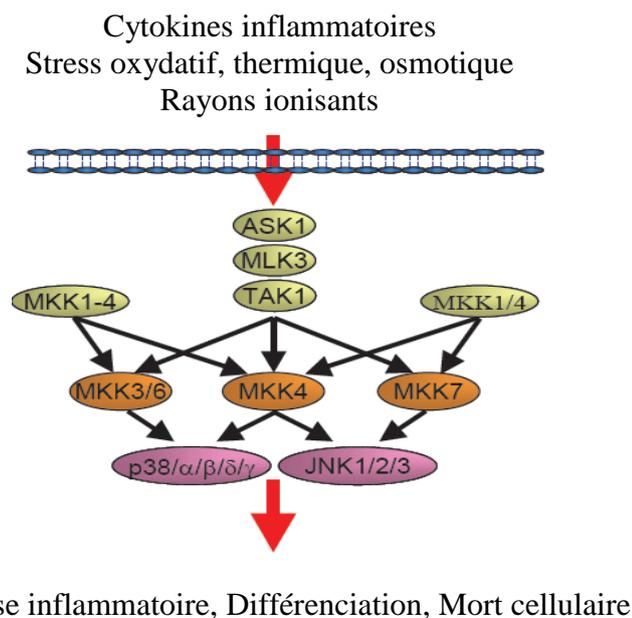
La voie JNK (c-Jun NH₂-terminal Kinase) est activée par les stimuli de stress comme le choc thermique ou osmotique, les cytokines inflammatoires comme le TNF α , les rayons ionisants et les inhibiteurs de la synthèse protéique. Il existe trois isoformes de la kinase JNK : JNK1(MAPK8), JNK2(MAPK9) et JNK3(MAPK10) (Derijard *et coll.*, 1994 ; Kyriakis *et coll.*, 1994), et chacune est exprimée sous deux formes, une longue de 55KDa et une courte de 46KDa (Gupta *et coll.*, 1995). Les kinases JNK sont activées par phosphorylation des résidus thréonine et tyrosine de leur boucle d'activation (motif TPY) par les MAPK Kinases MKK4 et 7, qui sont elles-mêmes activées par plusieurs MAPKK Kinases comme MEKK1/2/3/4, MLK (mixed lineage kinase), MUK (MAPK Upstream Kinase) /DLK/ ZPK, TAK (TGF β Activated Kinase), Tpl2 (pour Tumor progression locus) ou encore ASK1 (Apoptotic Signal regulated Kinase) (Kyriakis *et coll.* 2001). Une fois activées, les kinases JNK transloquent dans le noyau pour y activer des facteurs de transcription comme ATF2 (Activating transcription factor-2) par phosphorylation (Gupta *et coll.*, 1995). La voie

Chapitre III : Voies de signalisation des MAPKs

JNK joue un rôle important lors de l'inflammation en induisant le TNF α ou en stabilisant les ARNm d'IL-2, d'IL-3 et du VEGF-A. La voie JNK est activée par de nombreux stimuli proapoptotiques comme les UV, l'activation de Fas ou les céramides (Liu *et coll.*, 2005). Elle joue un rôle important dans l'induction de la mort cellulaire, en particulier dans les neurones : l'inactivation de JNK1 et JNK2 diminue l'apoptose des neurones durant le développement (Kuan *et coll.*, 1999 ; Sabapathy *et coll.*, 1999) et l'inactivation de JNK3 diminue l'apoptose neuronale suite au traitement au kainate (Yang *et coll.*, 1997). L'une des fonctions de la voie JNK serait d'activer la kinase proapoptotique ASK1 (Chen *et coll.*, 1999).

1-2- Voie p38

Comme JNK, la voie p38 est activée par le stress thermique et osmotique et les cytokines inflammatoires. La voie p38 est composée de quatre protéines p38 α /Mpk2/CSBP, p38 β , p38 δ /SAPK4 et p38 γ /SAPK3. Ces protéines kinases sont activées par phosphorylation des résidus thréonine et tyrosine de leur boucle d'activation par les MAPK Kinases MKK3, 4 et 6 (Brancho *et coll.*, 2003 ; Derijard *et coll.*, 1995). Les MAPKK impliquées dans la voie p38 sont TAK1 ASK1/MAPKKK5, MUK/DLK/ ZPK, MLK3 et MEKK4 (Zarubin *et coll.*, 2005). La voie p38 joue un rôle important dans l'induction des gènes impliqués dans la réponse inflammatoire (Kontoyiannis *et coll.*, 2001) et dans la différenciation des neurones et des myoblastes (Puri *et coll.*, 2000). La voie p38 est aussi impliquée dans l'apoptose induite par Fas (Juo *et coll.*, 1997) par la perte d'ancrage (Cardone *et coll.* 1997) et pourrait jouer un rôle synergique avec la voie JNK dans l'induction de l'apoptose comme lors de l'enlèvement de NGF dans les cellules PC12 (Xia *et coll.*, 1995).



Réponse inflammatoire, Différenciation, Mort cellulaire

Figure 15: La voie des kinases de stress JNK/p38MAPK : Les voies de signalisation des kinases JNK et p38 appartiennent à la famille des SAPK (stress-activated protein kinase). Comme JNK, la voie p38 est activée par différents stress extracellulaires et les cytokines inflammatoires. Les voies des kinases JNK/p38MAPK sont composées

d'un module multi-protéique comportant différentes protéines kinases activées par phosphorylation selon un ordre hiérarchique : les MKKK activent les MKK qui activent finalement les MPAK JNK ou p38.

2- Voie Ras/Raf/MAPK

La voie des MAPK1/3 est composée d'un module multi-protéique où les kinases Raf, MEK et MAPK1/3 sont activées en cascade par des phosphorylations séquentielles. La stimulation des récepteurs membranaires couplés à Ras, comme les récepteurs aux facteurs de croissance, active la kinase initiatrice de la voie des MAPK1/3, Raf, par un mécanisme complexe impliquant à la fois la phosphorylation et la déphosphorylation. Raf active les kinases à spécificité tyrosine et thréonine : MEK1 et MEK2 qui activent, à leur tour, les kinases MAPK1 et MAPK3. Les kinases MAPK1/3 vont transmettre le signal généré par les récepteurs en phosphorylant une multitude de substrats dans différents compartiments sub-cellulaires, ce qui conduit à l'exécution de fonctions biologiques aussi diverses que la prolifération cellulaire, la différenciation cellulaire et la migration cellulaire.

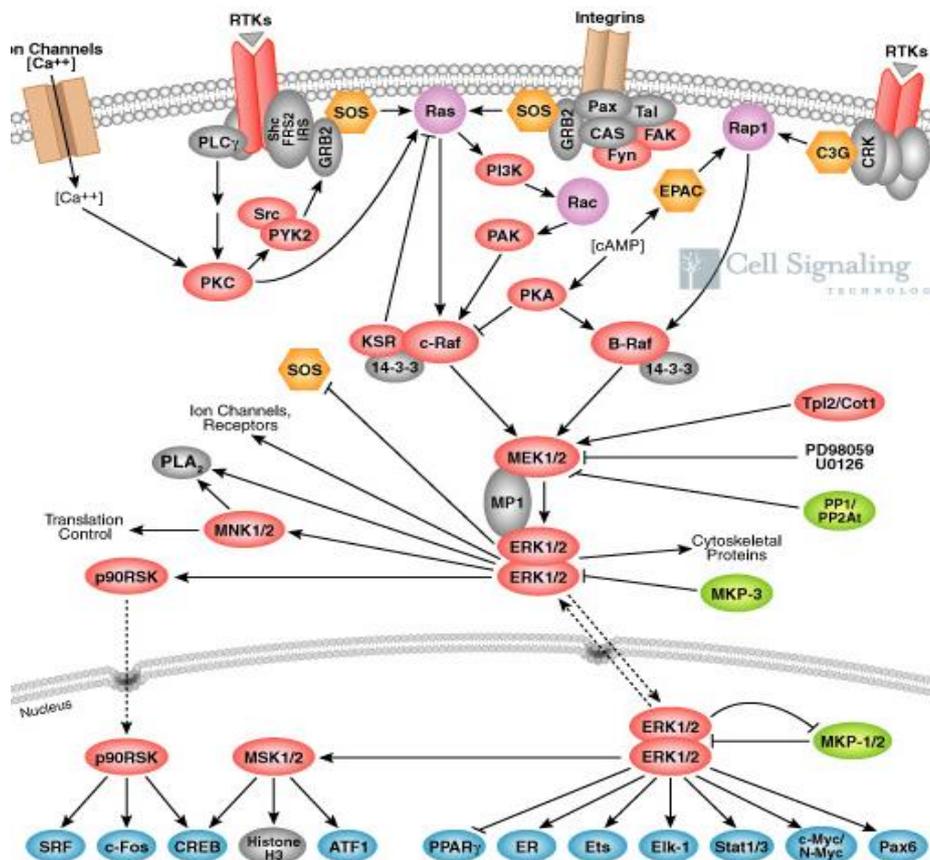


Figure 16: La voie de signalisation Raf/MAPK : La stimulation des récepteurs membranaires couplés à Ras, comme les récepteurs aux facteurs de croissance, active Raf par un mécanisme complexe. La kinase Raf, initiatrice de la voie des MAPK1/3, active par une double phosphorylation les kinases à spécificité tyrosine et thréonine (MEK1/2) qui phosphorylent et activent les kinases MAPK1/3. Les MAPK1/3 activées sont libérées du complexe et transmettent le

Chapitre III : Voies de signalisation des MAPKs

signal généré par les récepteurs en phosphorylant une multitude de substrats dans différents compartiments sub-cellulaires.

2-1- L'activation de Ras par les récepteurs à activité tyrosine kinase

Suite à la stimulation des récepteurs à activité tyrosine kinase comme le récepteur à l'EGF, les protéines SOS1 et 2 (Son Of Sevenless) sont relocalisées du cytoplasme vers la membrane plasmique où elles se lient à la protéine GRB2 (Growth-factor-Receptor-Bound protein 2). SOS, qui est une protéine facteur d'échange GDP contre GTP, induit un changement de conformation de la protéine membranaire Ras, en catalysant la transformation de la forme Ras-GDP à la forme active Ras-GTP (Downward, 1996).

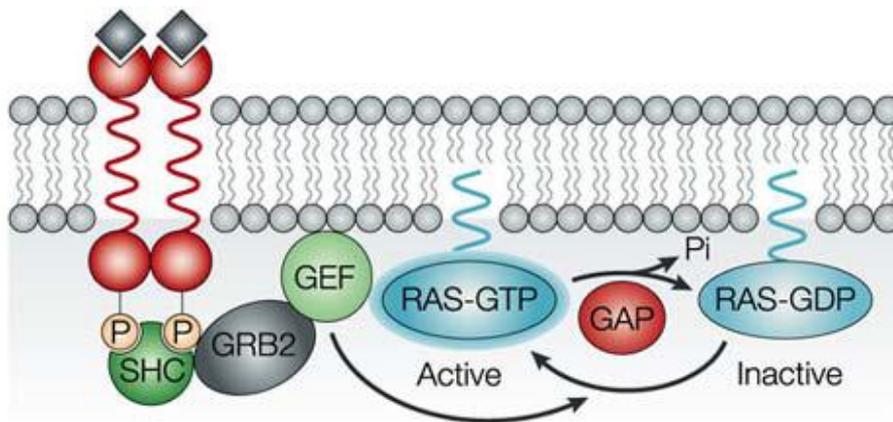


Figure 17: L'activation de Ras

Chez les mammifères, il existe quatre isoformes de la protéine Ras, H-Ras, N-Ras et K-Ras 4A et 4B, codées par trois gènes, le gène *K-ras* étant régulé par épissage alternatif. L'une des fonctions de ces protéines est de recruter et d'activer Raf à la membrane plasmique. Bien que chacune de ces 4 isoformes s'associe à la kinase Raf, elles n'ont pas la même efficacité pour l'activer. Ainsi *in vitro* K-ras est la plus efficace de ces isoformes pour activer la voie des MAPK1/3 (Voice *et coll.*, 1999 ; Yan *et coll.*, 1998). Il a été montré récemment que le signal de prénylation de H-Ras et KRas pouvait les localiser à la membrane du réticulum endoplasmique et du golgi où elles peuvent activer la voie Raf/MAPK (Chiu *et coll.*, 2002).

2-2- La kinase Raf

La kinase Raf est exprimée chez l'homme sous trois isoformes A-Raf, B-Raf et C-Raf ou Raf1. L'isoforme Raf1 est exprimée fortement dans tous les tissus tandis que A-Raf est exprimée dans les tissus urogénitaux et dans les muscles, et B-Raf dans les neurones, les testicules et les cellules hématopoïétiques (Chong *et coll.*, 2003 ; Kolch, 2000). De plus, l'épissage alternatif du gène *B-raf* conduit à 10 isoformes possédant toutes le domaine de fixation à Ras et le domaine

Chapitre III : Voies de signalisation des MAPKs

kinase. Ces isoformes diffèrent au niveau des deux premiers exons et des exons 8b et 10a. La présence de l'exon 10a augmente l'activation de MEK par B-Raf alors que la présence de l'exon 8a fait l'inverse (Peyssonnaud et Eychene, 2001). Les kinases Raf possèdent trois régions conservées, les régions CR1, CR2 et CR3. La région CR1 contient deux domaines de liaison à Ras : le domaine de liaison à Ras (domaine RBD pour Ras binding domain) et le domaine CRD riche en cystéine. Le domaine CR2 est riche en résidus sérine et thréonine dont la phosphorylation est nécessaire à l'activation de Raf. Le domaine CR3 carboxy-terminal correspond au domaine kinase de Raf.

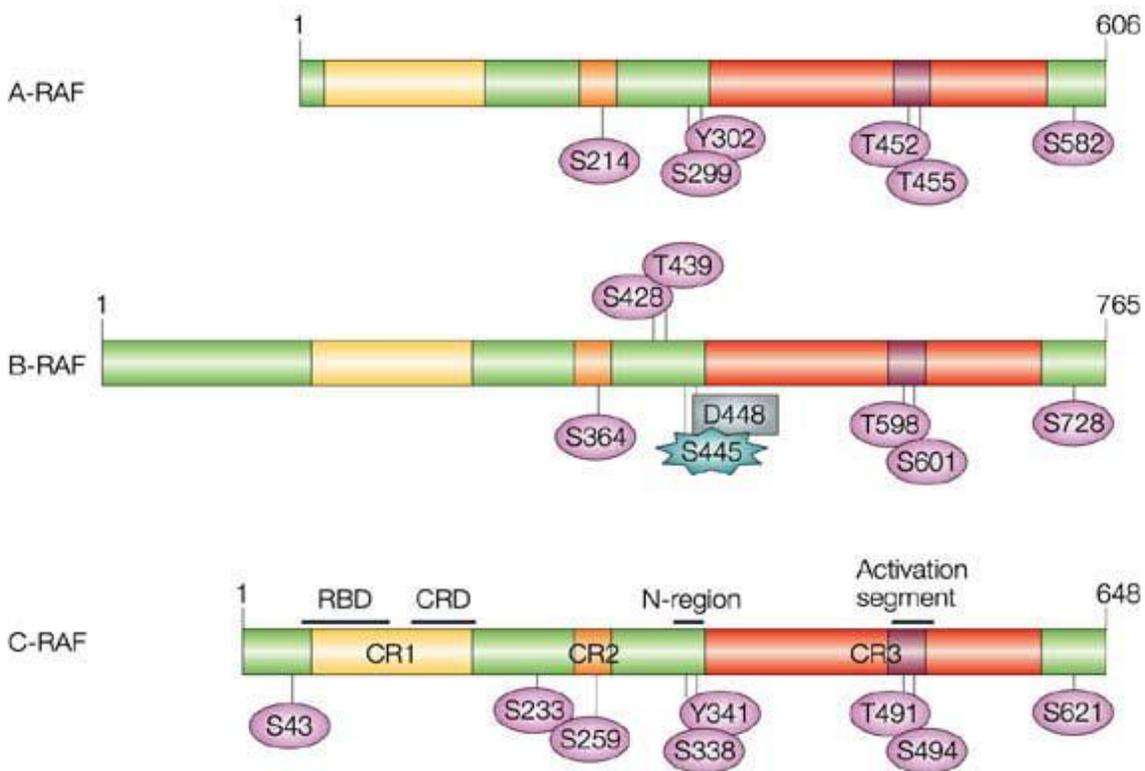


Figure 18: Les trois isoformes de Raf

La kinase Raf est exprimée chez l'homme sous trois isoformes A-Raf, B-Raf et C-Raf ou Raf1. Les kinases Raf possèdent trois régions conservées, les régions CR1, CR2 et CR3. La région CR1 contient deux domaines de liaison à Ras, le domaine de liaison à Ras (domaine RBD pour Ras binding domain) et le domaine CRD riche en cystéine. Le domaine CR2 est riche en résidus sérine et thréonine dont la phosphorylation est nécessaire à l'activation de Raf. Le domaine CR3 carboxy terminal correspond au domaine kinase de Raf. Ce domaine possède aussi plusieurs sites de phosphorylation contrôlant l'activité de Raf, notamment les sites du segment d'activation.

3- Les kinases MEK1 et MEK2

Chapitre III : Voies de signalisation des MAPKs

MEK1 et MEK2 sont des protéines kinase à double spécificité sérine/thréonine. MEK1 (45KDa) et MEK2 (47KDa) présentent 80% d'homologie entre elles et diffèrent au niveau de leur extrémité carboxy-terminale (Zheng *et coll.*, 1993). Il existe une forme épissée de MEK1, MEK1b, qui ne présente plus d'activité kinase (Zheng *et coll.*, 1993). Ces deux kinases ne partagent pas le même profil d'expression. Chez la souris il a été montré que MEK2 est exprimée fortement dans tous les tissus embryonnaires alors que MEK1 semble être exprimée plus fortement chez l'adulte (Alessandrini *et coll.*, 1997). En plus de leur domaine kinase, les kinases MEK possèdent trois domaines importants : un domaine de liaison aux MAPK, un domaine NES d'export nucléaire et un domaine riche en proline (Chen *et coll.*, 2001).

Le domaine D de fixation aux MAPK se situe à l'extrémité amino-terminale des MEK et contient des résidus basiques et hydrophobes qui interagissent avec le domaine CD des MAPK, qui lui contient des résidus acides. Le domaine NES (nuclear export signal) est lui aussi situé dans la partie amino terminale de MEK. Ce domaine favorise la localisation cytoplasmique des kinases MEK (Lenormand *et coll.*, 1993 ; Tolwinski *et coll.*, 1999) et contribue à augmenter l'export nucléaire des MAPK (Adachi *et coll.*, 2000). La délétion de cette séquence augmente d'ailleurs l'activation des MAPK ainsi que les capacités de transformation de MEK (Fukuda *et coll.*, 1997). Le domaine riche en proline est situé dans la partie carboxy terminale et permet l'interaction avec des protéines à domaine SH3 comme MP-1 (Schaeffer *et coll.*, 1998) et Grb10 (Nantel *et coll.*, 1998).

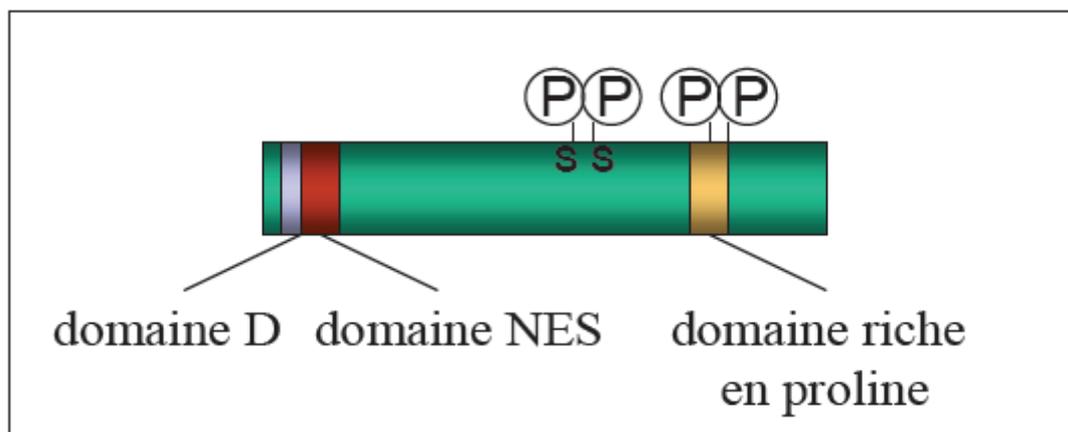


Figure 19: La kinase MEK

3-1- L'activation des MEK

Les kinases MEK1/2 sont phosphorylées par Raf sur deux résidus sérine, les résidus S218 et S222 dans le cas de MEK1 et S222/226 pour MEK2 (Zheng *et coll.*, 1994). Le remplacement de ces deux résidus par des résidus chargés négativement permet l'activation constitutive des MEK

Chapitre III : Voies de signalisation des MAPKs

(Mansour *et coll.*, 1996). Les trois isoformes de Raf n'activent pas les kinases MEK avec la même efficacité. La kinase A-Raf est l'isoforme qui active le moins bien MEK tandis que B-Raf est la meilleure. B-Raf présente la meilleure affinité de liaison à MEK1/2 et présente la plus forte activité kinase envers MEK (Papin *et coll.*, 1998). MEK1 est aussi phosphorylée sur son résidu S298 par PAK, ce qui augmente l'association de MEK avec Raf et avec MAPK1 (Slack-Davis *et coll.*, 2003). A l'inverse, la phosphorylation de MEK1 par les MAPK sur son résidu T292 empêche la phosphorylation de MEK par PAK, diminuant ainsi l'activité de MEK (Eblen *et coll.*, 2004).

3-2- Les inhibiteurs pharmacologiques de MEK et leurs limites

Les inhibiteurs spécifiques de MEK utilisés en recherche sont nombreux. Les inhibiteurs comme, l'U0126 (Favata *et coll.*, 1998), le PD184352 (Sebolt-Leopold *et coll.*, 1999) et, le PD98059 (Dudley *et coll.*, 1995) sont des inhibiteurs spécifiques non compétitifs de la fixation de l'ATP qui bloquent la kinase MEK dans une forme inactivable par Raf. Ces inhibiteurs peuvent inhiber l'expression de phospho-EK1/2 (p-ERK1/2) à des durées variables in vitro (Henderson *et coll.*, 2010). PD98059 a une durée de vie courte (inférieure à 24h) (Schulze *et coll.*, 2004) et n'inhibe pas la forme active de MEK (Alessi *et coll.*, 1995). De plus, plusieurs études, dont celle du groupe du Dr P Cohen (Davies *et coll.*, 2000), montrent que ces inhibiteurs peuvent avoir des effets non spécifiques importants. PD98059 et U0126 inhibent la kinase MEK5 (Khokhlatchev *et coll.*, 1998). Dans des vésicules pré-synaptiques (synaptosomes) isolées, le PD98059 bloque l'influx de calcium induit par la dépolarisation et l'U0126 augmente la sortie de glutamate indépendamment du calcium (Pereira *et coll.*, 2002). Le PD98059 peut aussi inhiber les cyclooxygénases 1 et 2, qui jouent un rôle important dans l'agrégation des plaquettes (Pereira *et coll.*, 2002), mais aussi dans la survie cellulaire en stabilisant la protéine survivin (Krysan *et coll.*, 2004). U0126 a des effets non spécifiques sur des résultats expérimentaux basés sur la fluorescence, comme la quantification de la mort par fixation de l'annexine V couplée au FITC. La composition chimique aromatique de l'U0126 peut augmenter la fluorescence et donc le signal de mort. (Blank *et coll.*, 2002). Enfin, il a été montré qu'en absence de glucose, l'U0126 et le PD184161 ont un effet inhibiteur sur la sous-unité F0F1ATPase de l'ATP synthétase mitochondriale (Yung *et coll.*, 2004). **PD0325901** est une petite molécule de deuxième génération fabriquée par Pfizer avec une activité spécifique contre MEK1/2. En comparant avec les inhibiteurs pré-cités PD0325901, est plus puissant et possède moins d'effets secondaires (Henderson *et coll.*, 2010). C'est pourquoi nous l'avons choisi dans notre étude.

4- Les MAPK1/3

Les MAPK1/3 aussi nommées ERK2/1 (Extracellular Regulated Kinase) ou p42/p44 MAPK (p42 et p44 correspondant à leur poids moléculaire respectif de 42 et 44KDa) sont les premiers membres de la famille MAPK à avoir été caractérisés (Ray *et coll.*, 1987). MAPK1 et MAPK3 sont exprimées de façon ubiquiste. Il existe un variant d'épissage alternatif de MAPK3, MAPK3b (Yung *et coll.*, 2000) qui n'interagit pas avec MEK ainsi qu'un variant d'épissage alternatif de MAPK1 (Gonzalez *et coll.*, 1993). Les MAPK possèdent à leur extrémité carboxy-terminale un domaine CD riche en résidus acides, qui permet d'interagir avec leurs substrats au niveau de sites de fixation formés par des résidus basiques comme le domaine D de MEK. Les MAPK sont activées par la phosphorylation concomitante des résidus thréonine et tyrosine de leur boucle d'activation. MEK phosphoryle les résidus T202/Y204 pour MAPK1 et T185/Y187 pour MAPK3 (Payne *et coll.*, 1991). Cette double phosphorylation est nécessaire à leur activité (Posada *et coll.*, 1992). Le mécanisme de phosphorylation pourrait nécessiter la dissociation et la réassociation du complexe MEK/MAPK (Burack *et coll.*, 1997). Le premier résidu phosphorylé semble être le résidu tyrosine (Ferrell *et coll.*, 1997). Une fois activées, les MAPK se détachent de MEK et vont phosphoryler de nombreux substrats dans différents compartiments subcellulaires comme le récepteur à l'EGF membranaire, la protéine calnexine du réticulum endoplasmique, la phospholipase A2 cytosolique, la carbamyl phosphate synthétase mitochondriale ou encore les facteurs de transcription dans le noyau (Chen *et coll.*, 2001). Les MAPK phosphorylent les résidus sérine et thréonine de leurs substrats uniquement s'ils sont adjacents d'une proline et de préférence s'ils possèdent un autre résidu proline en position -2 (séquence consensus P-XS/T-P). La phosphorylation des substrats permet de contrôler leur activité. Elle est souvent impliquée dans le contrôle de leur stabilité soit en empêchant leur dégradation par le protéasome comme dans le cas de c-Fos (Okazaki *et coll.*, 1995) ou de MKP1, soit en augmentant leur taux de dégradation comme pour MKP3 (Marchetti *et coll.*, 2005).

5- Le contrôle de l'activité des MAPK par les phosphatases

L'activité des MAPK qui nécessite leur phosphorylation sur les deux résidus thréonine et tyrosine de la boucle d'activation (Posada *et coll.*, 1992), est finement contrôlée par l'équilibre entre l'activité des kinases et des phosphatases qui ciblent ces deux résidus. Trois familles de phosphatases peuvent déphosphoryler les MAPK : les sérines / thréonines phosphatases comme PP2A (Alessi *et coll.*, 1995), les phosphatases tyrosines spécifiques comme PTP-SL, STEP (Tarrega *et coll.*, 2002) ou HePTP (Pettiford *et coll.*, 2000), et les phosphatases à double spécificité

Chapitre III : Voies de signalisation des MAPKs

DUSP (DUal Specificity Phosphatase) ou MKP (MAP Kinases Phosphatases). Cette famille de phosphatases comprend les phosphatases nucléaires MKP1/DUSP1 et MKP2/DUSP4 qui déphosphorylent les MAPK mais aussi P38MAPK et JNK, ainsi que la phosphatase cytosolique MKP3/DUSP6 qui ne déphosphoryle que les MAPK1/3 et MAPK5 (Camps *et coll.*, 2000 ; Keyse, 2000). La voie MAPK induit l'expression de MKP1 et 2 (Brondello *et coll.*, 1997) et leur stabilisation par phosphorylation directe (Brondello *et coll.*, 1999). A l'inverse, la phosphorylation de MKP3 par les MAPK favorise sa dégradation (Marchetti *et coll.*, 2005). Enfin il faut noter que les MKP1 (Slack *et coll.*, 2001) et MKP3 (Camps *et coll.*, 1998) sont activées par changement de conformation lors de leur association avec les MAPK1/3.

6- Localisation des MAPK

Les MAPK1/3 se déplacent de façon continue entre le cytoplasme et le noyau par simple diffusion (Fukuda *et coll.*, 1997), indépendamment de leur état d'activation (Volmat *et coll.*, 2001). Il semble cependant que la localisation nucléaire des MAPK soit liée à leur capacité de dimériser (Khokhlatchev *et coll.*, 1998). Selon les cellules et le type de stimulation, les MAPK peuvent s'accumuler dans l'un ou l'autre de ces compartiments. L'association des MAPK à MEK favorise leur localisation cytosolique à cause du domaine NES de MEK (Adachi *et coll.*, 2000). Lors de leur activation par les agents mitogènes, les MAPK se détachent de MEK pour s'accumuler dans le noyau, une étape nécessaire pour la prolifération (Lenormand *et coll.*, 1993). Dans les astrocytes, l'expression de la protéine cytoplasmique PEA15 séquestre les MAPK dans le cytoplasme pour empêcher la prolifération (Formstecher *et coll.*, 2001).

7- La durée d'activation des MAPK

L'intensité et la durée d'activation des MAPK jouent un rôle majeur dans la réponse MAPK. Selon l'intensité du niveau d'activité des kinases MAPK, la voie Raf/MAPK favorise à la fois l'entrée en phase G1 du cycle en induisant la cycline D1 et le blocage des cellules en phase G1 en induisant l'inhibiteur de cdk2, p21. Ainsi, une stimulation de faible intensité des MAPK permet d'induire la cycline D1 et favorise l'entrée des cellules en phase S (Pages *et coll.*, 1993). A l'inverse, une forte activation des MAPK favorise l'induction de p21 et l'arrêt en phase G1 du cycle cellulaire, par inhibition de l'activité de cyclin-cdk (Sewing *et coll.*, 1997). La différenciation des cellules PC12 est l'exemple le plus utilisé pour illustrer la relation entre l'intensité de stimulation MAPK et la réponse biologique. Dans ce modèle cellulaire, la stimulation transitoire des MAPK avec des agents mitogéniques, comme l'EGF, permet la croissance, alors que l'activation prolongée des MAPK, suite à la stimulation par des facteurs neurotrophiques comme le NGF, entraîne l'arrêt

8- Les fonctions de la voie des MAPK

8-1- MAPK et prolifération cellulaire

Lorsque l'on stimule des fibroblastes quiescents avec du sérum, les MAPK sont activées de façon biphasique avec un premier pic d'activation de 5 mn, suivi d'un second pic atténué qui dure environ 1H, et un retour progressif au niveau basal avant la fin de la phase G1. Le second pic d'activation des MAPK est en corrélation avec la progression des cellules en phase S (Pages *et coll.*, 1993). Cette activation permet l'induction de cycline D1 et l'activation du complexe Cdk4/cycline D1 nécessaire à la progression dans le cycle cellulaire (Lavoie *et coll.*, 1996). L'activation des MAPK1/3 augmente la synthèse des nucléotides, en régulant l'activité de la CPSII (Carbamoyl Phosphate Synthetase II) (Graves *et coll.*, 2000), ainsi que la traduction en activant le facteur de traduction eIF4E (Raught *et coll.*, 1999). La voie Raf/MAPK favorise également la réorganisation de la chromatine et l'activation de certains gènes en phosphorylant le résidu serine 10 de l'histone H3 (Zhong *et coll.*, 2000). Enfin, les MAPK augmentent la prolifération cellulaire en activant directement les facteurs de transcription Elk, c-Fos, c-Jun, Ets1/2 et cMyc ou encore le facteur CREB *via* l'activation de Rsk (pour revue (Chang *et coll.*, 2003).

8-2- La différenciation cellulaire

La voie MAPK joue un rôle important dans le développement embryonnaire et la différenciation cellulaire. Ainsi l'inactivation de *mapk1* provoque la létalité embryonnaire entre les jours embryonnaires J6.5 et J11.5 suite à l'absence de développement de l'ectoderme extra-embryonnaire, du cône ectoplacentaire, à l'absence de différenciation de la lignée conduisant au développement du mésoderme (Yao *et coll.*, 2003), et à des défauts dans le développement du placenta (Hatano *et coll.*, 2003). L'inactivation de *mapk3* provoque une altération de la différenciation des thymocytes en lymphocytes simples positifs CD4+ CD8+ (Pages *et coll.*, 1999). La voie Raf/MAPK a été impliquée aussi dans la différenciation de l'épithélium intestinal (Taupin *et coll.*, 1999), des cellules musculaires (Gredinger *et coll.*, 1998) et des adipocytes (Porrás *et coll.*, 1994).

8-3- La migration cellulaire

La voie des MAPK1/3 joue un rôle important dans la migration cellulaire et dans le remodelage de la matrice extracellulaire. L'inactivation de *mek1* (Giroux *et coll.*, 1999) et de *raf-1* (Ehrenreiter *et coll.*, 2005) provoque un défaut de migration cellulaire. L'activation des MAPK

Chapitre III : Voies de signalisation des MAPKs

favorise la migration en phosphorylant la kinase MLCK (Myosin Light Chain Kinase) (Klemke *et coll.*, 1997), la paxiline (Liu *et coll.*, 1999) et la calpain (Glading *et coll.*, 2004) qui sont impliquées dans la dynamique des adhésions focales. Les MAPK sont aussi impliquées dans le remodelage de la matrice extracellulaire en activant les métalloprotéases (Huang *et coll.*, 2004).

8-4- Fonctions neuronales

La voie Raf/MAPK est activée lors de la stimulation des récepteurs NMDA par le glutamate (Xia *et coll.*, 1996). Les MAPK sont impliquées dans la modulation de la transmission synaptique en particulier lors de la libération de neurotransmetteurs (Sweatt *et coll.*, 2004). La voie Raf/MAPK joue un rôle dans la plasticité synaptique, notamment au cours du processus de potentialisation à long terme dans l'hippocampe qui permet l'apprentissage et la mémorisation (Sweatt *et coll.*, 2004). Ainsi, les souris invalidées MAPK3 ont une augmentation de leur capacité de mémorisation (Mazzucchelli *et coll.*, 2002).

9- Les MAPKs jouent-elles un rôle dans la perception du signal gustatif

L'activation de CD36 active plusieurs voies de signalisation cellulaires. De nombreux travaux démontrent l'activation de la voie des MAPK suite à celle de CD36. Suite à l'activation de CD36, les p38 MAP Kinases sont activées dans les cellules endothéliales TSP-1, JNK 2 dans les macrophages *via* la src-PTK, FYN. Dans les plaquettes, les LDL oxydés recrutent FYN et LYN pour induire la phosphorylation de MKK4 et JNK2 (Chen *et coll.*, 2008). Dans les macrophages de rats, le sérum Amyloid A (SAA, une famille d'apolipoprotéines) active le CD36 puis les 3 familles de MAP Kinases, principalement JNK. Dans les cellules HEK293, une lignée cellulaire transfectée avec un plasmide contenant CD36, l'activation par SAA du CD36 induit l'activation de 2 familles de MAP Kinases, les ERK1/2, et les JNK, ceci augmente l'expression de cytokines, l'IL-8 (Baranova *et coll.*, 2010). Les SR-BI/CLA-1 présents dans l'intestin, jouent un rôle dans le "sensing" des micelles postprandiales. Leur activation induit l'activation de 5 protéines Kinases: pAK1/2/3, MEK1, p38a, ERK1/2, et PKA, dont des MAP Kinases. Ces protéines kinases vont induire la sécrétion de triglycérides riches en lipides (Béaslas *et coll.*, 2009). Récemment, une étude sur des cellules CHO (*chinese hamster ovary*) a montré que la libération d'AA est régulée par des PLA₂ activés par la phosphorylation des ERK1/2. (Kuda *et coll.*, 2011).

En ce qui concerne les papilles gustatives, l'existence des voies de signalisation impliquant les MAP Kinases a été mise en évidence. Dans ces cellules, un facteur de croissance (epidermal growth factor) régule la croissance des papilles gustatives grâce aux récepteurs EGFR (epidermal growth factor family) en activant MEK/ERK, p38 Kinase, et PI3K/Akt (phosphatidylinositol 3-

Chapitre III : Voies de signalisation des MAPKs

Kinase) (Liu *et coll.*, 2008). De même, dans les cellules neuronales, les récepteurs AMPA de la région pré synaptique activent les MAP Kinases par l'intermédiaire des src PTK (Schenk *et coll.*, 2005). Les caractéristiques neuronales des cellules gustatives laissent penser qu'un tel système serait impliqué dans leur signalisation.

L'activation des cellules PC12 par la pardaxine induit l'activation de MEK-ERK de manière calcium dépendante et la libération de dopamine (Bloch-shilderman *et coll.*, 2001). Tous ces résultats laissent envisager une implication de la voie des MAPK dans la signalisation des cellules gustatives. A nos jours aucun travail formel n'a été effectué.

Partant du fait que dans les cellules neuronales, l'activation des MAP Kinases facilite l'exocytose des neurotransmetteurs et augmente le recyclage des vésicules (Bloch-Shilderman et coll., 2001), il est possible que dans les cellules gustatives, le CD36 soit couplé à l'activation des MAP Kinases, particulièrement la voie des ERK1/2.

Chapitre IV

Obésité : modèle d'étude

Depuis le début de l'expérimentation en biologie, les animaux sont utilisés pour étudier des phénomènes inabordables chez l'homme. Le développement depuis 1985, de procédure d'inactivation chez la souris de gènes suspects d'un rôle en pathologie humaine, a produit des souris dites « modèles de maladies humaines » avec l'implicite d'une identité des processus physiopathologiques entre homme et souris. C'est précisément ce statut de non-identité homme/animal qui est implicitement récusé par l'expression « animal-modèle » telle qu'on l'utilise à partir des années 1980-1985. Elle implique en effet la capacité de reproduction chez la souris (en générale) de la totalité de ce qui se passe chez l'homme. Ces souris sont parfois même une construction scientifique artificielle assez éloignée des populations naturelles de souris (G. Gachelin, (2008).

IL n'est pas dépourvu d'intérêt de noter que l'usage de l'expression survient après plusieurs décennies de mise en place de l'étude de divers mutants de souris, en cancérologie mais surtout à propos de l'obésité. Gaudillière, travaillant sur les modèles munis de l'obésité à clairement montré qu'une véritable industrie de production des souris et une politique de communication méthodique aient ancré dans le public l'idée que la souris était un modèle représentatif de l'humain au plan de la maladie et de certains comportements, alimentaires. Gaudillière, (2006).

1- Obésité induite

1-1- Généralités

Il existe différentes souches d'animaux génétiquement obèses:

- Les souris *ob/ob*, qui sont des souris homozygotes déficientes pour le gène de la leptine,
- les souris *db/db*, qui présentent une mutation des récepteurs à la leptine (obèses et également diabétiques),
- les rats Zucker obèses (*fa/fa*), qui sont homozygotes récessifs pour le gène des récepteurs à la leptine.

Les modèles homozygotes de l'obésité ne sont pas assez proches de la pathologie humaine. En effet, on n'observe pas de résistance à la leptine chez ces animaux. Cette résistance, observée chez l'homme, semble être due à une altération du transport de la leptine à travers la BHE, ou à une

Chapitre IV : Obésité : modèle d'étude

altération de la signalisation de la leptine, et non à un défaut de production de la leptine, comme chez la souris *ob/ob*. De plus, les mutations présentes dans ces modèles ne sont pas mises en cause dans l'augmentation de l'obésité humaine, qui est plutôt due à notre mode de vie (augmentation de la prise de nourriture et diminution des activités physiques) (Haslam and James, 2005). Ces modèles ne permettent pas non plus d'étudier le développement progressif de l'obésité.

Pour palier aux inconvénients de ces modèles animaux, il existe des régimes enrichis ou appauvris en certains substrats, qui sont administrés directement à l'animal sain (rats de souche Wistar, Sprague-Dawley ...) ou à la femelle gestante. L'étude de l'obésité et/ou des perturbations métaboliques associées peut se faire *via* l'analyse de dosages sanguins mettant en évidence la modification de la sécrétion d'adipokines par le tissu adipeux et de leurs effets sur ce dernier, ainsi que sur le muscle squelettique, le foie et le pancréas de ces animaux soumis à un régime particulier. Ces différents paramètres vont varier selon le modèle que l'on utilise (souche, âge, sexe, régime). Ces modèles permettent ainsi d'étudier toutes les étapes de la maladie.

1-2. Les différents types de régime induisant l'obésité

Les régimes à base de lard (graisse animale) sont souvent utilisés pour induire l'obésité. En effet, on retrouve grâce à ces régimes les perturbations métaboliques décrites dans l'obésité humaine, comme par exemple, un poids plus élevé, une augmentation des triglycérides hépatiques, une hyperinsulinémie, une diminution du taux d'adiponectine sanguin et une diminution de la sensibilité à l'insuline (Buettner *et coll.*, 2006). La majorité des régimes riches en lipides induisant l'obésité sont des régimes riches en acides gras saturés (lard et coco). En revanche, les acides gras polyinsaturés ont un effet "anti-obésogène", ils améliorent l'action de l'insuline et diminuent l'adiposité. Ils sont directement utilisés pour leur énergie alors que les acides gras saturés sont stockés dans le tissu adipeux et sont ensuite peu mobilisés (Storlien *et coll.*, 2000). Les régimes riches en lipides varient selon l'origine des graisses (lard, coco, huile d'olive ou huile de poisson ou de carthame) et le pourcentage de calories apporté par les graisses (35 à 70%). Ces variations permettent d'observer différents effets sur la sensibilité à l'insuline et sur le développement de l'obésité. Par exemple, en utilisant un régime dans lequel 40% des calories sont apportés par les graisses, on pourra observer une augmentation du poids, une hyperinsulinémie, une hypertriglycéridémie et une augmentation des acides gras libres (Reed *et coll.*, 2000). Une autre étude utilisant un régime lard, dans lequel 61% des calories sont apportées par les graisses, montre une augmentation du poids, du tissu adipeux viscéral, une hyperglycémie, une hypertriglycéridémie et une insulino-résistance (Park *et coll.*, 2001). Les études réalisées avec des régimes à base de lard et d'huile d'olive sont celles montrant les obésités et les insulino-résistances les plus prononcées.

Chapitre IV : Obésité : modèle d'étude

L'huile de poisson a, quant à elle, un effet positif sur le métabolisme glucidique et lipidique. L'utilisation de la graisse de coco est moins délétère pour l'obésité et l'insulinorésistance, mais pas pour la stéatose hépatique (pathologie caractérisée par la présence de graisse, principalement des triglycérides, dans les hépatocytes et d'une inflammation) ou l'hypertriglycéridémie (Buettner *et coll.*, 2006). Chez le rongeur nourri avec un régime riche en lipides, on observe une hyperphagie relative qui diminue après 4 à 5 semaines, jusqu'à revenir à une valeur normale. L'hyperphagie est souvent observée dans le développement de l'obésité, mais elle n'est pas systématique (West and York, 1998). Les régimes riches en glucides tels que le fructose et le saccharose (sucres simples) ont un effet délétère sur l'action de l'insuline (Storlien *et coll.*, 2000), mais n'entraînent pas l'obésité. À titre d'exemple, il a été montré qu'un régime enrichi en saccharose n'entraînait pas de variation de poids des animaux, mais une élévation de la masse et de la taille des adipocytes (Soria *et coll.*, 2002). Par ailleurs, un tel régime induit plusieurs perturbations du métabolisme, telles qu'une hypertriglycéridémie, une augmentation des acides gras libres, une hyperglycémie et une insulino-résistance.

Pour induire l'obésité, on peut aussi utiliser un régime "cafétéria", terme utilisé en 1976 par Sclafani et Springer. Les auteurs ont montré que les rats nourris avec ce régime, composé de différents aliments commercialisés pour l'homme et donné de manière variée et illimitée, prenaient significativement plus de poids que des rats contrôles. Cette obésité, obtenue par hyperphagie, mime l'obésité humaine, principalement due à la grande disponibilité d'aliments palatables (aliments dont le goût est agréable) ainsi qu'à un mode de vie sédentaire. Dans cette étude, il a également été montré une grande variabilité dans la prise de poids au sein du groupe cafétéria par rapport au groupe contrôle. D'autres études ont montré que les rats auxquels on proposait différents aliments palatables augmentaient leur prise alimentaire, contrairement aux rats auxquels on ne donnait qu'un seul aliment (LeMagnen, 1974). Enfin, d'autres études ont montré que de nombreuses anomalies métaboliques apparaissaient dans l'obésité, comme par exemple l'augmentation du tissu adipeux ou l'hyperinsulinémie (Kretschmer *et coll.*, 2005).

En plus de la composition du régime, il faut tenir compte de la souche, du sexe et de l'âge de l'animal chez lequel on veut induire l'obésité. En effet, la prise de poids peut être légèrement différente en fonction de ces paramètres (Schemmel *et coll.*, 1969).

1-3- Résistance à l'obésité

La balance énergétique permet de s'assurer que les quantités de glucides, lipides et protéines ingérées sont égales à celles oxydées (Bessesen *et coll.*, 2008). Cependant, certains individus

Chapitre IV : Obésité : modèle d'étude

arrivent à réguler leur poids malgré des prises alimentaires riches. Dans les modèles animaux développant l'obésité, le problème est de savoir quel rat sera résistant à la prise de poids et lequel ne le sera pas. Pour éviter ce problème, on peut créer des rats enclins à l'obésité induite par un régime riche en graisses. Pour cela, les rats qui prennent le plus de poids sont croisés ensemble (idem pour ceux qui prennent le moins de poids). Après plusieurs générations, on obtient deux groupes de rats, l'un résistant et l'autre sensible à la prise de poids avec un régime riche en lipides. Ce modèle permet d'étudier les réponses adaptatives précoces qui apparaissent après l'introduction de ce type de régime. Les rats présentant le phénotype résistant sont capables d'adapter leur comportement en présence d'un régime riche en lipides (meilleure distribution des lipides alimentaires aux tissus métaboliquement actifs tels que le foie et le muscle) et ainsi de maintenir leur poids constant (Bessesen *et coll.*, 2008).

2- Obésité nutritionnelle : Exemple de *Psammomys obesus*

2-1- Introduction

Ainsi, plusieurs modèles de rongeurs ont été utilisés pour étudier la pathogenèse de l'obésité, mais ils ne reflètent pas ou ne pourra représenter de près les processus impliqués dans la pathogenèse de l'obésité humaine. Pour ces raisons, le développement et la caractérisation de modèles animaux polygéniques d'obésité et de diabète, qui sont susceptibles de plus refléter étroitement les processus pathologiques dans les maladies humaines, sont d'une valeur considérable dans ce domaine de recherche. Les primates ont été considérés comme un très bon modèle de l'obésité humaine et du diabète. Cependant l'inconvénient avec ces animaux est la difficulté liée à la manipulation, au logement et, à la longue durée de vie, ce qui complique les études. *Psammomys obesus*, une gerbille du désert, est un modèle animal polygénique unique pour l'obésité et le diabète de type 2 dont les caractéristiques phénotypiques ressemblent à ceux qu'on a observés dans les études de la population humaine (Kaiser *et coll.*, 2012). C'est pourquoi nous avons étudié la signalisation calcique chez ces animaux en comparant avec ceux rendus obèses avec un régime riche en graisse.

2-2- *Psammomys obesus*

Psammomys obesus (rat de sable) est un modèle de rongeur unique de l'obésité, de l'insulino-résistance et du diabète de type 2. Son habitat naturel sont les régions désertiques du Moyen-Orient, où il est maintenu à un régime de sel brousse et reste maigre avec une glycémie normale (Shafirir *et coll.*, 1993). Toutefois, lorsqu'il est logé dans des conditions de laboratoire et

Chapitre IV : Obésité : modèle d'étude

nourri *d'ad libitum*, un régime sur lequel de nombreuses autres espèces de rongeurs restent en bonne santé, une gamme de réponses métaboliques ont été observées. En 16 semaines d'âge d'environ un tiers des animaux ont une tolérance normale au glucose, un tiers sont hyperinsulinémiques et normoglycémiques, et un tiers sont diabétiques (Kalderon *et coll.*, 1996 ; Barnett *et coll.*, 1994). Le développement du diabète est très rapide chez ces rongeurs. Les *Psammomys Obesus* ont une insulino-résistance hépatique avant même le développement de l'hyperglycémie et l'hyperinsulinémie (Ziv *et coll.*, 1996) qui se traduirait par une défaillance de signalisation du récepteur d'insuline (Kanety *et coll.*, 1994). Une diminution de la capacité de stockage de l'insuline dans le pancréas et de l'apoptose des cellules bêta a également été mise en évidence chez ces animaux (Kaiser *et coll.*, 2012). La relation de la glycémie et les concentrations plasmatiques d'insuline chez le *Psammomys obesus* sont identiques à ceux observés chez l'homme (Zimmet *et coll.*, 1979). Cette réponse hétérogène indique que *Psammomys obesus* représente probablement un modèle animal polygénique du diabète humain. *Psammomys obesus* présentent aussi une large gamme de poids corporel, et peut représenter un modèle animal de l'obésité polygénique ressemblant à la maladie des populations humaines.

2- 3- Caractéristiques et répartition géographique

Le rat des sables est une grosse espèce de gerbille désertique diurne « rat des sables », ayant une longueur tête-corps de 13-19 cm et une queue de 11-15 cm. Il a de petites oreilles arrondies. Sa queue est entièrement poilue et se termine par une touffe noire. Contrairement au mérion, les incisives du rat des sables ne poussent pas. Le dessus du corps est brun-rougeâtre, rougeâtre, jaunâtre ou chamois. Le dessous est jaunâtre ou blanchâtre. Le *Psammomys obesus* est une gerbille de la famille des Muridés, sous-famille des Gerbillidés ou Gerbillines, super-ordre des Glires, sous-ordre des Myomorphes.



Psammomys obesus

D'après Cretzschmar (1828) et Thomas (1908), le *Psammomys* dérive d'un genre monotypique représenté approximativement par 7 sous-espèces distribuées entre le Moyen orient

Chapitre IV : Obésité : modèle d'étude

(Arabie et Palestine), l'Egypte, l'Algérie, le Maroc, la Tunisie, le Soudan et la Libye. Seules 3 sous-espèces sont identifiées dans le Nord de l'Egypte vivant dans des vallées désertiques argilo-sablonneuses riches en plantes salées (famille des Chénopodiacées). Cependant, plusieurs spécialistes taxonomistes considèrent que l'espèce « mère » provient du Nord de l'Afrique (Hoogstraal, 1963). La longévité du *Psammomys* est estimée, au cours d'une étude d'élevage, entre 36 et 38 mois. Cependant, il semble que son espérance de vie est plus courte à l'état sauvage (Prange *et coll.*, 1968). Le cycle œstrien du *Psammomys* dure 4 à 5 jours. La durée de la gestation est de 24 jours, le rapport des naissances est de 3,6 et la mise-bas donne en moyenne de 1 à 6 petits par portée. Le sexe ratio est de 54% dominé par le sexe femelle (Frenkel *et coll.*, 1972).

2-4- Le régime naturel du *Psammomys*

Le *Psammomys* est phytophage, il ne se nourrit qu'exclusivement de tiges et de feuilles des plantes salées de la famille des Chenopodiacées qui poussent au-dessus de son terrier donnant l'aspect d'importantes touffes en dôme de feuillage. Le *Psammomys* peut consommer quatre espèces de plantes halophiles retrouvées dans son biotope (Daly et Daly, 1973), ce sont : *Traganum nudatum*, *Salsola foetida*, *Suaeda mollis* et *Atriplex halimus*. Au sein des populations locales sahariennes, ces Chénopodiacées portent des noms vernaculaires. Elles sont nommées respectivement : ghassel, damran, souida, 28 Elgtaff. Ces quatre espèces de plantes peuvent pousser séparément sur des biotopes différents comme elles peuvent coexister sur le même biotope. Le *Psammomys* montre une prédilection de consommation, si les quatre espèces lui sont offertes (Daly et Daly, 1973), pour la plante qu'il peut exploiter avec le plus d'efficacité (vitesse de coupe des branches, vitesse d'ingestion et même la palatabilité). En général, le *Psammomys* cueille la plante des terriers avoisinants et rarement à partir de celle qui pousse au-dessus de son terrier. D'après les données recueillies, il apparaît que *Suaeda mollis* est plus favorite que *Traganum nudatum* et que celle-ci est préférée à *Salsola foetida*. (Daly et Daly, 1973). La quatrième espèce, *Atriplex halimus* pousse très peu dans les différents biotopes de nos régions sahariennes et elle est très peu exploitée par le *Psammomys*. Par contre, dans les régions de la mer morte en Israël, c'est *Atriplex halimus* qui pousse le plus et elle est décrite comme étant la plus favorite et la plus consommée par le *Psammomys* (Degen, 1993). Le sevrage à la plante salée peut commencer dès le 11ème jour de la naissance à condition que l'éruption dentaire soit complètement terminée ; cependant, le vrai sevrage n'est entièrement achevé qu'au premier mois d'âge. L'animal adulte consomme 31% de son poids corporel et perd 11%. Dans les périodes de disette, le *Psammomys* peut consommer d'autres types de Chénopodiacées poussant dans son environnement, tel est le cas de *Fruticosa salicornia* et *Zygophyllum album* (Daly et Daly, 1973). Sur le plan nutritionnel, il apparaît que c'est *Suaeda mollis* qui est relativement la plus énergétique et la plus hydratée. Daly et Daly, (1973) ont montré

par des calculs gravimétriques, que les trois espèces collectées dans la région de Ouaraourout, Beni-Abbès (Algérie) montrent des compositions centésimales en nutriment différentes d'une espèce à l'autre.

4-5- Aspects écologiques

Les *Psammomys* vivent en communauté, creusent des terriers le long des vallées desséchées et fortement fournies en Chénopodiacées (en aspect d'arbrisseaux). Les terriers communiquent entre eux par des galeries à plusieurs étages. Leur surface peut atteindre 6 m de périmètre et une profondeur de 1,20 m. Nous avons observé qu'un seul animal peut exploiter plusieurs terriers à la fois. Au cours de ses déplacements peu fréquents, le *Psammomys* dépense très peu d'énergie dans la journée et peut vivre sous le même pied de plantes durant toute sa vie (Petter, 1961). Des études portant sur le comportement du *Psammomys* dans son milieu naturel (Daly et Daly, 1973) ont révélé que la compartimentation du terrier est en rapport avec les rudes conditions désertiques dans lesquelles vit l'animal. En effet, un des rôles principaux que joue ce cloisonnement du terrier est lié à la nature du climat. Le *Psammomys* étage, instinctivement, le terrier à plusieurs niveaux et avec plusieurs sorties à l'extérieur. Cette manière de façonner le terrier possède certains avantages bien précis : il lui permet de fuir ses prédateurs forts nombreux (vipère à cornes, différents rapaces et certains carnivores comme le chacal et le fennec), de créer un microclimat d'aération. La compartimentation du terrier lui permet de choisir l'étage où règne une température proche à sa neutralité thermique en fonction de la chaleur externe. *Cependant, les relations entre l'obésité nutritionnelle et la détection oro-sensorielle des lipides alimentaires, chez Psammomys obesus, ne sont pas encore connues et méritent une profonde investigation. En gardant en vue les arguments mentionnés ci-dessus, il a été jugé utile d'évaluer l'impact de l'obésité sur la perception du goût lipidique et de la signalisation calcique dans les cellules des bourgeons du goût CD36-positives (TBC) isolées à partir de papilles caliciformes de Psammomys obesus calcium.*

DEUXIÈME PARTIE

APPORTS PERSONNELS

Chapitre I

Procédure expérimentale

1- Matériels biologiques

Durant les trois années de ce travail, les expériences ont été faites sur deux types d'animaux : d'une part, les souris C57BL/6J âgées de 6 à 10 semaines, dont l'élevage, la commercialisation et le transport étaient assurés par l'entreprise Janvier Elevage (Le Genest-st-Isle, France). Après la livraison, les animaux étaient acclimatés pendant un minimum de trois jours. Les souris invalidées pour le gène ERK1 (ERK1^{-/-}) de phénotype normal font partie d'une collaboration avec le Professeur Jacques POUYSSEGEUR (Nice). Les rongeurs (*Psammomys obesus*) font partie d'une collaboration bilatérale Franco-Algérienne (Projet Tassili) avec l'équipe du Professeur Ahmed KOCEÏR (USTHB, Alger).

2- Matériels Chimiques

Les enzymes élastase et dispase ont été achetées chez Serlabo et Roche Diagnostics, respectivement. Les anticorps anti-PLA₂ et les anticorps anti-CD36, anticorps couplés à l'anticorps anti-phycoérythrine et l' α -gustducine ont été obtenus chez Santa Cruz Biotechnology Inc. Les anticorps primaires et secondaires utilisés ont été achetés chez « Cell Signaling Technology ». Les anticorps P-Vav 1, P-Vav 2 ont été achetés chez Santa cruz, USA. La L-glutamine et les milieux RPMI 1640 ont été fournis par Biowhitaker, Belgique. La FURA-2/AM par Probes (Eugène, OR, USA). La collagénase de type I, l'inhibiteur de trypsine ont été fournis par Sigma Chemicals (St Louis, USA). Le Sulfo-N-succinimidyl-oléate (SSO) a été un généreux don de JF Glatz. Les milieux de culture RPMI 1640 et L-glutamine ont été achetés chez Verviers Lonza. Fura-2/AM a été obtenu chez Invitrogen. Les anticorps anti-Orai1 et anti-Orai3 ont été obtenus chez Interchim. Les inhibiteurs Arachidonyle cétone trifluorométhyle (ATK), bromoenol lactone (BEL) et le kit de mesure d'activité enzymatique de PLA₂ ont été achetés chez Cayman Chemical. Le Méthyle arachidonyle fluorophosphonate a été obtenu chez Calbiochem. L'AA-³H (activité spécifique, 217Ci/mmol) et le sulfate de créatinine de 5-hydroxytryptamine (sérotonine), 5 - [1,2-³H (N)] - (activité spécifique, 25Ci / mmol) ont été achetés chez Amersham. Les anticorps anti-PLA₂ ont été obtenus chez United States Biological (MA, USA). Les colonnes Sep-Pak Vac C18 ont été obtenues

chez Millipore. Tous les autres produits chimiques, y compris l'AA (20:4 n-6), l'acide linoléique (18:2 n-6), la collagénase de type I, l'inhibiteur de la trypsine, l'acide aristolochique, le 4-bromo bromure de phénacyle et l'anticorps anti-STIM1 ont été obtenus chez Sigma-Aldrich. Les produits nécessaires pour la PCR ont été fournis par Bio-RAD. Le kit de CD36 SiRNA, ERK1/2 SiRNA et, le système de transfection (Dharmafect) ont été achetés chez Dharmacon (USA).

L'utilisation et la manipulation des animaux de laboratoire ont été effectuées avec l'approbation du comité d'éthique régionale et selon le guide de santé pour le soin et l'usage des animaux de laboratoire.

3- Isolement des papilles caliciformes et purification des cellules CD36 positives

La technique de prélèvement de la papille caliciforme de souris a été mise au point par Laugerette *et coll.* (2005). Nous l'avons adaptée puis améliorée à partir des travaux de Ruiz *et coll.* (2001) et Miyamoto *et coll.* (1996). Les souris ont été sacrifiées par dislocation cérébrale puis la langue a été dégagée en coupant la mâchoire ainsi que les ligaments et le frein qui la retiennent. La langue est placée ensuite dans une boîte de Pétri contenant une solution de tyrode contenant 120 mM de NaCl, 5 mM de KCl, 10 mM d'HEPES, 1 mM de CaCl₂, 10 mM de glucose, 1 mM de MgCl₂, 10 mM de pyruvate de sodium, à un pH de 7.4. La langue est ensuite coupée transversalement en deux parties de manière à séparer les papilles fongiformes des papilles caliciformes et foliées pour faciliter les injections. Les deux morceaux sont gardés quelques mn dans la solution de tyrode froide (4°C) afin de durcir légèrement les tissus. Puis, une solution enzymatique, constituée d'élastase, (2 mg/ml) et de dispase (2mg/ml) en solution dans du tampon tyrode, est injectée directement sous l'épithélium lingual pour l'isoler. Il contient les bourgeons du goût de la musculature sous-jacente. Les morceaux injectés sont incubés 10 mn à température ambiante dans une solution de tyrode sans calcium dans laquelle le CaCl₂ et le MgCl₂ ont été substitués par l'EGTA qui permettait l'activation des enzymes. Sous une loupe binoculaire, la papille caliciforme ainsi que l'épithélium non gustatif adjacent sont isolés et mis séparément dans des eppendorfs contenant le milieu de culture RPMI 1640 et maintenus à 4°C.

Après la collecte des papilles caliciformes et les papilles témoins d'un nombre suffisant de langues, les tissus sont incubés séparément dans le milieu RPMI 1640 contenant 2 mM d'EDTA (Ethylène diamine tétraacétique), 1,2 mg/ml d'élastase, 0,6 mg/ml de collagénase type I et 0,6 mg/ml d'inhibiteur de la trypsine à 37°C pendant 20 mn. Les cellules dissociées sont ensuite centrifugées à 600g pendant 10 mn. Le culot de cellules est repris dans le milieu de culture RPMI

Capitre I : Procédure expérimentale

1640 afin de prélever les cellules en suspension. Ces cellules sont lavées et débarrassées de toute trace d'enzyme. Cette opération est répétée 3 fois sur les tissus non digérés par la mixture enzymatique.

Pour la sélection, les différentes populations de cellules, collectées de toutes les papilles caliciformes, sont incubées avec l'anticorps anti-CD36 couplé avec la phycoérythrine (Santa Cruz Biotechnology Inc, USA) pendant 2H. La préparation cellulaire est lavée avec du PBS (600 g, 10 mn) et suspendue à nouveau dans une solution contenant des microbilles-couplées avec un anticorps IgG anti-phycoérythrine. Les cellules CD36 positives sont isolées en passant la suspension contenant les complexes cellules-anticorps anti-CD36-Phycoérythrine – anti-Phycoérythrine – microbilles (Figure34) dans une colonne (MACS) de Miltenyi dotée d'un système magnétique. Les cellules CD36 positives collectées ont été reprises dans un milieu RPMI 1640 frais contenant 10% de sérum de veau fœtal (SVF), 200 U/ml de pénicilline et 0,2 mg/ml de streptomycine. Le mélange est semé dans une boîte de Pétri traitée par Poly-D-Lysine (Biocoat Cellware 35 mm Dish, BD BioCoat™, Elvetec) et cultivé pendant 24 heures. Avant toute utilisation des cellules purifiées, un volume de cellules est traité avec du Bleu de Trypan pour tester la viabilité cellulaire et effectuer une numération cellulaire. Pour s'assurer de la pureté et de l'identité des cellules retenues dans la colonne, nous avons procédé à la vérification de l'expression du gène CD36 et de la gustducine par l'utilisation de la technique RT-PCR et la technique d'Immunocytochimie.

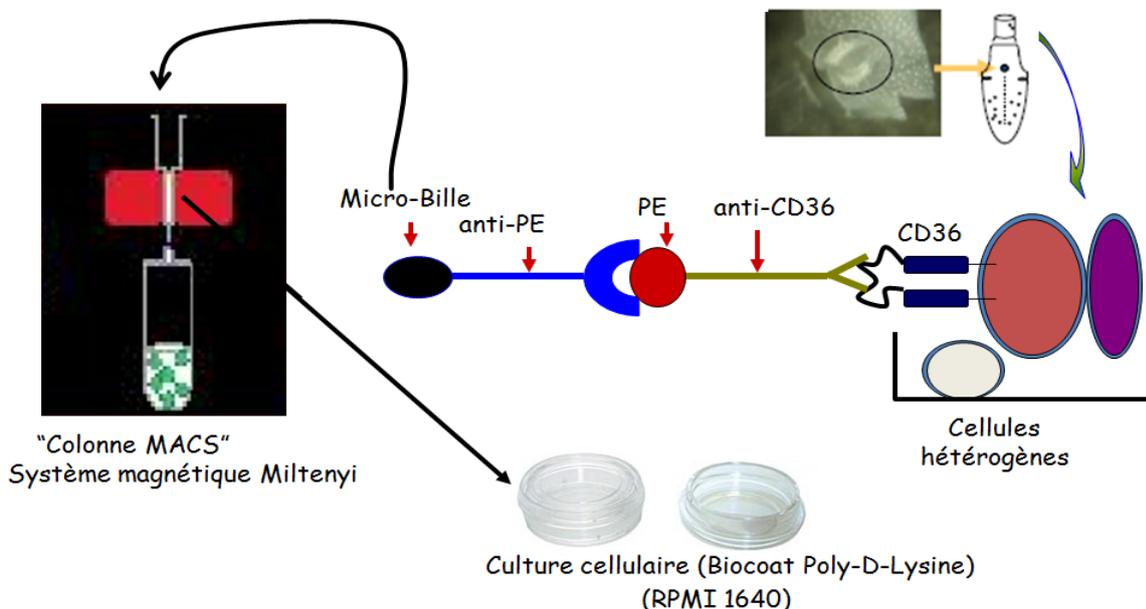


Figure 20: Les différentes étapes de purification des cellules CD36-positives : Les cellules CD36 positives sont isolées en passant la suspension contenant les complexes cellules-anticorps anti-CD36-Phycoérythrine-anti-Phycoérythrine –microbilles dans une colonne (MACS) de Miltenyi dotée d'un système magnétique. Les cellules CD36 positives collectées ont été reprises dans un milieu RPMI 1640 frais contenant 10% de sérum de veau fœtal (SVF), 200

Capitre I : Procédure expérimentale

U/ml de pénicilline et 0.2 mg/ml de streptomycine. Le mélange est semé dans une boîte de Pétri traitée par Poly-D-Lysine (Biocoat Cellware 35 mm Dish, BD BioCoat™, Elvetec) et cultivée pendant 24H.

Toutes nos expériences ont été faites sur les cellules CD36 positives isolées à partir des papilles caliciformes de souris C57BL/6J et de *Psammomys obesus*.

Chapitre II

Liste des Publications et Communications

❖ Publications

1. *Dramane G., Abdoul-Azize S., Hichami A., Vögtle T., Akpona S., Sadou H., Nieswandt B., Besnard P., and Khan NA.* (2012). STIM1 regulates calcium signaling in taste bud cells and preference for fat in mice. *J Clin Invest.* 122(6):2267-82.
2. *Abdoul-Azize S., Dramane G., Subramaniam S., Simonin AM, Besnard P, and Khan NA.* (2012). STIM1, lingual CD36 and lipid taste perception. *Med Sci* (Paris) 28:1053-55.
3. *Abdoul-Azize S., Atek-Mebarki F., Sadou H., Koceir EA, and Khan NA.* (2013). Oro-gustatory perception of dietary lipids and calcium signaling in taste bud cells are altered in nutritionally obesity-prone *Psammomys obesus*. *PLoS ONE.* (Sous presse).
4. *Chevrot M., Bernard A., Ancel D., Buttet M., Martin C., Abdoul-Azize S., Merlin J-F., Poirier H., Niot I., Khan N., Passilly-Degrace P., Besnard P.* (2013). Obesity alters the gustatory perception of lipids in the mouse: plausible involvement of the lingual CD36. *J Lipid Res.* [Epub ahead of print]
5. *Abdoul-Azize S., Subramaniam S., Besnard P. and Khan NA.* (2013). Ca²⁺ signaling in taste bud cells and spontaneous preference for fat: unresolved roles of CD36 and GPR120. *Biochimie.* doi: 10.1016/j.biochi.2013.06.005. [Epub ahead of print].
6. *Travaux non publiés:* MAP Kinase signaling is involved in oro-gustatory lipid taste perception in mice. (En preparation).

❖ Communications

1. *A. Bernard, M. Chevrot, D. Ancel, M. Buttet, S. Abdoul-Azize, C. Martin, J-F. Merlin, H. Poirier, I. Niot, N.A. Khan, P. Passilly-Degrace, P. Besnard.* (2013). Diet-induced obesity (DIO) decreases the preference for lipids in the mouse. 21st Annual meeting of the Society for the Study of Ingestive Behavior (SSIB), July 30 - August 3, New Orleans, LA, USA.
2. *Abdoul-Azize S., Dramane G., Subramaniam S., Simonin A-M., Besnard P., Sadou H. and Khan N.A.* (2013). Role of MAPK in cell signaling and lipid taste perception in mice. Communication orale au 19th Forum of Young Researchers-BIOTechno, June 13-14, Dijon, France.
3. *S. Abdoul-Azize, G. Dramane, S. Selvakumar, P. Besnard and N.A. Khan.* (2013). MAP Kinase signaling is involved in oro-gustatory perception of dietary lipids in the mouse. 13th Scientific day of multidisciplinary institute lipid biochemistry, 7 June, Dijon, France.
4. *S. Abdoul-Azize, G. Dramane, T. Vögtle, C. Chouabe, S. Selvakumar, B. Nieswandt, P. Besnard and N.A. Khan.* (2013). STIM1 is indispensable for Ca²⁺ signaling and fat preference in mice.

Chapitre II : Liste des Publications et Communications

- 33rd Blankenese conference nutrient sensing : from brain to gut, 25-29 May, Hamburg-blankenese, **Germany**.
5. **Abdoul-Azize S.**, Dramane G., Subramaniam S., Simonin AM., Sadou H., Besnard P. and Khan NA. (2013). Cell signaling and lipid taste perception in mice: role of MAP Kinases. Communication orale au VIII^{ème} Congrès de Physiologie, de Pharmacologie et de Thérapeutique (P2T) du 22 - 24 Avril à Angers, **France**. '**Prix de la meilleure communication**'.
 6. **Abdoul-Azize S.**, Dramane G., Subramaniam S., Sadou H., Besnard P. and Khan NA. (2013). STIM1 is indispensable for Ca²⁺ signaling and fat preference in mice. Communication orale au VIII^{ème} Congrès de Physiologie, de Pharmacologie et de Thérapeutique (P2T) du 22 - 24 Avril à Angers, **France**.
 7. **Abdoul-Azize S.**, Dramane G., Sadou H. Akpona S., Besnard P. and Khan NA. (2012). Rôle des MAP Kinases dans la signalisation cellulaire et la perception gustative lipidique chez la souris. Communication orale au XVIII^{ème} Forum des Jeunes Chercheurs-BIOTechno les 6 et 7 septembre 2012, Besançon, **France**.
 8. Dramane G., **Abdoul-Azize S.**, Hichami A., Vögtle T. Sadou H., Nieswandt B., Besnard P. and Khan NA. (2012). Stim1 is essential for the regulation of Orai1/3 calcium channels and fat preference in mice. Communication orale au VIII^{ème} Congrès de Physiologie, de Pharmacologie et de Thérapeutique (P2T) à Dijon, **France** du 4 - 6 Avril 2012.
 9. **Abdoul-Azize S.**, Dramane G., Vögtle T., Sadou H., Nieswandt B., Besnard P. and Khan NA. (2012). Calcium influx factor (CIF) plays a crucial role in linoleic acid induced calcium signaling in mouse CD36+ lipid gustatory cells. Communication orale au VIII^{ème} Congrès de Physiologie, de Pharmacologie et de Thérapeutique (P2T) à Dijon, **France** du 4 - 6 Avril 2012.
 10. **S. Abdoul-Azize**, A. Hichami, S. Subramaniam, H. Sadou, NA. Khan. (2012). Role of Src kinases in docosahexaenoic acid induced calcium influx via TRPC 3, 6 channels in human T-cells. Communication affichée présentée oralement au VIII^{ème} Congrès de Physiologie, de Pharmacologie et de Thérapeutique (P2T) à Dijon, **France** du 4 - 6 Avril 2012.
 11. **S. Abdoul-Azize**, G. Dramane, T. Vögtle, C. Chouabe, S. Selvakumar, B. Nieswandt, P. Besnard and N.A. Khan. (2012). STIM1 is indispensable for Ca²⁺ signaling and fat preference in mice. Communication affichée présentée oralement à INSERM LNC research center « Annual Scientific Meeting » March 16th 2012, Dijon, **France**.
 12. **Abdoul-Azize S.**, Dramane G., Vögtle T., Sadou H., Akpona S., Nieswandt B., Besnard P. and Khan NA. (2012). Role of CIF, STIM1 and Orai1 in calcium signaling in mouse CD36 taste bud cells. 21th European LBP « Lipid Binding Proteins » workshop, 26-27 January 2012, Dijon, **France**.
 13. **Abdoul-Azize S.**, Dramane G., Vögtle T., Sadou H., Akpona S., Nieswandt B., Besnard P. and Khan NA. (2011). Role of CIF, STIM1 and Orai1 in calcium signaling in mouse CD36+ lipid gustatory cells. Communication affichée au XVII^{ème} Forum des Jeunes Chercheurs-BIOTechno les 16 et 17 juin 2011 Dijon, **France**.
 14. **S. Abdoul-Azize**, A. Hichami, H. Sadou and N. A. Khan. (2011). "Role of Src kinases and protein kinase C in docosahexaenoic acid-induced calcium cell signaling in human T-cells". Communication affichée au Congrès de Physiologie, Pharmacologie et Thérapeutique (P2T) du 22 - 24 Mars 2011 à Grenoble, **France**. Réf. *Fundamental & Clinical Pharmacology* 2011; 25(suppl. s1): 1-111. N°172.

PUBLICATION N°1

STIM1 regulates calcium signaling in taste bud cells and preference for fat in mice

Dramane G., Abdoul-Azize S., Hichami A., Vögtle T., Akpona S., Sadou H.,

Nieswandt B., Besnard P., and Khan NA.

J Clin Invest (2012) 122(6):2267-82.

Objectif de l'étude

La compréhension des mécanismes qui sous-tendent la détection oro-gustative des lipides alimentaires est cruciale pour la prévention et le traitement de l'obésité. Nous avons précédemment montré que les acides gras alimentaires déclencheraient, *via* CD36 lingual, une signalisation cellulaire en l'occurrence une augmentation rapide du $[Ca^{2+}]_i$ responsable de la perception du goût lipidique. L'objectif de cette étude est de comprendre comment s'effectue cette augmentation calcique, quelles sont les différentes molécules (canaux calciques et autres) impliquées dans cette cascade et quel rôle jouent-ils dans la préférence lipidique ?

Chapitre II : Liste des Publications et Communications

Article

Chapitre II : Liste des Publications et Communications

Chapitre II : Liste des Publications et Communications

Chapitre II : Liste des Publications et Communications

Chapitre II : Liste des Publications et Communications

Chapitre II : Liste des Publications et Communications

PUBLICATION N°2

STIM1 is indispensable for the lingual CD36-mediated Ca²⁺ signaling and spontaneous preference for fat

Abdoul-Azize S., Dramane G., Subramaniam S., Simonin AM, Besnard P, and Khan NA.
Med Sci (Paris) 28:1053-55.

Objectif de l'étude

Notre première publication a contribué, d'une façon non négligeable, à la compréhension des mécanismes de signalisation qui pourraient être impliqués dans la détection oro-gustative des lipides alimentaires *via* la glycoprotéine CD36. Ainsi pour faire connaître nos résultats au grand public, y compris les francophones, nous avons été sollicités par le magazine '*Médecine Science*', indexée par *MEDLINE*, dans la rubrique *Nouvelle* pour relever l'importance des protéines STIM1 et CD36 linguale dans la perception gustative lipidique.

Chapitre II : Liste des Publications et Communications

Article

Chapitre II : Liste des Publications et Communications

Chapitre II : Liste des Publications et Communications

PUBLICATION N°3

Oro-gustatory perception of dietary lipids and calcium signaling in taste bud cells are altered in nutritionally obesity-prone *Psammomys obesus*

Abdoul-Azize S., Atek-Mebarki F., Arezki B., Sadou H., Koceir EA, and Khan NA.

PLoS ONE* (2013), *Sous presse

Objectif de l'étude

La prévalence croissante de l'obésité est l'un des principaux problèmes de santé publique de notre ère moderne, par conséquent la compréhension des mécanismes de détection oro-gustative des graisses alimentaires est cruciale pour la prévention et le traitement de cette maladie. Plusieurs modèles de rongeurs ont été utilisés pour étudier la pathogenèse de l'obésité, mais ils ne reflètent pas la maladie humaine suffisamment. C'est pourquoi, nous nous sommes procurés *Psammomys obesus*, une gerbille du désert, qui est un modèle animal polygénique unique pour l'obésité et le diabète de type 2. Dans cette étude il nous est permis d'évaluer l'impact de l'obésité sur la perception du goût lipidique mais aussi la signalisation calcique dans les cellules caliciformes du *Psammomys obesus*.

Article

----- Message original -----

Sujet: PLOS ONE Decision: Accept [PONE-D-13-07272R1]

Date : 31 May 2013 02:43:52 -0400

De : PLOS ONE <plosone@plos.org>

Pour : Naim Akhtar Khan <naim.khan@u-bourgogne.fr>

PONE-D-13-07272R1

Oro-gustatory perception of dietary lipids and calcium signaling in taste bud cells are altered in nutritionally obesity-prone *Psammomys obesus*

PLOS ONE

Dear Dr. Khan

I am pleased to inform you that your manuscript has been deemed suitable for publication in PLOS ONE.

Your manuscript will now be passed on to our Production staff, who will check your files for correct formatting and completeness. After this review, they may return your manuscript to you so that you can make necessary alterations and upload a final version.

Before uploading, you should check the PDF of your manuscript very closely. THERE IS NO AUTHOR PROOFING. You should therefore consider the corrected files you upload now as equivalent to a production proof. The text you supply at this point will be faithfully represented in your published manuscript exactly as you supply it. This is your last opportunity to correct any errors that are present in your manuscript files.

In addition, now that your manuscript has been accepted, please log into EM at <http://www.editorialmanager.com/pone> and update your profile. Click on the "Update My Information" link at the top of the page. Please update your user information to ensure an efficient production and billing process.

If you or your institution will be preparing press materials for this manuscript, you must inform our press team in advance. Please contact them at ONEpress@plos.org.

Please contact us at plosone@plos.org if you have any questions, concerns, or problems, and thank you for submitting your work to our journal.

With kind regards,
Asad U Khan, Ph.D
Academic Editor
PLOS ONE

Title:

Oro-gustatory perception of dietary lipids and calcium signaling in taste bud cells are altered in nutritionally obesity-prone *Psammomys obesus*

Authors:

Souleymane Abdoul-Azize *¹, Ferial Atek-Mebarki *², Arezki Bitam ², Hassimi Sadou³,
Elhadj Ahmed Kocceir², Naim Akhtar Khan ¹

Affiliations:

¹Physiologie de la Nutrition & Toxicologie, UMR U866 INSERM/Université de Bourgogne/Agro-Sup, Dijon 21000, France.

²Bioenergetics and Intermediary Metabolism Laboratory, FSB, University of Sciences and Technology Houari Boumédiène (USTHB), Algiers, Algeria.

³Laboratoire de Nutrition, Université Abdou Moumouni, Niamey, Niger.

*Equal contributions

Conflict of interest: The authors have declared no conflict of interest.

Running title: Oro-gustatory perception of lipids in *Psammomys obesus*

Correspondances: Prof. Naim A. Khan, Physiologie de la Nutrition & Toxicologie, UMR U866 INSERM/Université de Bourgogne/AgroSup, 6 Boulevard Gabriel, F-21000 Dijon, France. Tel. +33 3 80 39 63 12; Fax. +33 3 80 39 63 30; E-mail: Naim.Khan@u-bourgogne.fr

ABSTRACT

Since the increasing prevalence of obesity is one of the major health problems of modern era, understanding the mechanisms of oro-gustatory detection of dietary fat is critical for the prevention and treatment of obesity. We have conducted the present study on *Psammomys obesus*, the rodent desert gerbil which is a unique polygenic natural animal model of obesity. Our results show that obese animals exhibit a strong preference for lipid solutions in a two-bottle test. Interestingly, the expression of CD36, a lipido-receptor, in taste buds cells (TBC), isolated from circumvallate papillae, was decreased at mRNA level, but remained unaltered at protein level, in obese animals. We further studied the effects of linoleic acid (LA), a long-chain fatty acid, on the increases in free intracellular calcium (Ca^{2+}) concentrations, $[\text{Ca}^{2+}]_i$, in the TBC of *P. obesus*. LA induced increases in $[\text{Ca}^{2+}]_i$, largely *via* CD36, from intracellular pool, followed by the opening of store-operated Ca^{2+} (SOC) channels in the TBC of these animals. The action of this fatty acid on the increases in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ was higher in obese animals than that in controls. However, the release of Ca^{2+} from intracellular stores, studied also by employing thapsigargin, was lower in TBC of obese animals than control rodents. In this study, we show, for the first time, that increased lipid intake and altered Ca^{2+} signaling in TBC are associated with obesity in *Psammomys obesus*.

Keywords: Obesity, Fat preference, Taste bud cells, CD36, Calcium signaling, *Psammomys obesus*.

ABBREVIATIONS:

2-Aminoethoxydiphenyl borate, APB; Body mass index, BMI; intracellular free calcium concentrations, $[\text{Ca}^{2+}]_i$; Cluster of Differentiation 36, CD36; Circumvallate Papillae, CVP; Ionomycin, Iono; Linoleic Acid, LA; long chain fatty acids, LCFA; *Psammomys obesus*, *P. obesus*; Polyunsaturated fatty acid, PUFA; Sarcoplasmic-endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase, SERCA; Store-operated calcium, SOC; Sulfo-*N*-succinimidyl-oleate, SSO; Taste bud cells, TBC; Thapsigargin, TG.

INTRODUCTION

According to the World Health Organization (WHO) [1], obesity has reached epidemic proportions in the world, with over 1.6 billion adults being overweight and, at least, 500 million being clinically obese. One out of ten adults worldwide is obese, having important consequences in terms of public health. Obesity, particularly visceral obesity, is a risk factor for several diseases such as type 2 diabetes, cardiovascular complications, hypertension and some types of cancers [2].

It is generally assumed that excessive intake of dietary fat contributes to weight gain and obesity. There are several factors which influence fat consumption, including energy density and palatability [3]. Besides, oral taste sensitivity to fatty acids may influence food ingestion and, consequently, regulate body weight. Lanfer *et coll.* [4] have conducted a study on 1696 children aged 6-9 years in different countries of the European Union and concluded that fat preference is related to body weight status. Stewart *et coll.* [5] have classified obese subjects as hypo- or hyper-sensitive to oleic acid taste detection and concluded that hyposensitive subjects consumed significantly more energy (fat, saturated fat, fatty foods) and had greater body mass index (BMI). The hyposensitive subjects were less perceptive of small changes in the fat contents compared to hypersensitive subjects. In another study, Stewart and Keast [6] reported that in lean subjects, the consumption of the high-fat diet significantly decreased taste sensitivity to oleic acid.

The lipid-binding glycoprotein CD36, expressed on circumvallate papillae (CVP) of mouse and rat tongue, has been implicated in oro-gustatory perception of dietary lipids [7], [8], [9]. Recent data from our team show that fatty acid-induced Ca^{2+} signaling in CD36-positive taste bud cells, regulated by stromal interaction molecule 1 (STIM1) *via* CD36, is implicated in spontaneous preference for fat [9]. The importance of CD36 can be further supported with the study of Pepino *et coll.* [10] who have shown that a single nucleotide polymorphism (SNP) of CD36, leading to its inactivation, resulted in a decreased oral lipid taste perception in obese subjects. However, the intracellular mechanisms involved in decreased lipid taste sensitivity in taste bud cells (TBC) remain to be explored.

Several rodent models have been used to investigate the pathogenesis of obesity but they do not reflect the human disease sufficiently. *Psammomys obesus*, a desert gerbil, is a unique polygenic animal model for obesity and type 2 diabetes [11]. These rodents remain lean and free from diabetes in their native desert habitat, subsisting on a hypocaloric diet composed mainly of halophilic plants [12]. When transferred to the laboratory and allowed free access to standard rodent chow, metabolic disturbances such as obesity, hyperglycemia and dyslipidemia occur in *P. obesus* relative to their lean littermates [13], [14], [15]. Diabetes development is very fast in these rodents. The animals reach the irreversible hypoinsulinemic stage of the disease, in which a marked reduction of β -cell

Chapitre II : Liste des Publications et Communications

mass is apparent, within 4-6 weeks of high caloric diet [11]. Obesity development in *P. obesus*, accompanied by low liver glucose-6-phosphate hydrolysis, contributes to insulin resistant state, with a high lipogenic activity [16]. Besides, we have recently demonstrated that obese *P. obesus* showed a hepatic deterioration which was accompanied by enhanced oxidative stress, further contributing to deleterious outcomes of insulin resistance [12]. Hyperglycemia in these animals is reversible, except for the hypoinsulinemic end stage of the disease; normoglycemia could be obtained by limiting the caloric intake [17]. However, the relationships between natural obesity and oro-sensory detection of dietary lipids in *P. obesus* are not yet known and deserve deep investigation.

Keeping in view the afore-mentioned arguments, it was thought worthwhile to assess the impact of obesity on lipid taste perception and calcium signaling in CD36-positive taste bud cells (TBC) isolated from circumvallate papillae of *P. obesus*.

MATERIALS & METHODS

Chemicals

The culture medium RPMI 1640 and L-glutamine were purchased from Lonza Verviers SPRL (Verviers, Belgium). Fura-2/AM was procured from Invitrogen (Invitrogen, CA, USA). Elastase and dispase were purchased from Serlabo (Bonneuil/Marne, France) and Roche Diagnostics (Paris, France), respectively. Anti-CD36 antibody coupled to phycoerythrin and anti- α -gustducin antibody were procured from Santa Cruz Biotechnology Inc. (USA). Anti-CD36 antibody, used for western blots, was procured from R & D (UK). Sulfo-N-succinimidyl-oleate (SSO) was a generous gift from JF Glatz (Maastricht, The Netherlands). All other chemicals including linoleic acid (18:2 n-6), collagenase type-I, and trypsin inhibitor were obtained from Sigma Chemicals (St. Louis, MO, USA).

Animals and diet

The rodents (*Psammomys obesus*) were trapped in the area of Beni-Abbes (30°7' North latitude and 2°10' West longitude) in Algerian West Sahara and transported to Algiers. When the sand rats were captured, they were subjected to acclimatization in the animal house from 15 to 30 days. The animals were maintained in suitable cages under controlled temperature and light conditions. The animals were identified for the sex. The age of male gerbils, used in our study, was approximatively from 2 to 3 months, based on the body weight. The weighing is the main selection criteria in most of the studies on these animals. The animals were weighed and, at the beginning of the experiments, their body weights were 72 ± 5 g. Each group consisted of 10 animals. The gerbils of control group were maintained on *Salsola foetida* throughout the experimentation. The animals of obese group were progressively given the laboratory diet and, after a period of 4 weeks, they were completely maintained on it until the duration of the experimentation, *i.e.*, 18 weeks.

For control animals, we chose the desert plant *Salsola foetida*, a low caloric diet, as these animals feed this plant in their natural habitat and they do not develop obesity [18]. As compared to the plants of chenopodiaceae family, the laboratory diet is hypercaloric. If we compare 1g of *Salsola foetida* with 1g of laboratory diet, *Salsola* would furnish with 0.4 Kcal/g of fresh plant compared to the laboratory chow which would provide with 3.25 Kcal/g. The laboratory diet contained the following: proteins 25%, lipids 7.5%, carbohydrates 47.4 %, humidity/water 9%, fibers (cellulose) 4%, minerals 7.1%. The *Salsola foetida* contained the following: proteins 3.53%, lipids 0.4%, carbohydrates: 8.42 %, humidity/water 80.79%, fibers (cellulose) 5.97%, minerals 6.86% [19]. Food and water were supplied *ad libitum* except for the taste preference tests (see here-after).

All experimental procedures were approved by the Algerian Institutional Animal Care Committee which belongs National Administration of Algerian Higher Education and Scientific

Chapitre II : Liste des Publications et Communications

Research (Algiers). The study was a part of a bilateral Franco-Algerian collaborative project "Tassili" (grant number:12MDU855). The authorization to capture the animals in desert region was given by the Ministry of Higher Education, Algeria. The animals were sacrificed by cervical dislocation.

Biochemical analysis

Each animal was monitored for body weight, blood glucose and insulin. For biochemical analysis, fasted animals were killed by cervical decapitation at the end of treatments, without anesthesia to avoid any further stress, and blood samples were collected in tubes containing heparin. Plasma glucose and lipids fractions were measured by a spectrophotometric method adapted on a Cobas Mira automatic analyser. Plasma immunoreactive insulin was estimated by the Phadebas insulin test. Rat insulin (Novo) was used as standard.

Hepatic lipids assays

Extraction of hepatic lipids (glycerides, cholesterol, fatty acids) was carried out according to Folch *et coll.* [20], as described elsewhere [21]. Total lipids were measured gravimetrically. Total cholesterol and cholesterol fractions (HDL, LDL) were evaluated by the kit (Boehringer) as per instructions furnished with. Phospholipids were determined colorimetrically [22].

Two-bottle preference test

The experiments on the spontaneous preference for lipid-enriched solutions were performed by means of two-bottle preference test. The animals first accustomed to water drinking in two bottles for a period of 24 hrs. The next day, the animals were subjected, during the diurnal period, to two bottles: one control and one test bottle, both containing 0.3% xanthan gum (Sigma Aldrich) homogenized in water. In the test bottle, 1% of colza oil was added. The xanthan gum was used to emulsify the oil and to minimize textural cues between the two solutions. To avoid the development of side preferences, positions of the bottles were changed during each experiment. After 12 hours, consumption of each solution was analyzed by weighing the bottles and preference for the experimental solution was estimated by calculating the ratio between the consumption of the experimental solution and the total consumption (in grams). We also assessed whether obese gerbils exhibit an altered sweet preference by subjecting them, similarly, to two bottle-test: one with water and another with 4% sucrose (w/v).

Isolation of CD36-positive taste bud cells (TBC) from circumvallate papillae (CVP)

Chapitre II : Liste des Publications et Communications

The CD36-positive cells from lingual CVP of *Psammomys obesus* were isolated according to our previously published procedure [23], [24]. Briefly, lingual epithelium was separated from connective tissues by enzymatic dissociation (elastase and dispase mixture, 2 mg/ml each, in Tyrode buffer: 120 mM NaCl; 5 mM KCl; 10 mM HEPES; 1 mM CaCl₂; 1 mM MgCl₂; 10 mM glucose; 10 mM Na⁺ pyruvate, pH 7.4). CD36-positive cells were isolated by incubating lingual epithelium in RPMI 1640 medium containing 2 mM EDTA, 1.2 mg/ml elastase, 0.6 mg/ml collagenase (type I), and 0.6 mg/ml trypsin inhibitor at 37°C for 10 mn, followed by centrifugation (600 g, 10 mn). The mixture of different cell populations was incubated with anti-CD36 antibody coupled to phycoerythrin for 2 hours, followed by a wash with PBS, pH 7.4 (600 g, 10 mn), and resuspended in a solution containing microbeads coupled to anti-phycoerythrin IgG. The CD36-positive TBC were isolated by passing through the MACS columns of the Miltenyi magnet system. Both the cell populations, after separation, were suspended in fresh RPMI 1640 medium containing 10% fetal calf serum, 200 U/ml penicillin, and 0.2 mg/ml streptomycin, seeded onto a BD BioCoat Poly-D-Lysine-coated dishes, and cultured for 24 hours. At the end of this period, the cells were used for the experiments or stained with trypan blue to assess their viability.

Detection of mRNA by real-time PCR (RT-PCR)

Total RNA was extracted from CD36-positive TBC by using TRIzol (Invitrogen) and subjected to DNase treatment using the RNase-free DNase Set (QIAGEN). One microgram of total RNA was reverse transcribed with SuperScript II RNase H reverse transcriptase using oligo(dT) according to the manufacturer's instructions (Invitrogen). RT-PCR was performed on the iCycler iQ real-time detection system, and amplification was undertaken by using SYBR Green I detection. Primers against the genes of interest were designed using the available mRNA sequence information in NCBI Genbank. Basic local alignment search tool (Blast, NCBI, available at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast.cgi>) was used for the verification of primers. Because the genes studied have not yet been sequenced for *P. obesus*, we designed primers based on the conserved regions in mRNA of the three well-characterized species: *Homo sapiens*, *Rattus norvegicus*, and *Mus musculus* [25]. The sequences of the genes used are as follows: β -Actin (Forward: 5'-AGAGGGAAATCGTGCGTGAC-3', Reverse: 5'-CAATAGTGATGACCTGGCCGT-3'); CD36 (Forward: 5'-ACTCTCTCCTCGGATGGCTAGCTG -3', Reverse: 5'- CCACAGTTCCGATCGCAGCCC -3'); α -gustducin (Forward 5'-GTTGGCTGAAATAAT TAAACG-3', Reverse: 5'-ATCTCTGGCCACCTACATC-3'). The amplification was carried out in a total volume of 25 μ l, which contained 12.5 μ l SYBR Green Supermix buffer (50 mM KCl; 20 mM Tris-HCl [pH 8.4]; 3 mM MgCl₂; 0.2 mM of each dNTP, 0.63 U iTaq DNA polymerase, and SYBR Green 1.0 nM fluorescein) and 12.5 μ l (0.3 μ M) of each

Chapitre II : Liste des Publications et Communications

primer and diluted cDNA. Results were evaluated by iCycler iQ software and relative quantification of mRNA in different groups was determined.

Western blot detection of CD36 in TBC

The CD36-positive TBC, isolated from lingual CVP of control and obese animals, were lysed with 50 μ l of buffer containing the following: 20 mM, HEPES pH 7.3; 1 mM, EDTA; 1 mM, EGTA; 0.15 mM, NaCl; 1%, Triton X-100; 10% glycerol; 1 mM, phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF); 2 mM, sodium orthovanadate and anti-protease cocktail (2 μ l in 1 ml of buffer). After centrifugation (13 000g x 1 min), cells lysates were used immediately or stored at -20°C. The protein content was determined by bicinchoninic acid (Pierce, France). Denatured proteins (30 μ g) were separated by SDS-PAGE (10%) and transferred to polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes, and immunodetection was performed by using anti-CD36 antibodies (1:1000 dilution). After treating the membranes with peroxidase-conjugated anti-goat secondary antibodies, peroxidase activity was detected with ECL reagents (Amersham, France).

Measurement of Ca²⁺ signaling

The CD36-positive TBC (2x10⁶/ml) were cultured on WillCodish wells with a glass bottom and loaded with Fura-2/AM (1 μ M) 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 were washed three times and remained suspended in the identical buffer. The changes in intracellular Ca²⁺ (F_{340}/F_{380}) were monitored under the Nikon microscope (TiU) by using S-fluor 40x oil immersion objective. The planes were taken at Z intervals of 0.3 μ m, 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 [Ca²⁺]_i were expressed as Δ Ratio, which was calculated as the difference between the peak F_{340}/F_{380} ratios. 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). For experiments in Ca²⁺-free medium, CaCl₂ was replaced by EGTA (2 mM).

Statistical analysis

Statistical analysis of data was carried out using Statistica (version 4.1, Statsoft, Paris, France). Data are presented as means \pm SEM. The significance of the differences between mean

Chapitre II : Liste des Publications et Communications

values was determined by analysis of variance one way, followed by a least-significant-difference (LSD) test. For all the tests, the significance level chosen was $p < 0.05$.

RESULTS

Obesity is associated with increased spontaneous preference for lipids in *P. obesus*

The gerbils fed a high caloric chow developed metabolic syndrome like features, with an increase in their body weight (Table I). The levels of plasma lipids, particularly triglyceridemia, were higher in obese animals than control rodents (Table I). Insulinemia and glycemia were also significantly higher in obese animals than control animals (Table I).

Our data show that the liver size increases with the development of obesity in *Psammomys obesus*. This increase in hepatic mass is positively correlated with hyperinsulinemia, insulin resistance, hypertriglyceridemia and hepatic triglycerides. In this investigation, we also measured the hepatic mass-body weight ratio which was increased in obese animals (Table I).

To explore whether the preference for lipids might be affected by obesity, the two-bottle preference test was performed in control and obese animals. We observed that the obese sand rats exhibited a high preference for an oily solution (Table-II). The control lean animals did not drink any of the solutions. The obese gerbils also exhibited an increased taste preference for a sweet solution (Table-II).

CD36 expression is altered in TBC of obese *P. obesus*

The CD36 has been detected in various tissues including the lingual epithelium [26], and is thought to be a lipido-receptor, implicated in the oro-sensory detection of dietary lipids [7], [27]. Therefore, we detected the expression of CD36 mRNA and protein contents in TBC. Figure 1A shows that there was lesser expression of CD36 mRNA in TBC of obese animals than that in controls. The expression of CD36 protein was not altered in TBC (Fig. 1C) and intestinal tissues (Fig. 1D) between control and obese gerbils.

We were also interested in determining the mRNA expression of α -gustducin, a G-protein considered to be a specific marker of taste receptor cells, in control and obese *Psammomys*. We observed no difference in the expression of α -gustducin mRNA between control and obese animals (Fig. 1B), showing that the integrity of taste receptor cells (TRC) is not affected in TBC of obese animals.

Linoleic acid-mediated Ca^{2+} signaling is altered in TBC of obese *P. obesus*

We observed that LA, a long-chain fatty acid (LCFA), induced a rapid rise in $[Ca^{2+}]_i$ in CD36-positive TBC (Fig. 2A, B, C). The LA-induced increases in $[Ca^{2+}]_i$ were higher in TBC of obese animals than those in control rodents (Fig. 2C). Furthermore, we employed sulfo-*N*-succinimidyl-oleate (SSO), the CD36 inhibitor [28], which significantly diminished Ca^{2+} signaling

in TBC of control and obese animals (Fig. 3A, B, C). However, the action of SSO was more pronounced in TBC of obese animals than that in controls (Fig. 3C).

In order to assess the implication of intracellular Ca^{2+} , we replaced Ca^{2+} from extracellular medium by EGTA, hence, termed as 0% Ca^{2+} . Figure 4A shows that replacement of Ca^{2+} by EGTA significantly decreased the increases in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in TBC of control and obese sand rats; however, the decrease in Ca^{2+} signaling was more pronounced in TBC of obese animals than that in controls. Whether LA induces the opening of store-operated Ca^{2+} (SOC) channels in 100% Ca^{2+} medium, we employed 2-aminoethoxydiphenyl borate (APB), a blocker of these channels. Figure 4B shows that prior-addition of APB into the cuvette significantly decreased Ca^{2+} signaling in TBC of control and obese animals.

Thapsigargin-mediated Ca^{2+} signaling is altered in TBC of obese *P. obesus*

Thapsigargin (TG) is the most widely used inhibitor of the ubiquitous sarcoplasmic-endoplasmic Ca^{2+} -ATPase (SERCA) in mammalian cells. Over the past ten years, this guaianolide compound of plant origin has become a popular tool in most of studies directed at elucidating the implication of Ca^{2+} that belongs to endoplasmic reticulum, ER [29]. TG deprives ER of its Ca^{2+} refilling process and, therefore, induces increases in $[\text{Ca}^{2+}]_i$.

In TBC, TG-induced increases in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ were lesser in obese animals than those in controls (Fig. 5A, B, C). The action of TG was curtailed in 0% Ca^{2+} buffer as compared to 100% Ca^{2+} buffer in TBC of control and obese gerbils (Fig. 6A). Addition of APB diminished the TG-induced increases in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in TBC of control and obese animals (Fig. 6B).

Finally, we employed, ionomycin, known to open non-specifically Ca^{2+} channels [30], and we observed that the increases in $[\text{Ca}^{2+}]_i$, evoked by this agent, were not statistically different in TBC of control and obese animals (Fig. 6C).

DISCUSSION

P. obesus is a diurnal rodent that lives in the arid zones of North Africa and Eastern Mediterranean region. The “trivial name” sand rat has been given to this rodent, but it belongs to the family of Muridae and subfamily of Gerbillinea. This animal does not exhibit hyperglycemia in its natural desert habitat; however, it has the tendency to develop diet-induced hyperglycemia associated with obesity. The first glance at our results confirms the previous findings that *P. obesus* subjected to the laboratory standard diet exhibit hyperinsulinemia, hyperglycemia and hypertriglyceridemia associated with an increase in body weight, compared to *Salsola foetida*-fed animals [19].

Interestingly, increased hepatic mass was positively correlated with weight gain in obese *P. obesus* [31]. We have previously shown that obesity in these animals is characterized by peripheral and hepatic insulin resistance [16]. Since excessive consumption of high caloric diet contributes to weight gain and insulin resistance, it is possible that fat intake might be altered in the obese state [32]. Besides, obese subjects have been reported to exhibit a higher preference for fatty foods than lean subjects [33]. In animal models, oral fatty acid sensitivity, in response to stimulation with fatty acids, is determinant for fat consumption and body weight regulation. We were tempted to assess the oro-sensorial detection of dietary lipids. We observed, to our great surprise, that the obese animals exhibited a strong gustatory preference for the oily solution in a two-bottle preference test. The control animals did not drink, at all, any of the liquids as they were acclimatized to feed mainly on succulent plant, *Salsola foetida*, relatively high in water and electrolytes. When we extended the taste preference experiments for two or three days or more, the obese gerbils drank oily solution so much in excess that it caused their death (not shown). The gerbils also exhibited a spontaneous preference for a sweet solution which was very high in obese group of animals. The molecular mechanisms of sweet preference and the implication of lingual receptors will be a subject of intensive investigation in the near future.

The CD36, a lipido-receptor, has been implicated in lipid taste perception in rodents [7], [8] and human beings [10], [34]. The TBC of obese animals were found to express low CD36 mRNA as compared to control animals, though the protein contents of CD36 were not altered between control and obese gerbils both in TBC and intestine (used as a control). We do not have a plausible explanation for these discrepancies. It is possible that the total CD36 protein in TBC of obese animals remains unchanged, but its distribution between lipid rafts and soluble plasma membrane fractions is altered. According to this hypothesis, the CD36 protein would be translocated to cytosolic soluble fractions, thus decreasing its contents in the lipid rafts in the TBC of obese animals. It is also possible that CD36 is degraded in ubiquitin-dependent manner in lipid rafts [35], but its contents will rise in non-raft fractions. These hypotheses should be confirmed in future.

Chapitre II : Liste des Publications et Communications

Conversely, low CD36 in the lipid rafts of TBC might contribute to low (hypo) sensitivity to fatty acids. It has been shown that the animals that are hyposensitive to orally administered fatty acids consume excess fats and develop obesity when exposed to a high-fat diet [36]. In our study, we did not measure daily food intake in obese and control animals; however, we assume that the obese animals would show a strong eating behavior toward the palatable laboratory diet because it contains 7.5% of lipids whereas *Salsola foetida* contains only 0.4% of them. It has been shown that foods high in dietary fat exert a weak effect on satiation, which leads to a form of passive overconsumption [3]. As mentioned here-before, obese *P. obesus*, in a two-bottle test, clearly showed a spontaneous preference for a solution, containing colza oil.

We have shown that LA, by binding to CD36, triggers an increase in $[Ca^{2+}]_i$ in CD36-positive TBC purified from mouse CVP [23], [9]. LA induced an increase in $[Ca^{2+}]_i$ in TBC *via* CD36, and it was higher in obese animals than control rodents. A plausible explanation on the increase in Ca^{2+} signaling in obese animals is not available. It is possible that other proteins like GPR120 [37], also considered as a lipido-receptor, are also participating in LA-induced Ca^{2+} signaling as SSO [28], the CD36 blocker, significantly curtailed, but did not completely abolish, the increases in increase in $[Ca^{2+}]_i$ in these cells. However, the implication of GPR120 in Ca^{2+} signaling in these cells remains to be assessed later on. We tried to detect GPR120 in the TBC of *P. obesus* in western blots, by using antibodies from Abcam (ab-75313) and Santacruz (sc-48203), but without success, and it may be due to species different. In future, we will employ anti-GPR120 antibodies from other sources. Alternatively, it is also possible that altered composition of plasma membrane phospholipids of CD36-positive TBC in obese animals might be responsible for altered downstream signaling, involving the hydrolysis of phosphatidylinositols, but this hypothesis remains to be ascertained in future.

However, a decrease in LA-induced Ca^{2+} signaling in 0% Ca^{2+} medium in TBC of control and obese animals show that this fatty acid evokes increases in $[Ca^{2+}]_i$ from intracellular pool, probably from endoplasmic reticulum (ER) as demonstrated in mouse CD36-positive TBC [9], [24]. As per capacitative model of Ca^{2+} homeostasis, the depletion of intracellular stores of Ca^{2+} is followed by Ca^{2+} influx *via* the opening of Ca^{2+} channels to refill the intracellular pools [38]. These channels have been termed store-operated Ca^{2+} (SOC) channels, and their activity is maintained as long as the stores are not refilled [38]. To determine whether LA-induced recruitment of Ca^{2+} from ER results in the opening of SOC channels, we employed a SOC channel blocker, which as anticipated, decreased significantly the LA-induced calcium response in 100% Ca^{2+} buffer in TBC of control and obese animals. In order to probe the implication of ER pool, we employed SERCA inhibitor and observed that TG-induced increases in $[Ca^{2+}]_i$ in TBC of obese animals were lower than those in controls. These observations confirm the above-mentioned results on LA-induced

Chapitre II : Liste des Publications et Communications

decreases in $[Ca^{2+}]_i$ in 0% Ca^{2+} buffer in TBC of obese animals, indicating a decreased recruitment of Ca^{2+} from the ER pool. As expected, TG also opened SOC channels both in control and obese TBC. The modification of opening of SOC channel is a specific physiological feature in these animals, as the action of ionomycin, known to open non-specifically almost all the Ca^{2+} channels, was not significantly different between TBC of control and obese *P. obesus*.

As regards *in vivo* calcium homeostasis, these animals possess regulatory adaptive mechanisms. It has been shown that plants of chenopodiaceae family provide with much oxalate (300 mg/d), but little Ca^{2+} (30 mg/day); whereas the laboratory diet provides with low-oxalate (<100 mg/day) and high- Ca^{2+} (approximately 150 mg/day). *P. obesus* has the ability to eliminate dietary oxalate and regulate Ca^{2+} homeostasis *via* intestinal symbiotic bacteria whose number increases or decreases according to the diets [39].

In conclusion, we report in this study, for the first time, that obesity in *P. obesus* is associated with increased oro-gustatory perception of dietary fat and upregulated Ca^{2+} signaling in circumvallate papillae, associated with altered CD36 expression. Future challenges require in-depth investigations to better understand the implication of GPR120 or the downregulation/distribution of CD36 in plasma membrane fractions of TBC during obesity since the mechanisms responsible for altered Ca^{2+} signaling might be involved in the regulation of feeding behavior particularly post-prandial phase of food ingestion.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank the French Ministry of External Affairs that sanctioned a contingent grant and a short-term studentship to one of the authors (FAM) *via* a bilateral Franco-Algerian collaborative Tassili project (12MDU855).

REFERENCES

1. World health organization (2000) Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation. World Health Organ Tech Rep Ser 894: 1-253.
2. Xiao J, Yang W (2012) Weight loss is still an essential intervention in obesity and its complications: a review. *J Obes* doi: 10.1155/2012/369097.
3. Blundell JE, MacDiarmid JI (1997) Fat as a risk factor for overconsumption: satiation, satiety, and patterns of eating. *J Am Diet Assoc* 97: S63-S69.
4. Lanfer A, Knof K, Barba G, Veidebaum T, Papoutsou S, *et coll.* (2012) Taste preferences in association with dietary habits and weight status in European children: results from the IDEFICS study. *Int J Obes (Lond)* 36: 27-34.
5. Stewart JE, Newman LP, Keast RS (2011) Oral sensitivity to oleic acid is associated with fat intake and body mass index. *Clin Nutr* 30: 838-844.
6. Stewart JE, Keast RS (2012) Recent fat intake modulates fat taste sensitivity in lean and overweight subjects. *Int J Obes (Lond)* 36: 834-842.
7. Abumrad NA (2005) CD36 may determine our desire for dietary fats. *J Clin Invest* 115 : 2965-2967.
8. Laugerette F, Passilly-Degrace P, Patris B, Niot I, Febbraio M, *et coll.* (2005) CD36 involvement in orosensory detection of dietary lipids, spontaneous fat preference, and digestive secretions. *J Clin Invest* 115: 3177-3184.
9. Dramane G, Abdoul-Azize S, Hichami A, Vögtle T, Akpona S, *et coll.* (2012) STIM1 regulates calcium signaling in taste bud cells and preference for fat in mice. *J Clin Invest* 122: 2267-2282.
10. Pepino MY, Love-Gregory L, Klein S, Abumrad NA (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. Kaiser N, Cerasi E, Leibowitz G (2012) Diet-induced diabetes in the sand rat (*Psammomys obesus*). *Methods Mol Biol* 933: 89-102.
12. Boudierba S, Sanz MN, Sánchez-Martín C, El-Mir MY, Villanueva GR, *et coll.* (2012) Hepatic mitochondrial alterations and increased oxidative stress in nutritional diabetes-prone *Psammomys obesus* model. *Exp Diabetes Res* doi: 10.1155/2012/430176.
13. Ziv E, Shafrir E (1995) *Psammomys obesus*: nutritionally induced NIDDM-like syndrome on a 'thrifty gene' background. In: Shafrir E, ed. *Lessons from animal diabetes*. London: Smith-Gordon. pp. 285-300.
14. Barnett M, Collier GR, Collier FM, Zimmet P, O'Dea K (1994) A cross-sectional and short-term longitudinal characterisation of NIDDM in *Psammomys obesus*. *Diabetologia* 37: 671-676.
15. Kalderon B, Gutman A, Levy E, Shafrir E, Adler JH (1986) Characterization of stages in development of obesity-diabetes syndrome in sand rat (*Psammomys obesus*). *Diabetes* 35: 717-724.

Chapitre II : Liste des Publications et Communications

16. Koceir EA, Dahmani Y, Leverve X (2003) Low rate of glucose 6-phosphate hydrolysis in liver cells is a physiological feature of non-diabetic wild sand rats (*Psammomys obesus*). *Diabetes Metab* 29: 363-374.
17. Kaiser N, Yuli M, Uckaya G, Oprescu AI, Berthault MF, *et coll.* (2005) Dynamic changes in cell mass and pancreatic insulin during evolution of nutrition-dependent diabetes in *Psammomys obesus*. *Diabetes* 54: 138-145.
18. Frenkel G, Shaham Y, Kraicer PF (1972) Establishment of conditions for the sand-rat *Psammomys obesus*. *Lab Anim Sci* 22: 40-47.
19. Marquié G, Duhault J, Jacotot B (1984) Diabetes mellitus in sand rats (*Psammomys obesus*). Metabolic pattern during development of the diabetic syndrome. *Diabetes* 33 : 438-443.
20. Folch J, Lees M, Sloane-Stanley GH (1957) A simple method for isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem* 226: 497-509.
21. Triboulot C, Hichami A, Denys A, Khan NA (2001) Dietary (n-3) polyunsaturated fatty acids exert antihypertensive effects by modulating calcium signaling in T cells of rats. *J Nutr* 131: 2364-2369.
22. Carles J (1956) Colorimetric microdetermination of phosphorus. *Bull Soc Chim Biol* 38: 255-257.
23. Gaillard D, Laugerette F, Darcel N, El-Yassimi A, Passilly-Degrace P, *et coll.* (2008) The gustatory pathway is involved in CD36-mediated orosensory perception of long-chain fatty acids in the mouse. *FASEB J* 22: 1458-1468.
24. El-Yassimi A, Hichami A, Besnard P, Khan NA (2008) Linoleic acid induces calcium signaling, Src kinase phosphorylation, and neurotransmitter release in mouse CD36-positive gustatory cells. *J Biol Chem* 283: 12949-12959.
25. Emile L, Geneviève L, Edgard D, Mounib E, Louis P, *et coll.* (2010) Intestinal and Hepatic Cholesterol Carriers in Diabetic *Psammomys obesus*. *Endocrinology* 151: 958-970.
26. Fukuwatari T, Kawada T, Tsuruta M, Hiraoka T, Iwanaga T, *et coll.* (1997) Expression of the putative membrane fatty acid transporter (FAT) in taste buds of the circumvallate papillae in rats. *FEBS Lett* 414: 461-464.
27. Khan NA, Besnard P (2009) Oro-sensory perception of dietary lipids: new insights into the fat taste transduction. *Biochim Biophys Acta* 1791: 149-155.
28. Kuda O, Pietka TA, Demianova Z, Kudova E, Cvacka J *et coll.* (2013) Sulfo-N-succinimidyl Oleate (SSO) inhibits fatty acid uptake and signaling for intracellular calcium *via* binding CD36 lysine 164. SSO also Inhibits oxLDL uptake by macrophages. *J Biol Chem* 2013 Apr 18. [Epub ahead of print]
29. Andrews SP, Ball M, Wierschem F, Cleator E, Oliver S, *et coll.* (2007) Total synthesis of five thapsigargins: guaianolide natural products exhibiting sub-nanomolar SERCA inhibition. *Chemistry* 13: 5688-5712.

Chapitre II : Liste des Publications et Communications

30. Ferriere F, Khan NA, Meyniel JP, Deschaux P (1997) 5-Hydroxytryptamine-induced calcium-channel gating in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) peripheral blood lymphocytes. *Biochem J* 323: 251-258.
31. Lahfa FB, Dahmani Y, Troutaud D, Deschaux P (1995) Nutritional influences on in vitro splenic lymphocyte proliferation in *Psammomys obesus* (Rodentia Gerbillidae). *Cell Mol Biol Res* 41: 387-390.
32. Bray GA, Paeratakul S, Popkin BM (2004) Dietary fat and obesity: a review of animal, clinical and epidemiological studies. *Physiol Behav* 83: 549-555.
33. Mela DJ (2001) Determinants of food choice: relationships with obesity and weight control. *Obes Res* 4 : 249S-255S.
34. Stewart JE, Feinle-Bisset C, Golding M, Delahunty C, Clifton PM, *et coll.* (2010) Oral sensitivity to fatty acids, food consumption and BMI in human subjects. *Br J Nutr* 104: 145-152.
35. Tran TT, Poirier H, Clément L, Nassir F, Pelsers MM *et coll.* (2011) Luminal lipid regulates CD36 levels and downstream signaling to stimulate chylomicron synthesis. *J Biol Chem* 286 : 25201-25210.
36. Gilbertson TA, Liu L, York DA, Bray GA (1998) Dietary fat preferences are inversely correlated with peripheral gustatory fatty acid sensitivity. *Ann N Y Acad Sci* 855: 165-168.
37. Cartoni C, Yasumatsu K, Ohkuri T, Shigemura N, Yoshida R *et coll.* (2010) Taste preference for fatty acids is mediated by GPR40 and GPR120. *J Neurosci* 30 : 8376-8382.
38. Putney JW Jr (2005) Capacitative calcium entry: sensing the calcium stores. *J Cell Biol* 169: 381-2.
39. Palgi N, Taleisnik H, Pinshow B (2008) Elimination of oxalate by fat sand rats (*Psammomys obesus*): wild and laboratory-bred animals compared. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 149 : 197-202.

Legends of the Figures

Figure 1. Expression of and CD36 and α -gustducin.

The CD36-positive TBC were isolated from CVP of *P. obesus* as described in Materials and Methods. Relative mRNA expression of CD36 (Fig. 1A) and α -gustducin (Fig. 1B) in CD36-positive TBC cells was assessed. $p < 0.001$ shows the significant differences between TBC of obese and control animals. NS=insignificant differences. The CD36 and β -actin proteins were also detected by western blots in CD36-positive TBC (Fig. 1C) and intestinal cells (Fig. 1D) of control and obese animals. For experimental details, see Materials and Methods.

Figure 2. Effects of LA on the increases in $[Ca^{2+}]_i$ in CD36-positive TBC.

The CD36-positive TBC were isolated from CVP of *P. obesus* as described in Materials and Methods. Ca^{2+} imaging studies were performed on CD36-positive TBC in calcium-containing media. The changes in intracellular Ca^{2+} (F_{340}/F_{380}) were monitored under the Nikon microscope (TiU) by using S-fluor 40x oil immersion objectives, as described in Materials and Methods. Colored time-lapse changes show the kinetics of the rise in $[Ca^{2+}]_i$, following addition of linoleic acid (LA), in a CD36-positive taste bud cell, freshly isolated from CVP of control (A) and obese (B) animals. (C) Represents the single traces of observations and the arrow indicates when the test molecule (LA, 20 μ M) was added into the cuvette without interruptions in the recording.

Figure 3. LA-induced increases in $[Ca^{2+}]_i$ via CD36 in TBC.

The CD36-positive TBC cells were incubated with or without SSO (50 μ M) for 20 min and then treated with LA at 20 μ M. Ca^{2+} imaging studies were performed on CD36-positive TBC in Ca^{2+} -containing media. The changes in intracellular Ca^{2+} (F_{340}/F_{380}) were monitored under the Nikon microscope (TiU) by using S-fluor 40x oil immersion objectives, as described in Materials and Methods. The arrows indicate when the test molecule (LA, 20 μ M) was added into the cuvette without interruptions in the recording in TBC of control (A) and obese (B) animals. (C) represents histograms of the changes in $[Ca^{2+}]_i$.

Figure 4. Implication of Ca^{2+} influx in LA-induced increases in $[Ca^{2+}]_i$ in CD36-positive TBC.

The CD36-positive TBC were isolated from CVP of *P. obesus* as described in Materials and Methods. Ca^{2+} imaging studies were performed in Ca^{2+} -free (0% Ca^{2+}) or Ca^{2+} -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 40x oil immersion objectives. (A) represents the experiments performed in Ca^{2+} -containing (100% Ca^{2+}) and Ca^{2+} -free medium (0% Ca^{2+}). (B) represents the Δ

increases in $[Ca^{2+}]_i$ in the presence of a SOC channel blocker (ABP at 5 μM) in Ca^{2+} -containing (100% Ca^{2+}) medium. In both the experimental conditions, LA was used at 20 μM .

Figure 5. Effects of TG on the increases in $[Ca^{2+}]_i$ in CD36-positive TBC.

The CD36-positive TBC were isolated from CVP of *P. obesus* as described in Materials and Methods. Ca^{2+} imaging studies were performed on CD36-positive TBC in Ca^{2+} -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 40x oil immersion objectives. Colored time-lapse changes show the kinetics of the rise in $[Ca^{2+}]_i$, induced by TG at 5 μM , in a CD36-positive taste bud cell freshly isolated from CVP of control (A) and obese (B) animals. (C) Represents the single traces of observations and the arrow indicates when the test molecule (TG, 5 μM) was added into the cuvette without interruptions in the recording.

Figure 6. Implication of Ca^{2+} influx in TG-induced increases in $[Ca^{2+}]_i$ in CD36-positive TBC.

The CD36-positive TBC were isolated from CVP of *P. obesus* as described in Materials and Methods. The changes in intracellular Ca^{2+} (F_{340}/F_{380}) were monitored under the Nikon microscope (TiU) by using S-fluor 40x oil immersion objectives. (A) represents the histograms of the experiments performed in Ca^{2+} -containing (100% Ca^{2+}) and Ca^{2+} -free (0% Ca^{2+}) media with TG (5 μM). (B) Represents the Δ increases in $[Ca^{2+}]_i$ evoked by TG (5 μM) in the presence or absence of ABP at 5 μM in Ca^{2+} -containing (100% Ca^{2+}) medium. (C) represents the changes in intracellular Ca^{2+} (F_{340}/F_{380}) evoked by ionomycin at 500 nM in Ca^{2+} -containing (100% Ca^{2+}) medium.

Table I: Biochemical analysis of plasma and liver parameters in *Psammomys Obesus*

Parameters	Control group	Obese group	p-values
Body weight (g)	79.76 \pm 4.50	121 \pm 30	p<0.001
Insulin ($\mu U/ml$)	23.50 \pm 3.20	150 \pm 19	p<0.001
Glucose (g/l)	0.58 \pm 0.10	0.81 \pm 0.17	p<0.01
Total Cholesterol (g/l)	0.58 \pm 0.37	1.01 \pm 0.35	p<0.001
HDL cholesterol (g/l)	0.41 \pm 0.04	0.55 \pm 0.03	p<0.01
LDL cholesterol (g/l)	0.37 \pm 0.02	0.72 \pm 0.03	p<0.001
Triglycerides (g/l)	0.52 \pm 0.39	1.48 \pm 0.06	p<0.001
Phospholipids (g/l)	0.71 \pm 0.22	0.72 \pm 0.18	p<0.05
Liver mass/body weight (%)	3.39 \pm 0.09	4.15 \pm 0.80	p<0.05
Hepatic total lipids (g/100g wet wt)	3.99 \pm 0.14	4.36 \pm 0.60	p<0.01

Chapitre II : Liste des Publications et Communications

Hepatic total cholesterol (g/100g wet wt)	0.27 ± 0.01	0.289 ± 0.07	$p < 0.05$
Hepatic total glycerides (g/100g wet wt)	0.29 ± 0.01	0.446 ± 0.02	$p < 0.001$

Values are means \pm SEM, n = 10.

Table II: Spontaneous preference of lipid and sweet solutions in *Psammomys Obesus*

Intake (g/12 hrs/animal)	Control group	Obese group
Water (xanthane)	0.00	0.12 ± 0.01
Colza oil (1%, v/v)	0.00	$7.55 \pm 0.06^*$
Sucrose (4%, w/v)	0.88 ± 0.7	$16.5 \pm 1.30^*$

Values are means \pm SEM, n=10. The asterisk (* $p < 0.001$) shows the significant differences in obese group animals, drank a solution containing colza oil or sucrose and compared to those that drank water (xanthane).

Figure 1

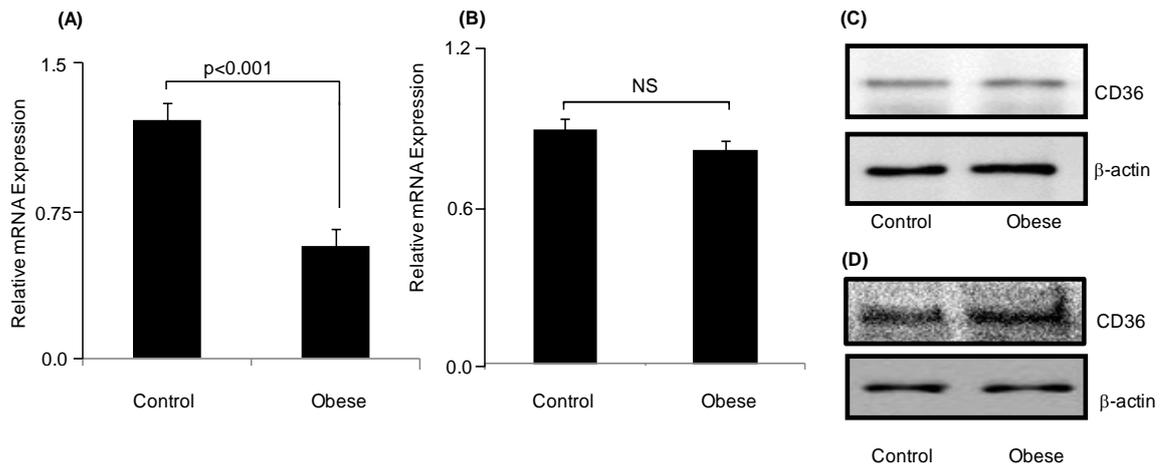


Figure 2

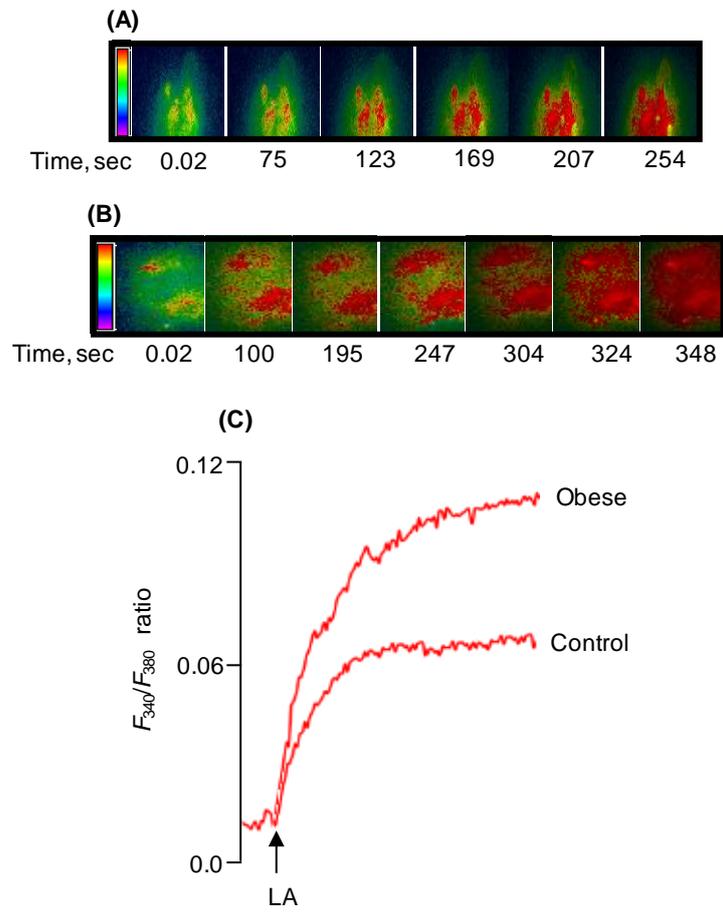


Figure 3

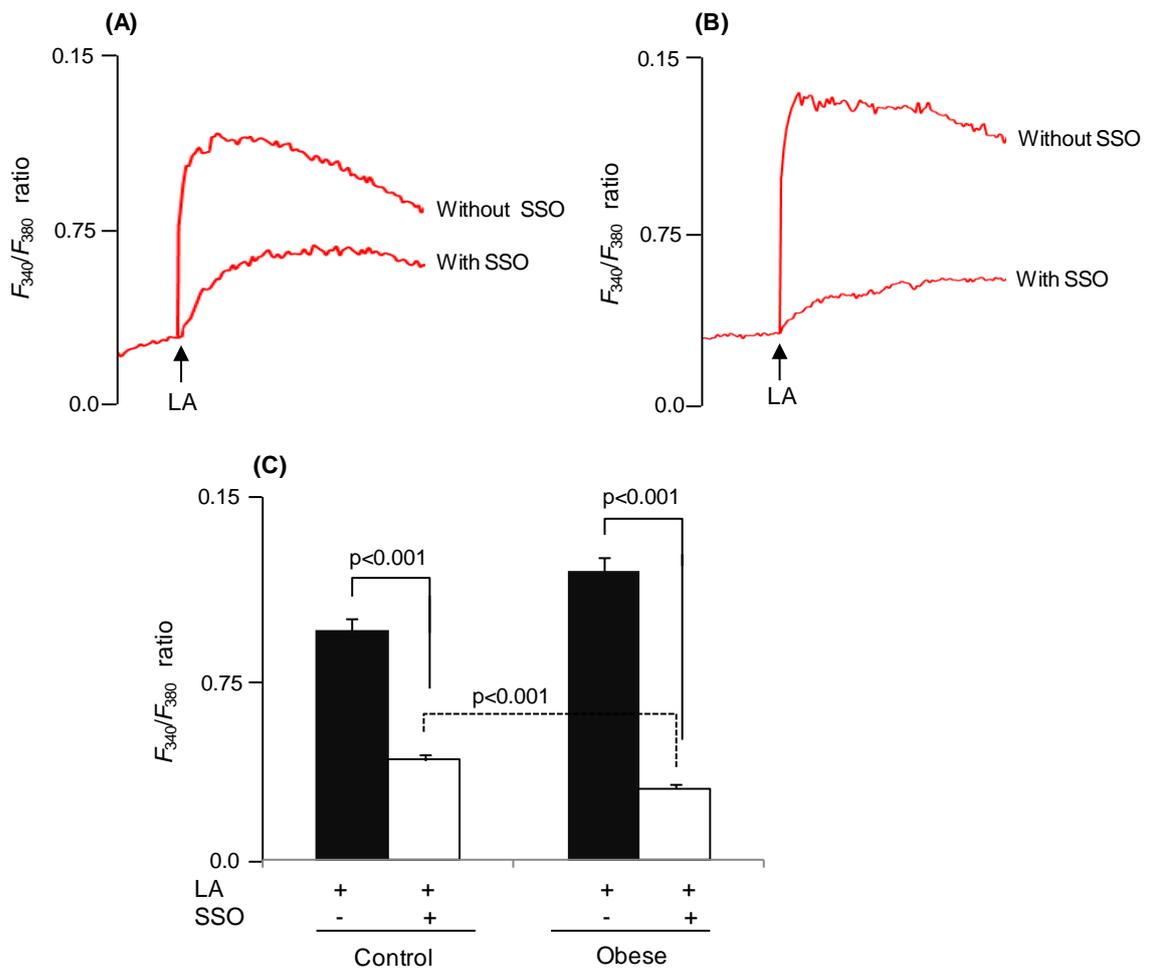


Figure 4

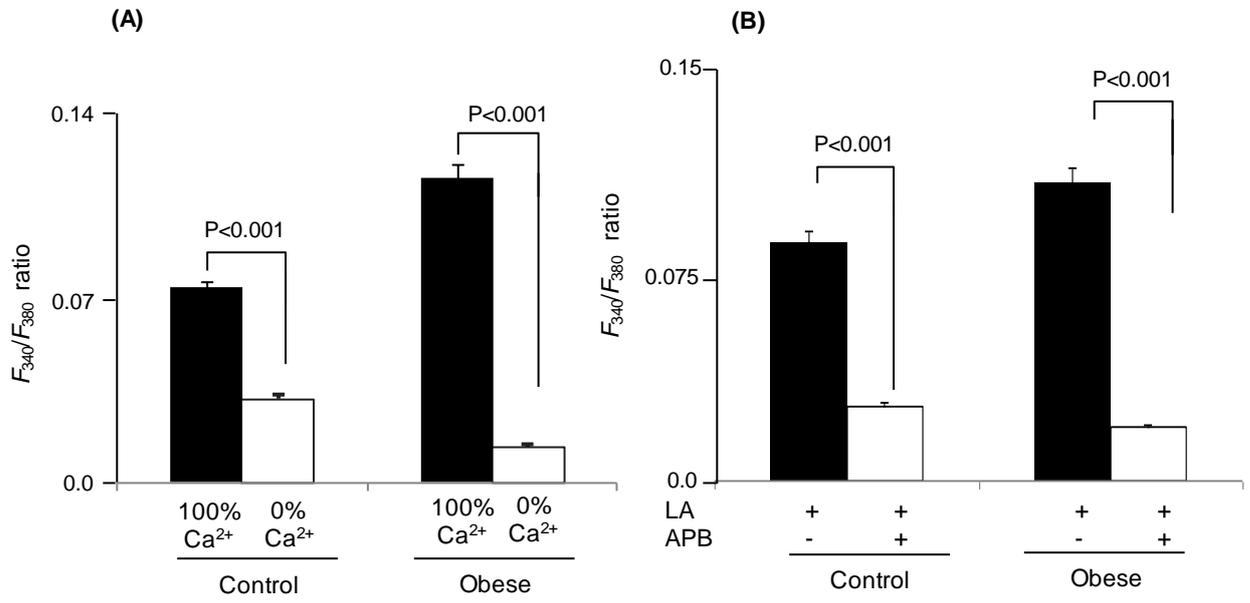


Figure 5

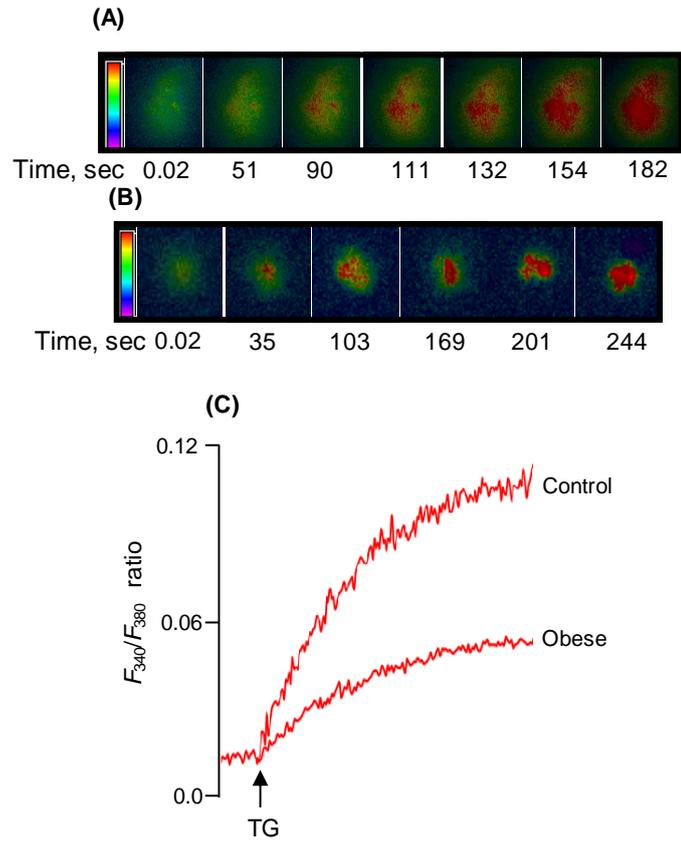
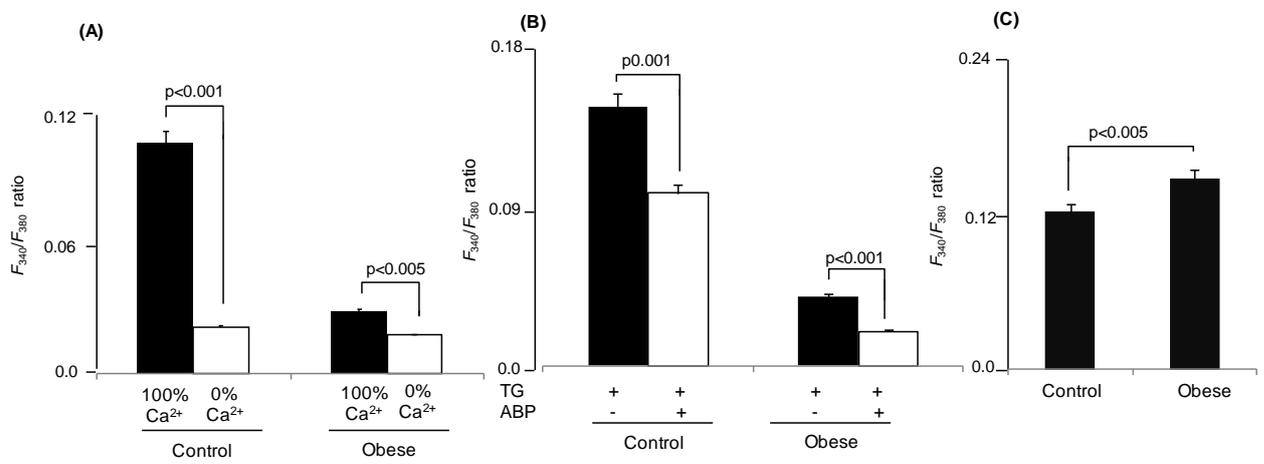


Figure 6



PUBLICATION N°4

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

Chevrot M., Bernard A., Ancel D., Buttet M., Martin C., Abdoul-Azize S., Merlin J-F., Poirier H., Niot I., Khan N., Passilly-Degrace P., Besnard P.

J Lipid Res. 2013 Jul 9. [Epub ahead of print]

Objectif de l'étude

Des données récentes suggèrent l'existence de relation entre la sensibilité oro-sensorielle aux lipides alimentaires, la régulation de l'apport en graisses et l'état de la masse corporelle. Cependant, les mécanismes par lesquels les changements dans la sensibilité gustative se déroulent demeurent mal compris. Est-ce que l'obésité en elle-même peut affecter la préférence pour les aliments gras est inconnue. Pour répondre à cette question, contrairement à l'article n°3 où l'obésité des animaux était naturel ; dans cette étude les souris ont été soumises à deux régimes différents obésogéniques principalement composés de lipides saturés, seuls ou avec du saccharose ajouté en utilisant une combinaison d'approches biochimiques, physiologiques et comportementaux.

Chapitre II : Liste des Publications et Communications

Article

----- Message original -----

Objet: JLR/2013/039446 -- Manuscript Decision

Envoyé: Mardi 9 Juillet 2013 13:01:55

De: "alice lichtenstein" <alice.lichtenstein@tufts.edu>

À: "Philippe Besnard" <pbesnard@u-bourgogne.fr>

MS ID#: JLR/2013/039446

Title: Obesity alters the gustatory perception of lipids in the mouse: plausible involvement of the lingual CD36

Dear Dr. Besnard:

I'm happy to inform you that your manuscript "Obesity alters the gustatory perception of lipids in the mouse: plausible involvement of the lingual CD36" (JLR/2013/039446) has been accepted for publication in the Journal of Lipid Research. Please note that JLR will publish the accepted version (final revision) of your manuscript online as a Paper in Press (PIP) soon after acceptance. The PIP date can be used as the publication date. For further information regarding JLR Papers in Press, please refer to the JLR online Web site at <http://www.jlr.org>.

Now that your manuscript has been accepted for publication, the redactory office, Dartmouth Journal Services, requires source files: one Word file, including text and tables, and individual TIFF or EPS files for the Figures (color files as RGB). Please go to the following Web site to upload your source files directly to the redactory office: <https://quicksubmit.dartmouthjournals.com/jlr>

Source files for supplemental data are NOT needed at the time of acceptance and should not be sent to the redactory. We will use the files included in your submission. Supplemental files cannot be added after acceptance.

Publication of the print version of your manuscript will be delayed until we receive all material in acceptable format. For detailed information about producing quality Figures, please go to http://www.jlr.org/site/home/authors/JLR_DigitalArtGuidelines.pdf. If you have any questions, please contact Lynn McMillan from Dartmouth Journal Services at lynn.mcmillan@sheridan.com. Thank you in advance for your quick response.

Chapitre II : Liste des Publications et Communications

We strongly encourage you to work with your home institution's media relations office to publicize your paper. If your institution writes an article or a news release for the media, please send a copy of it to Angela Hopp at ahopp@asbmb.org. We will be happy to post it on the ASBMB website and share it through our social media channels.

Each month, JLR publishes as its cover a colored illustration relevant to an article in the same issue, and we invite authors of accepted papers to submit illustrations for consideration. The cover illustration should be scientifically interesting and visually attractive and should not be a complex, data-laden Figure. The illustration submitted may be only a portion of a Figure in the paper but need not be a Figure in the paper as long as it is closely related to the subject of the paper.

To submit an illustration for consideration, please prepare the image in RGB with the following final dimensions at 300 dpi: 5.75 inches wide by 7.25 inches tall. If the cover image contains a graphic on top of a solid background, please size the entire background to 5.25 inches wide by 7.25 inches tall. The graphic itself should not exceed 5 inches in width or 5.5 inches in height and should be centered in that space. After converting to PDF format (5 megabytes maximum), send it as an e-mail attachment to Lynn McMillan at lynn.mcmillan@sheridan.com. Make sure that the top of the Figure is clearly indicated. Include an explanatory caption of 50 to 60 words for the table of contents, a short caption of 6 to 8 words for the cover, and the manuscript number of your article. If your image is selected for the cover, you will be asked to send to us the original file (saved as EPS or TIFF, in RGB color format, at 300 dpi in its final dimension of 5.75 inches wide by 7.25 inches tall).

All further correspondence regarding the status of this accepted manuscript should be directed to Mary Chang, Publications Manager of JLR, at 240-283-6609 or mchang@asbmb.org.

Thank you for contributing to the Journal.

Sincerely,

Alice Lichtenstein, D.Sc.

Associate Editor

Sent on: July 9, 2013

Chapitre II : Liste des Publications et Communications

Chapitre II : Liste des Publications et Communications

Chapitre II : Liste des Publications et Communications

Chapitre II : Liste des Publications et Communications

Chapitre II : Liste des Publications et Communications

Chapitre II : Liste des Publications et Communications

Chapitre II : Liste des Publications et Communications

Chapitre II : Liste des Publications et Communications

Chapitre II : Liste des Publications et Communications

Chapitre II : Liste des Publications et Communications

Chapitre II : Liste des Publications et Communications

Chapitre II : Liste des Publications et Communications

PUBLICATION N°5

**Ca²⁺ signaling in taste bud cells and spontaneous preference for fat:
unresolved roles of CD36 and GPR120.**

Abdoul-Azize S., Subramaniam S., Sadou H., Besnard P. and Khan NA

Biochimie (2013) doi: 10.1016/j.biochi.2013.06.005.

Objectif de l'étude

Des données convaincantes récentes chez les rongeurs et chez l'homme soulèvent la possibilité d'une sixième modalité de goût supplémentaire consacré à la perception oro-gustative des lipides alimentaires. Dans cet article, nous avons mis en évidence les récentes avancées sur les mécanismes qui sous-tendent la détection oro-gustative des lipides alimentaires, en particulier le rôle des protéines CD36 et GPR120.

Chapitre II : Liste des Publications et Communications

Article

Chapitre II : Liste des Publications et Communications

Chapitre II : Liste des Publications et Communications

Résultats non publiés

MAP Kinase signaling is involved in oro-gustatory lipid taste perception in mice

Objectif de l'étude

Nous venons de voir, dans les articles précédents que la fixation d'un acide gras sur le récepteur CD36 induit une augmentation rapide de $[Ca^{2+}]_i$ suivie par la libération d'un neurotransmetteur conduisant le message gustatif vers les nerfs afférents lors de la perception oro-gustative des lipides alimentaires. Dans ce travail, la question de l'implication des MAP kinases dans cette signalisation cellulaire *via* CD36 a été étudiée.

Article en préparation

Comme nous l'avons vu dans le chapitre 3 précédant que, les MAP kinases sont des sérines / thréonine kinases spécifiques qui répondent à des stimuli extracellulaires (stress osmotique, choc thermique, cytokines pro-inflammatoires) et qui modulent les activités cellulaires, telles que la prolifération, l'expression génique, la différenciation, la mitose, la survie cellulaire, et l'apoptose. Il y a plusieurs cascades de MAP Kinases bien connues comme celle des ERK1/2, celle des JNK, et celle des p38 (Lewis *et coll.*, 1998). Ces cascades sont activées dès que le CD36 est stimulé dans les cellules (Chen *et coll.*, 2008, Baranova *et coll.*, 2010).

Le fait que le CD36 soit couplé aux cascades des MAP Kinases dans différents types cellulaires, il est possible qu'une de ces cascades, c'est-à-dire MEK/ERK1/2/ELK, soit impliquée dans la signalisation gustative lipidique. De plus, il est aussi possible que cette cascade puisse influencer les différentes aires cérébrales, impliquées dans la modulation de préférence alimentaire.

Dans cette étude, nous nous proposons d'élucider l'implication d'une cascade des MAP Kinases (MEK/ERK1/2/ELK) dans la perception oro-gustative des lipides alimentaires.

Ainsi nous nous sommes posé les questions suivantes :

- ***Les AGLC induisent-ils, via le CD36, l'activation des MAP Kinases dans les cellules gustatives des papilles caliciformes ?***
- ***Les aires cérébrales, telles que le noyau arqué, l'hippocampe et le noyau du tractus solitaire (NTS) sont-elles impliquées dans cette signalisation ?***
- ***Les MAP Kinases sont-elles impliquées dans la libération de la sérotonine dans ces cellules ?***
- ***Quel rôle peuvent-ils jouer dans le comportement alimentaire ?***

Les expériences ont été réalisées sur les cellules des papilles caliciformes (des souris sauvages et des souris n'exprimant pas le gène ERK1) exprimant CD36.

Matériels et méthodes

Matériels

Les souris C57BL/6J âgées de 6 à 10 semaines, ont été fournies par Janvier Elevage (France). Les souris invalidées pour le gène ERK1 (ERK1^{-/-}) de phénotype normal ont été données par le Professeur Jacques POUYSSEGEUR (Nice). Les anticorps primaires utilisés sont: P-ERK1/2 (réf :4370), ERK1/2 (réf: 4695), P-p38 (réf :4511P), p38 (réf: 9212), P-JNK (réf: 4668), JNK (réf: 9252), Raf (réf: 9427), P-MEK (réf: 9154), MEK (réf: 9146), RSK (réf: 9333), P-ELK-1 (réf: 9181), ils ont été achetés chez « cell signaling technology ». Les anticorps P-Vav 1 (réf: Sc 16408-R), P-Vav 2 (réf: Sc-16409) ont été achetés chez « Santa Cruz ». Les anticorps secondaires, ont

Chapitre II : Liste des Publications et Communications

aussi été achetés chez « cell signaling technology ». La L-glutamine et les milieux RPMI 1640 ont été fournis par Biowhitaker, Belgique. La FURA-2/AM par Probes (Eugène, OR, USA). L'élastase et la dispase ont été fournies par Serlabo, Bonneuil/Marne, France et Roche Diagnostics, Paris, France. La collagénase de type I, l'inhibiteur de trypsine ont été fournis par Sigma Chemicals (St Louis, USA). La phycoérythrine a été fournie par Santa Cruz Biotechnology Inc. (USA). Les directives européennes concernant l'utilisation et l'entretien des animaux ont été respectées. Les protocoles expérimentaux ont été approuvés par le Comité ministériel d'éthique en Bourgogne. Les produits nécessaires pour la PCR ont été fournis par Bio-RAD. Le kit de CD36 siRNA, Accell siRNA ERK1 (E-040126-00-0005), Accell siRNA ERK2 (E-040613-00-0005) et Accell Green Non target (D-001910-01-05) ont été achetés chez Thermo Fisher Scientific / Dharmacon (USA). Le PD0325901, inhibiteur de MEK, a été acheté chez Sigma-Aldrich (France).

Isolement des cellules CD36-positives à partir des papilles caliciformes

Les cellules CD36-positives ont été isolées comme décrit par Gaillard *et coll.*, (2008); El Yassimi *et coll.*, (2008). Brièvement, l'épithélium lingual a été détaché par un mix enzymatique de dispase et d'élastase (respectivement 2mg/mL de tyrode complet) dans une solution de tampon tyrode sans calcium [140 mM NaCl, 5 mM KCl, 10 mM HEPES, 2Mm EGTA, 10 M Na-Pyruvate et 10 Mm glucose; pH7,4]. Les cellules CD36-positives ont été isolées en incubant l'épithélium lingual dans du milieu RPMI 1640 complet additionné de 2 mM d'EDTA, 150 µL de collagénase (1,2 mg/mL), 150 µL élastase (1,2mg/mL), 150 µl de collagénase/dispase Roche (6µg/ml) et 50µL inhibiteur de trypsine (0,6mg/ml)] à 37°C pendant 10 mn. Les différentes populations de cellules collectées à partir des papilles caliciformes ont été incubées avec un anticorps anti-CD36 couplé à la phycoérythrine dans un tampon PBS pendant deux heures puis centrifugées (600 x g ; 10 min) et re-suspendues dans une solution contenant des microbilles couplées avec un anticorps anti-phycoérythrine IgG. Les cellules CD36 positives (CD36⁺) ont été isolées, formant des complexes cellules-anticorps anti-CD36-Phycoérythrine-anti-phycoérythrine-microbilles dans une colonne du système magnétique de Miltenyi. Les cellules CD36 négatives (CD36⁻) sont celles qui ne subissent pas la force magnétique.

Western blot

Après l'isolement, les cellules CD36⁺ ont été traitées par l'acide linoléique durant différents temps et à différentes concentrations (0-30µM) pour déterminer les paramètres de phosphorylation des MAPK. Les cellules (1x10⁶ cellules/ml) ont été lysées avec 800µl d'un tampon de lyse froid (20 mM d'HEPES (pH 7,4), 2 mM d'EDTA, 125 mM de NaCl, 1 mM de DTT, 1mM d'orthovanadate de sodium, 0,5 mg/ml de benzamidine, 1% de NP40), le tout en présence des inhibiteurs de protéases

Chapitre II : Liste des Publications et Communications

(1mM de phénylméthylsulfonyl fluoride, 10 µg/ml d'aprotinine, 2,5 µg/ml de pepstatine, et 5 µg/ml de leupeptine). Les lysats ont été centrifugés (600 x g ; 10 min) et les protéines ont été séparées dans un gel SDS-acrylamide (8%). Puis elles ont été transférées sur une membrane PVDF qui a été incubée avec les anticorps primaires (dilution: 1/1000) dirigés contre les différentes Kinases qui sont impliquées en amont et en aval des trois familles des MAPK. Ensuite, la membrane a été lavée avec TBS/tween-20 (0,05%), incubée avec l'anticorps secondaire (anti-lapin) couplée à une peroxidase (dilution: 1/1000). La révélation a été faite grâce à une solution de révélateur et de fixateur.

RT-qPCR.

Les ARNm totaux des cellules exprimant le CD36 et des cellules contrôles ont été extraits par le trisol (Invitrogen technologies Groningen, The Netherlands) suivis d'un traitement par ADNase sans ARNase (Kit Qiagen). L'ADNc de chaque gène étudié a été produit à partir de 1 µg des ARNm totaux par Transcription Réverse (Super Script II RNase H-Reverse Transcriptase) en utilisant des oligo (dT) selon les instructions du fabricant (Life Technologies, Groningen, The Netherlands). La technique de PCR en temps réel a été réalisée avec le système de détection en temps réel, Icyler IQ (Biorad). L'amplification a été effectuée en utilisant la détection avec le Syber green I. Le choix des amorces utilisées pour l'analyse des ARNm a été basé sur les séquences des gènes de souris dans les données de base des gènes (Tableau1). L'amplification a été effectuée dans un volume total de 25µl composé de 12,5µl de tampon supermix de SYBER Green (50mM KCl, 20mM Tris-HCl (pH 8,4), 3 mM MgCl₂, 0,2 mM de chaque DNTPs, 0,63 U iTaq ADN polymérase, SYBER Green 1nM fluoresein), 12,5 µl (0,3µM) de chaque amorce sens et anti-sens et l'ADNc dilué. Les niveaux d'expression des ARNm des enzymes: la tryptophane hydroxylase (TPH1), l'acide amino-L-aromatique décarboxylase (AADC), la tyrosine hydroxylase, et la dopamine B-hydroxylase (DBH) ont été normalisés par rapport à la quantité d'ARNm de B-actine. Les produits de l'amplification des ADNs des gènes étudiés ont été séparés sur un gel d'agarose à 1,5% (0,7g d'agarose, 1ml de TAE 50 fois concentré, 49 ml d'eau stérile et 5 µl du BET).

Gènes	Amorce Sens	Amorce Anti-Sens
<i>Zif268</i>	5'-GCGAACAACCTATGAGC-3'	5'-GGTCGGAGGATTGGTC-3'
<i>BDNF</i>	5'-TTGGATGCCGCAAACATGTC-3'	5'-CTGCCGCTGTGACCCACTC-3'
<i>Glut1</i>	5'-GCTGTGCTTATGGGCTTCTC-3'	5'-CACATACATGGGCACAAAGC-3'
<i>TPH-1</i>	5'-GAGTTGCTCCACGCTTTC-3'	5'-ACACTCAGTCTACATCCATCCC-3'
<i>TH</i>	5'-AAGCTGATTGCAGAGATTGCC-3'	5'-TTCTCCTTTGTGTATCCACGT-3'
<i>BDH</i>	5'-GAGAGCCCCTTCCCCTACC-3'	5'-TGGAGCTGGAAGTGGATGACT-3'

Chapitre II : Liste des Publications et Communications

<i>β-Actine</i>	5'-CACCTGTGCTGCTCACC-3'	5'-GCACGATTCCCTCTCAG-3'
<i>ERK1</i>	5'- TGCTGGACCGGATGTTAACC -3'	5'- CCAGCGCTTCCTCTACTGTGA-3'
<i>ERK2</i>	5'- GCTGAAGCGCCATTCAAGTT -3'	5'- ACTTACACCATCTCTCCCTTGC -3'
<i>PLCb</i>	5'- GGCTTGAGTTCATCGTCATT -3'	5'- ACTCCCCCTGTCTTTTCTTA -3'
<i>CD36</i>	5'-GGCCAAGCTATTGCGACATG-3'	5'- CCGAACACAGCGTAGATAGAC -3'
<i>α-gustudine</i>	5'- ACACATTGCAGTCCATCCTAGC -3'	5'- ATCACCATCTTCTAGTGTATTTGCC-3'
<i>cFos</i>	5'-ACTTCTGTTTCCGGC-3'	5'-AGCTTCAGGGTAGGTG-3'

Tableau 1: Séquences des amorces utilisées pour l'étude de l'expression des ARNm de différents gènes.

Transfection des cellules par SiRNA

Les cellules CD36-positives ont été transfectées selon les instructions fournies dans le kit (Dharmafect), avec le siRNA (25 nM) conçu pour bloquer les ARNm de CD36, ERK1 et 2.

<i>Si RNA CD36</i>	Séquence: 5'-AAACCCAGAUGACGUGGCAAUU-3'
<i>Accell Si RNA ERK1</i>	Accession numbers : NM_11952
<i>Accell Si RNA ERK2</i>	Accession numbers : ERK2 : NM_11949

Vingt-quatre heures avant le traitement, les cellules (1×10^6 cellules/ml) ont été placées dans le milieu de culture RPMI-1640 (10 % SVF) et sans antibiotique puis transfectées avec le siRNA en utilisant Dharmafect (Dharmacon) selon les instructions fournies avec le kit. Après 72 heures d'incubation, le milieu a été aspiré et remplacé par du milieu frais sans siARN pendant 24 heures avant les westerns blot. Nous avons obtenu environ 85% de cellules viables après la transfection par le kit de Dharmacon. Pour l'étude in vivo des siRNA Accell ont été injectés localement.

Libération de la sérotonine

Les cellules CD36⁺ ont été chargées avec de la sérotonine radioactive ³H-5HT (2 mCi / 3×10^8 cellules) pendant 1 heure dans le tampon d'incubation contenant (en mM): 40 Tris-HCl (pH 7,4), 25 de glucose, 5 KCl, 150 NaCl; 1,5 CaCl₂; 1,4 MgSO₄; 1,2 et 0,1 ascorbate aminooxyacétique à 37°C. À la fin de l'incubation, les cellules ont été lavées par centrifugation (2000 x g, 5 mn) dans un tampon de lavage (en mM): NaCl 150, KCl 5, 1,2 MgSO₄, 1,0 ascorbate, du glucose à 10, et 1,3 EGTA. Puis, les cellules ont été remises en suspension dans un tampon de sortie contenant de la clorgyline (100 uM) et de la pargyline (100 uM) afin de bloquer le métabolisme de la sérotonine. La composition du tampon de sortie était identique à la solution de lavage, à quelques exceptions: les 2 mM de CaCl₂ ont été remplacées par MgSO₄, EGTA a été supprimé, la concentration de NaCl a été réduite à 75 mM, et les cellules ont été distribuées dans de nouveaux

Chapitre II : Liste des Publications et Communications

tubes, puis traitées avec LA en la présence ou absence de SSO pendant 30 mn. Après centrifugation, la radioactivité dans le surnageant et le culot a été déterminée. La libération de la sérotonine a été calculée en déterminant le pourcentage de cellules non stimulées. Pour cela, la radioactivité dans le surnageant a été divisée par la radioactivité dans le culot, pour chaque essai (Dramane *et coll*, 2012).

Le test de double choix

D'une durée égale à 12 heures, ce test consiste à proposer à une souris en cage, deux biberons contenant deux solutions différentes. Une acclimatation est nécessaire au préalable pour une meilleure réaction aux solutions lors des expériences. Elle consiste à apprendre aux animaux l'existence de deux possibilités en leur offrant simultanément deux biberons à contenances égales ou différentes pendant plusieurs jours. La place des biberons est permutée de manière à éviter un conditionnement ou une aversion pour un côté.

Pour étudier la préférence, une solution de xanthane à 0,1 % a été utilisée comme solution contrôle afin de mimer la texture des lipides. A cette solution a été additionné de l'acide linoléique à 0,2 % (solution expérimentale). Le double choix entre la solution contrôle et la solution expérimentale a été réalisée sur 12 heures. Chaque biberon a été pesé au début et à la fin de l'expérience et la consommation de chaque solution (en g) a été calculée. Les animaux sont repartis par groupe de cinq. Le test a été réalisé en période nocturne. Ces expériences ont été reproduites au moins trois fois.

Etudes statistiques

L'analyse statistique a été effectuée par l'utilisation d'un logiciel STATISTICA 4.1. La signification des différences entre des valeurs moyennes a été déterminée par analyse de variance (variance one way) suivie du test LSD (least-significant-difference). Les différences sont considérées comme significatives lorsque $p < 0,5$.

Resultats

LA induit la phosphorylation des ERK1/2 via le CD36

Nous avons isolé des cellules caliciformes de souris, puis nous avons traité ou non par LA à durée variable. Nous avons réalisé un western blot avec le lysat cellulaire, et fait une révélation avec des anticorps anti P-ERK1/2 et ERK1/2 totaux. Les résultats sont présentés sur la Figure 1A. Après 5 mn de traitement par LA, le taux de phosphorylation des ERK1/2 a rapidement augmenté, il était 5 fois plus important que dans le contrôle puis ce taux a décliné lentement mais était encore 4 fois plus important à 15 mn, et 2 fois plus important à 30 mn.

Pour déterminer si ce phénomène est CD36-dépendant, nous avons réalisé un nouveau western blot à partir de cellules stimulées ou non avec LA, ou avec LA après avoir été transfectées avec des SiRNA qui bloquent l'expression des CD36 (Figure 1B). Nous observons que le taux des ERK1/2 phosphorylés est 4 fois plus important après 10 mn de stimulation par LA, et en présence de ARNs anti CD36 l'effet du LA est aboli. Une baisse de la phosphorylation des ERK1/2 en présence de cette SiRNA signifie que cette phosphorylation est CD36-dépendante.

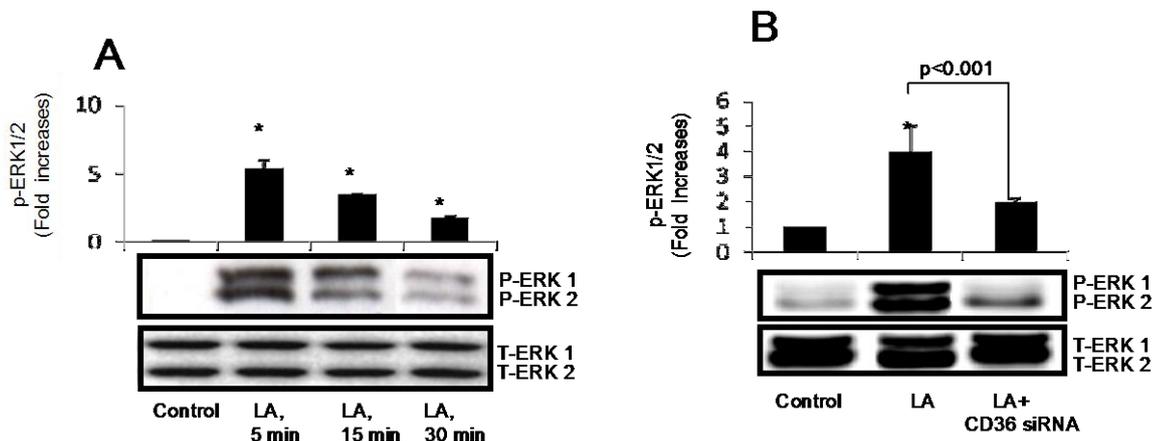


Figure 1: Effet de LA sur la phosphorylation des ERK1/2 dans les cellules CD36-positives de souris. Les cellules CD36 positives et négatives sont isolées suivant des digestions enzymatiques puis purifiées sur une colonne Miltenyi en présence d'anticorps couplés à des billes magnétiques. La figure représente la détection des protéines ERK1/2 par Western blot dans les cellules stimulées ou non par LA (20µM) à 5, 15, et 30 mn en A et, dans les cellules transfectées par soit l'ARN (contrôle) ou par les siRNA de CD36 en B. Les astérisques représentent les différences significatives en comparaison des contrôles (non traités par LA, p<0.001) (n=5).

LA phosphorylation des ERK1/2 passe par MEK1/2

D'après les connaissances actuelles sur les voies des MAP Kinases, la phosphorylation des ERK1/2 est toujours précédée par celle de MEK1/2 (Lewis *et coll.*, 1998). Nous avons, pour le confirmer, réalisé un western blot à partir de cellules CD36-positives (Figure 2A). Le western blot montre qu'en présence de LA, le taux de phosphorylation des MEK1/2 est augmenté significativement par rapport au contrôle, un inhibiteur de MEK1/2 (U0126) abolit cette réponse. Le même constat peut être fait avec ERK1/2. Les résultats obtenus ont été mis sous forme d'histogramme (Figure 2B). En effet, le taux de phosphorylation des ERK1/2 augmente d'un facteur 2, et MEK1/2 de facteur 3 en présence de LA. En présence de LA et de U0126, la réponse de MEK1/2 est abolie et celle des ERK1/2 divisée par 2.

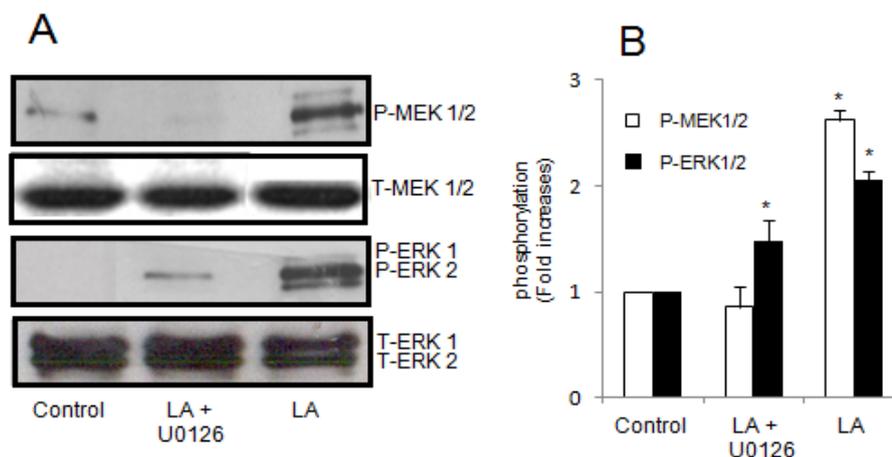


Figure 2: LA induit la phosphorylation de MEK1/2 en amont des ERK1/2 dans les cellules CD36-positives. A : représente la détection des protéines MEK1/2 et ERK1/2 par Western blot dans les cellules stimulées ou non par LA (20 μ M) en présence de U0126 pendant 10 mn. B : montre la densitométrie des Western blots de la Figure A. Les astérisques représentent les différences significatives en comparaison de contrôles respectifs ($p < 0.001$) ($n=3$).

LA induit la phosphorylation du facteur de transcription ELK-1 de manière CD36-dépendante

Nous avons établi les différents éléments de la cascade des ERK, en amont et en aval, qui pourraient être impliqués dans la signalisation cellulaire activée par LA (Lewis *et coll.*, 1998). Nous avons réalisé un western blot avec les anticorps anti P-raf-1 (Figure 3A).

Ce western blot ne montre aucune différence significative de l'expression des protéines P-c-raf traitées ou non avec du LA, même après 15 mn. La même expérience a été faite avec P-P90RSK, un facteur de transcription en aval des ERK1/2 (Figure 3B). Cette fois encore il n'y a pas de différence significative entre les cellules traitées ou non avec LA. Nous avons ensuite étudié le facteur de transcription ELK-1 (Figure 3C). Ce blot montre que l'expression des protéines ELK-1 phosphorylées double lorsque les CD36+ sont traitées avec LA pendant 10 mn. Pour confirmer les résultats de la Figure 4C, le western blot a été refait, mais cette fois un contrôle à été ajouté, certaines cellules ont été transfectées avec le CD36 SiRNA (Figure 3D). Un résultat identique est obtenu, il permet, de plus, de constater que l'inactivation de l'expression des récepteurs CD36 annule l'augmentation de la phosphorylation de ELK-1 déclenchée par LA. Le mécanisme de phosphorylation de ELK-1 est donc CD36 -dépendant.

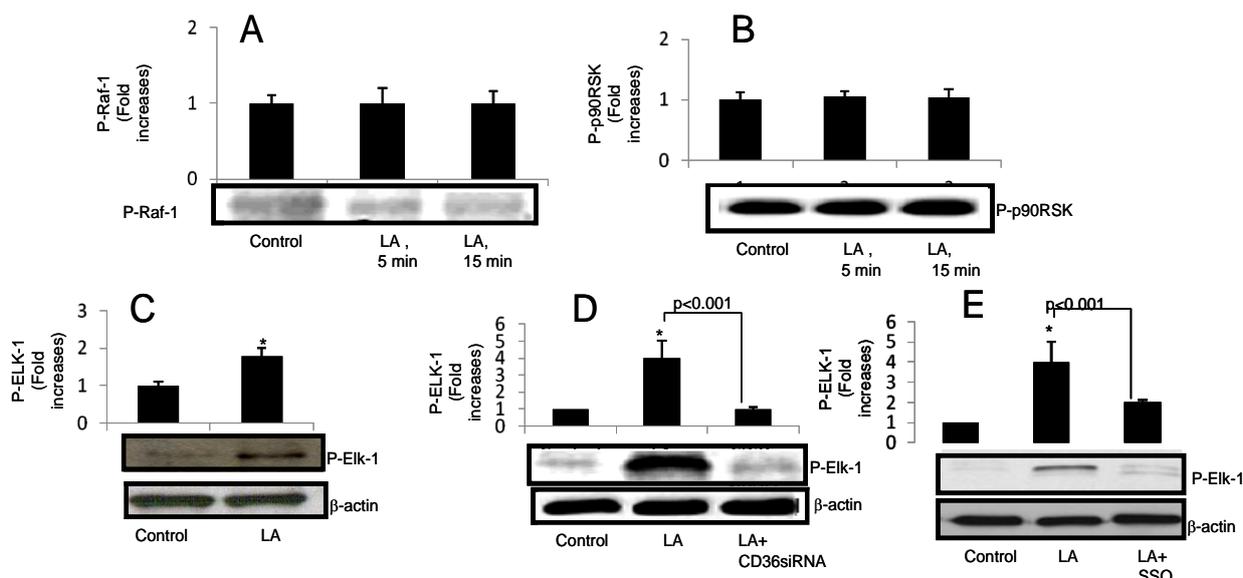


Figure 3: Protéines phosphorylées en amont et en aval des ERK1/2 dans les cellules CD36-positives. La figure représente la détection des protéines c-Raf-1, p-90RSK et, Elk-1 par Western blot. **A**, **B** et **C**: les cellules sont stimulées ou non par LA (20 μ M). **D**: Les cellules sont transfectées par CD36 SiRNA puis stimulées ou non stimulées par LA (20 μ M). **E**: Les cellules sont stimulées ou non stimulées par LA (20 μ M). en présence de SSO. Les astérix représentent les différences significatives en comparaison de contrôles respectifs (p<0.001) (n=4).

Vav2 semble impliquée dans la cascade de signalisation

Toujours dans le but d'identifier les différents éléments entrant en jeu dans la réponse des cellules gustatives à LA, nous avons étudié par western blot l'état de phosphorylation de Vav1 et Vav2, deux protéines en amont de Raf-1/MEK1/2 (Figure 4A et B). Le western blot ne montre pas une phosphorylation significative après 10 mn de traitement par LA de Vav1. Seule Vav2 est phosphorylée *via* CD36 car l'utilisation de SSO diminue sa phosphorylation.

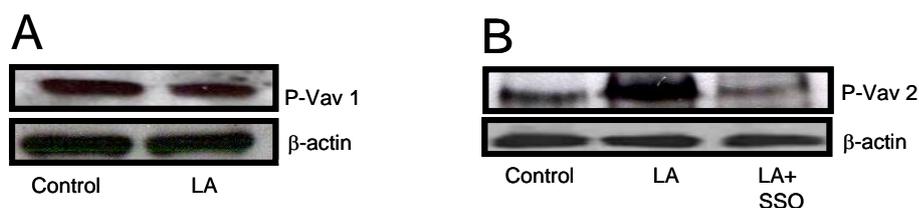


Figure 4: Effet de LA sur la phosphorylation des protéines Vav1 et Vav2 dans cellules CD36-positives. **A**: représente le taux de phosphorylation relative de la protéine Vav1 dans les cellules stimulées ou non par LA (20 μ M) déterminé par Western blot. **B**: Les données représentatives de la teneur en protéines de Vav2 dans les cellules stimulées ou non par LA en présence ou non de SSO. Les données représentent la moyenne \pm SEM (n =5).

ERK1/2 sont impliqués dans la perception lipidique

A partir des résultats précédents, on peut supposer que ERK1/2 jouent un rôle primordial dans la perception gustative des lipides. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons d'abord caractérisé nos souris pour montrer qu'elles présentent un phénotype normal comme le montre les

Figure 5A, B et C pour certains de nos gènes cibles. Ensuite, des souris *ERK1*^{-/-} et WT ont été soumises à un test de préférence à double choix. Comme prévu, les souris WT ont montré une forte préférence pour la solution enrichie en LA (0,2%), plutôt qu'une solution de paraffine Figure 5D.

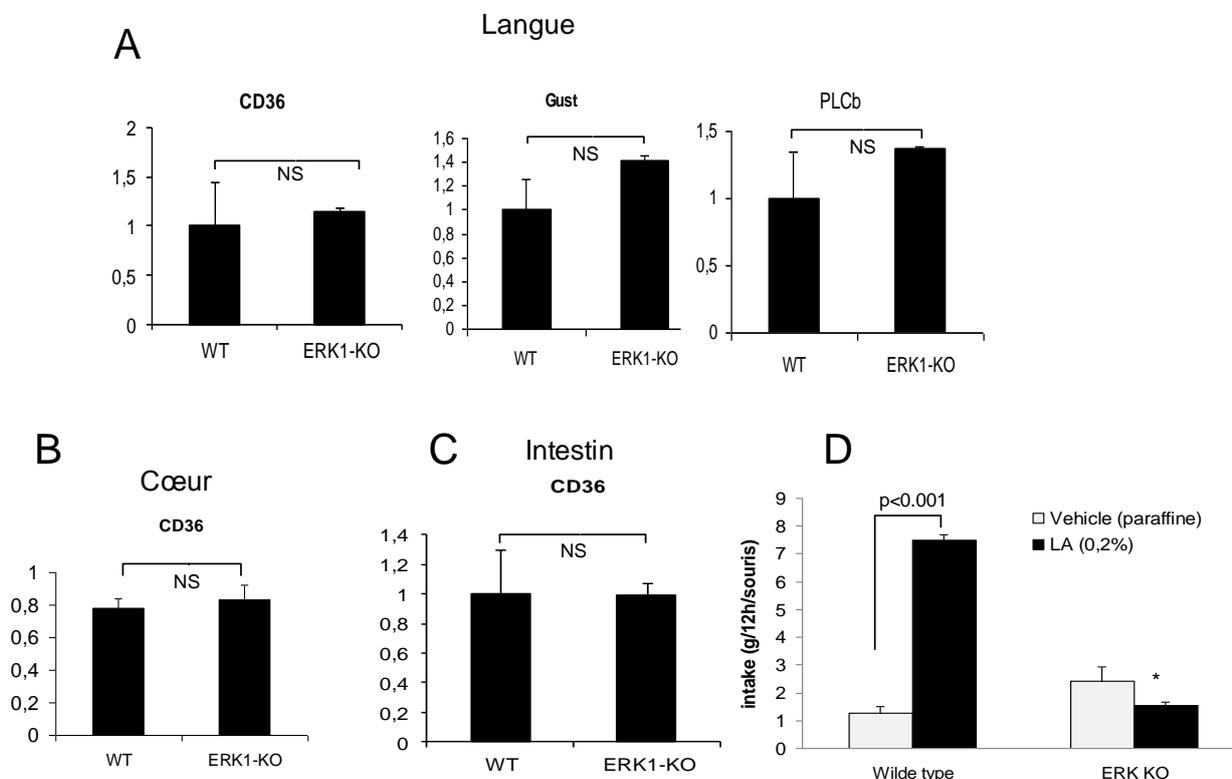


Figure 5: Effet de l'inactivation du gène ERK1 sur la préférence gustative pour les lipides chez la souris. A : représente l'expression des ARNm des gènes CD36, α -gustudine, et PLCb dans la papilles caliciforme. L'expression de CD36 dans le cœur en B et, dans l'intestin en C. D: les souris de type sauvage et *ERK1*^{-/-} ont été soumises à 12 heures de test de préférence à double choix. La paraffine a été utilisée pour mimer pour la texture des lipides. $p < 0,001$ indique la différence significative par rapport à la solution contrôle chez les animaux wilde type (WT). * montre le manque de préférence pour LA chez les animaux ERK1-KO par rapport aux animaux contrôles. NS : pas de différence significative constatée entre les deux groupes. Les données représentent la moyenne \pm SEM (n = 6).

Effet de l'application de LA sur l'activation des gènes et la phosphorylation de MEK et ERK

En voulant confirmer ces résultats précédemment décrits concernant l'activation des MAPK par LA, nous avons entrepris cette étude *in vivo* qui consistait à déposer une goutte de LA sur la langue plus précisément sur la papille caliciformes deux fois à intervalle de 30 mn et puis étudier l'activation des MAPK dans ce processus. Les résultats montrent, qu'en présence de LA, le taux de phosphorylation des MEK1/2 et des ERK1/2 augmente par rapport au contrôle. Et ce dépôt de LA sur la langue n'affecte pas l'expression de CD36, de gustudine et de PLCb.

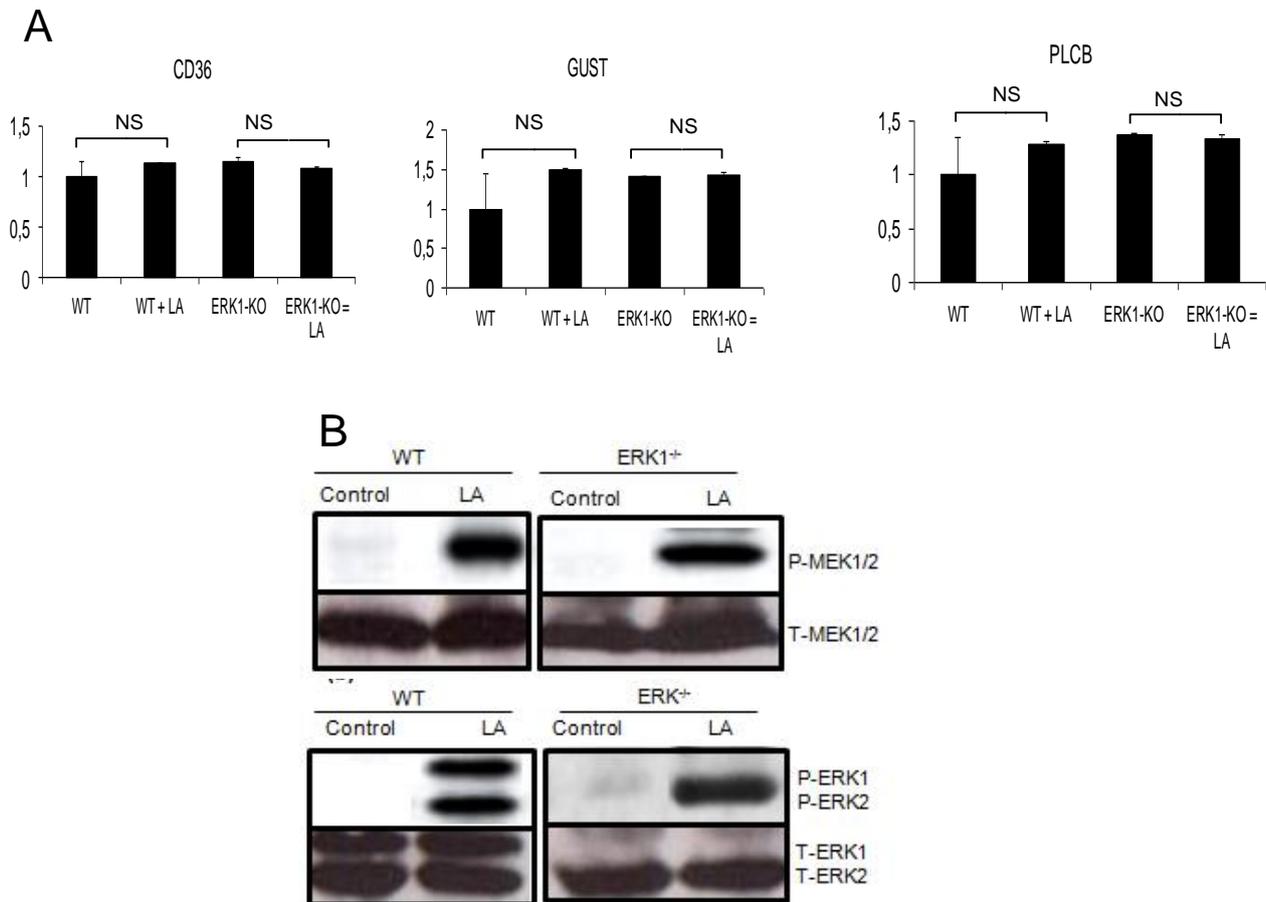


Figure 6 : Effet de l'application de LA sur la papille caliciforme chez la souris sauvage et ERK1-KO : **A** : montre l'expression des ARNm des gènes CD36, α -gustudine, et PLCb dans la papille caliciforme des souris sauvages et ERK1-KO. **B** : représente le niveau de phosphorylation des protéines MEK1/2 et ERK1/2 après application de LA sur la papille caliciforme des souris sauvages et ERK1-KO. NS : pas de différence significative constatée entre les deux groupes. Les données représentent la moyenne \pm SEM (n = 6).

Le NTS, l'hippocampe et le noyau arqué sont activés par l'application linguale du LA

Afin de mettre en évidence l'activation de ces trois aires cérébrales lors de l'application linguale des lipides, nous avons étudié l'expression des ARNm de trois gènes.

Zif-268

Le Zif-268 est un facteur de croissance qui est impliqué dans la plasticité neuronale et dans l'apprentissage et dans la mémoire à long terme. Dans le cerveau, son expression est induite par l'augmentation des ions calcium dans le neurone. Il a été démontré que ce gène est hautement exprimé lors de la mémorisation (Bozon *et coll.*, 2002). On se demande alors ce qui se passe lors de la perception du goût du gras chez les souris ERK1^{-/-} en comparaison aux souris sauvages. La

Figure 7 montre l'expression du *Zif-268* lors de l'application linguale du LA chez les souris *ERK1*^{-/-} et chez les souris sauvages.

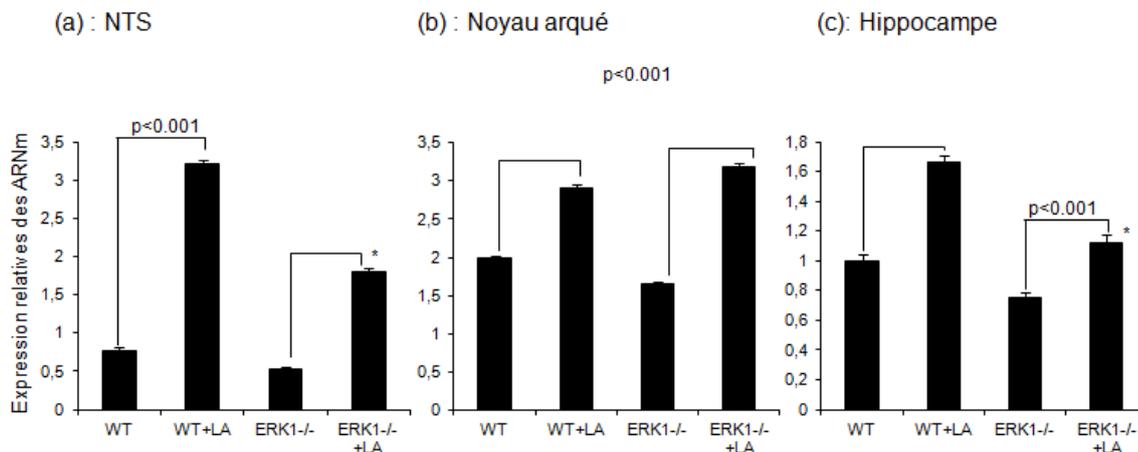


Figure 7 : Expression de l'ARNm du gène *Zif-268* dans les aires du cerveau à la suite de l'application de LA sur la papille caliciforme des souris sauvages et *ERK1*-KO. a : montre l'expression des ARNm des gènes *Zif268* dans le NTS, b) dans le noyau arqué et, c) dans l'hippocampe des souris sauvages et *ERK1*-KO. Les expériences ont été reproduites au moins trois fois. * montre la différence significative entre de stimulation de LA chez les animaux *ERK1*-KO par rapport aux animaux contrôles ($p < 0,001$). Les données représentent la moyenne \pm SEM ($n = 6$).

En effet, dans ces trois aires, on remarque une augmentation de l'expression du *Zif-268* aussi bien chez les souris *ERK1*^{-/-} que chez les souris sauvages en présence de LA. Cette augmentation de l'expression du *Zif-268* par LA est plus induite dans le NTS et l'hippocampe des souris sauvages en comparaison aux souris *ERK1*^{-/-}. Dans le noyau arqué, il n'y a pas de différence significative de l'expression du *Zif-268* entre les souris sauvages et les souris *ERK1*^{-/-} après application du LA. En présence du LA, les aires cérébrales des souris sauvages sont plus activées que celles des souris *ERK1*^{-/-}.

BDNF

Le *BDNF* est une protéine qui agit sur les neurones du SNC. Il est nécessaire à l'apprentissage du goût et la mémoire à long terme, sa suppression entraîne la perte du goût chez la souris (Wang *et coll.*, 2007). La Figure 6 décrit l'expression du *BDNF* lors de l'application linguale du LA chez des souris *ERK1*^{-/-} en comparaison avec les souris sauvages.

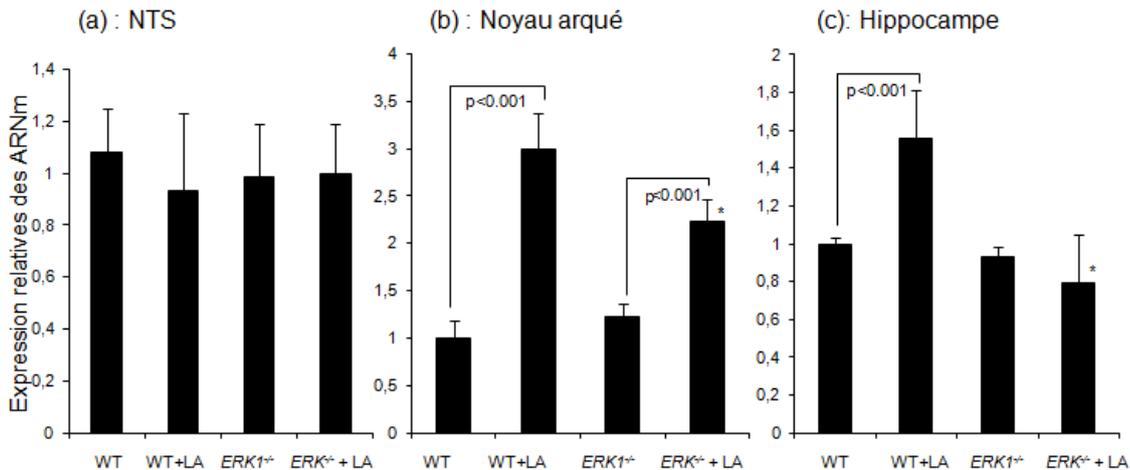


Figure 8: Expression de l'ARNm du gène *BDNF* dans les aires du cerveau à la suite de l'application de LA sur la papille caliciforme des souris sauvages et *ERK1-KO*. **a** : montre l'expression des ARNm des gènes *Zif268* dans le NTS, **b**) dans le noyau arqué et, **c**) dans l'hippocampe des souris sauvages et *ERK1-KO*. Les expériences ont été reproduites au moins trois fois. * montre la différence significative entre de stimulation de LA chez les animaux *ERK1-KO* par rapport aux animaux contrôles ($p < 0,001$). Les données représentent la moyenne \pm SEM ($n = 6$).

Les résultats montrent que la perception gustative lipidique induit l'expression du *BDNF* dans le noyau arqué des souris sauvages et des souris *ERK1^{-/-}*. En effet, dans cette aire, l'expression du *BDNF* passe de 1 à 3 chez les souris sauvages alors qu'elle passe de 1,2 à 2,2 chez les souris *ERK1^{-/-}*. Dans le NTS, l'expression du *BDNF* n'a pas changé après application du LA. Au niveau de l'hippocampe, l'expression du *BDNF* n'a augmenté que chez les souris sauvages (elle passe de 1 à 1,5), la variation n'est pas significative chez les souris *ERK1^{-/-}*. L'application du LA stimule donc l'expression du *BDNF* dans le noyau arqué et l'hippocampe chez les souris sauvages. Chez les souris *ERK1^{-/-}*, le *BDNF* a été stimulé uniquement dans le noyau arqué (Figure 8).

Glut1

Le *Glut1* est un transporteur du glucose dont la présence au niveau du cerveau reflète l'intensité de l'activité cérébrale. Choeri *et coll.*, (2005), ont démontré qu'il améliore la mémoire et l'apprentissage d'autant plus que sa quantité est élevée car l'activation neuronale exige une forte demande en glucose. La Figure 7 montre les résultats de son expression dans les aires cérébrales des souris sauvages et *ERK1^{-/-}*.

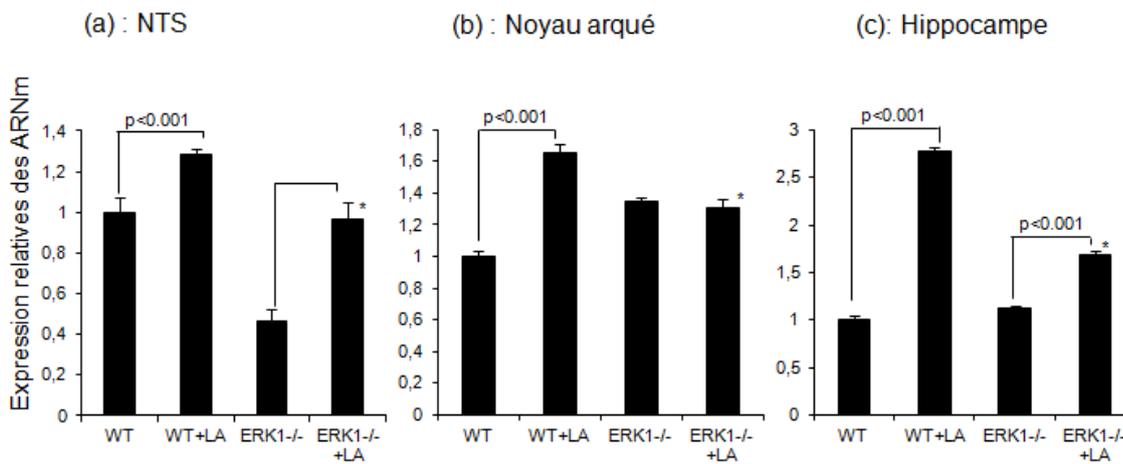


Figure 9: Expression de l'ARNm du gène *Glut1* dans les aires du cerveau à la suite de l'application de LA sur la papille caliciforme des souris sauvages et ERK1-KO. a : montre l'expression des ARNm des gènes *Zif268* dans le NTS, b) dans le noyau arqué et, c) dans l'hippocampe des souris sauvages et ERK1-KO. Les expériences ont été reproduites au moins trois fois. * montre la différence significative entre de stimulation de LA chez les animaux ERK1-KO par rapport aux animaux contrôles ($p < 0,001$). Les données représentent la moyenne \pm SEM ($n = 6$).

La Figure 9 montre que le *Glut1* est stimulé par le LA aussi bien chez les souris sauvages que chez les souris *ERK1^{-/-}*. Cependant, il est à noter que l'expression des ARNms du *Glut1* dans le noyau arqué, à la suite de l'application du LA, est passée de 1 à 1,7 chez les souris sauvages alors qu'elle n'a pas varié chez les souris *ERK1^{-/-}*. Dans l'hippocampe, cette expression est passée de 1 à 2,8 chez les souris sauvages alors qu'elle est passée de 1,1 à 1,7 chez les souris *ERK1^{-/-}*. A la suite de la stimulation par le LA, le *Glut1* est plus induit chez les souris sauvages que chez les souris *ERK1^{-/-}*.

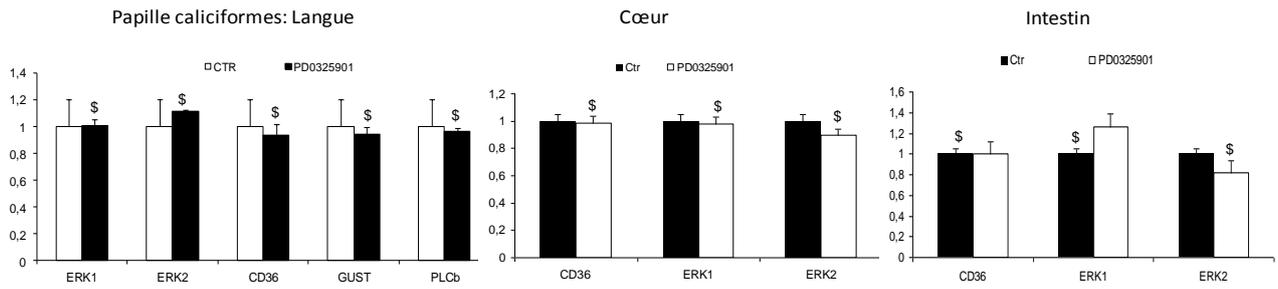
En conclusion, l'expression du *Zif-268*, du *BDNF* et du *Glut1* est induite par le LA chez les souris sauvages et *ERK1^{-/-}* dans les trois aires cérébrales. Mais, ces gènes sont plus exprimés chez les souris sauvages que chez les souris *ERK1^{-/-}*. Aussi, on a remarqué une faible activation des gènes dans l'hippocampe des souris *ERK1^{-/-}* en comparaison des souris sauvages.

Effet de PD0325901, inhibiteur de MEK sur la perception gustative

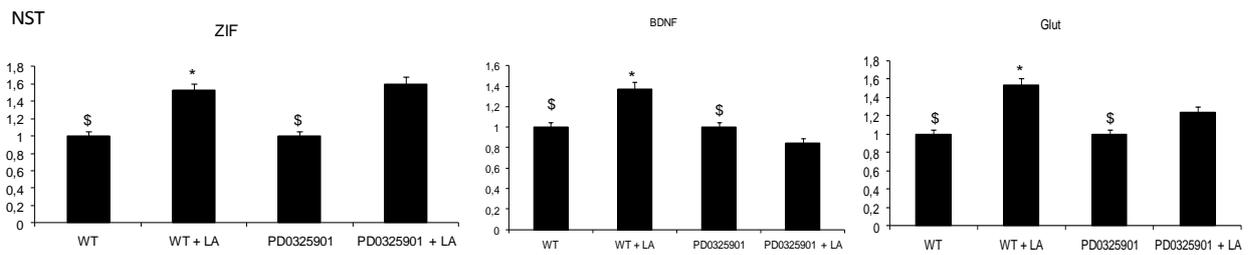
Pour confirmer ces résultats nous avons utilisés une approche qui est l'inhibition des ERK1/2 par l'utilisation d'un produit chimique des MEK (protéine activateur d'ERK1/2) (Henderson et coll., 2010), le PD0325901. Les animaux ont été gavés pendant une semaine par PD0325901 (20mg/kg/jour). Nos observations précédentes ont été confirmées par le PD0325901.

Chapitre II : Liste des Publications et Communications

A

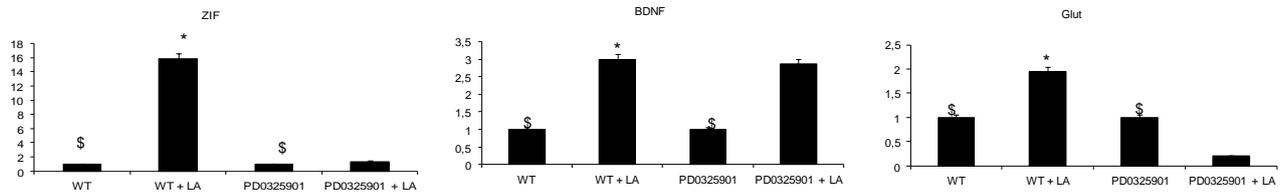


B



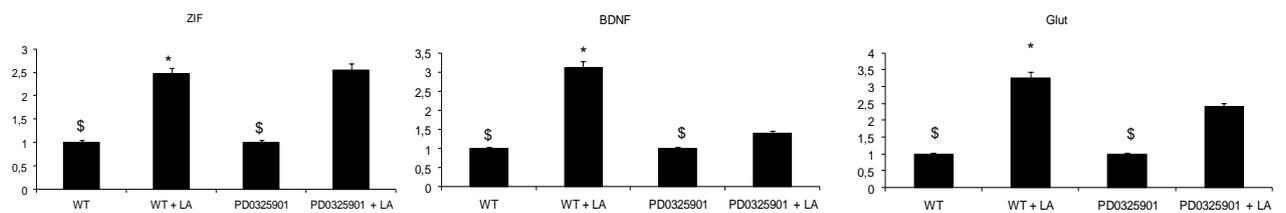
C

Noyau arqué

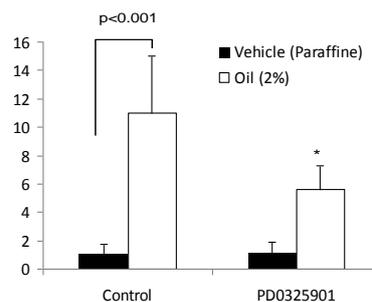


D

Hippocampe



E



Chapitre II : Liste des Publications et Communications

Figure 10 : Effet de PD0325901 sur la perception gustative. Les animaux ont été gavés ou non pendant une semaine par PD0325901 (20mg/Kg/jour) dissous dans tampon de citrate (pH 7, 80 mmol/L). **A** : représente l'expression des ARNm des gènes ERK1, ERK2, CD36, α -gustudine et PLC β en présence ou non de PD0325901 et de LA dans les papilles caliciformes de la langue, le cœur et l'intestin. **B, C, D** : représente chacun l'expression des ARNm des gènes Zif, BDNF, et Glut-1 en présence ou non de PD0325901 et de LA dans NTS, le NA et l'Hippocampe respectivement. **E** : L'effet de PD0325901 sur la préférence lipidique. * montre une différence significative ($p < 0,001$) des animaux traités par LA et/ou PD0325901 par rapport aux animaux contrôles. \$: pas de différence significative constatée entre les deux groupes. Les données représentent la moyenne \pm SEM (n = 6).

Effet d'administration ERK1/2 siRNA Accell dans la papille circumvallate

Une approche *in vivo* a été utilisée pour confirmer ces résultats qui est l'inhibition des ERK1/2 par 2 par l'administration sur la langue du siRNA Accell (Nakajima *et coll.*, 2012). Nous observons les mêmes résultats obtenus soit par les animaux ERK1-KO soit par le PD0325901.

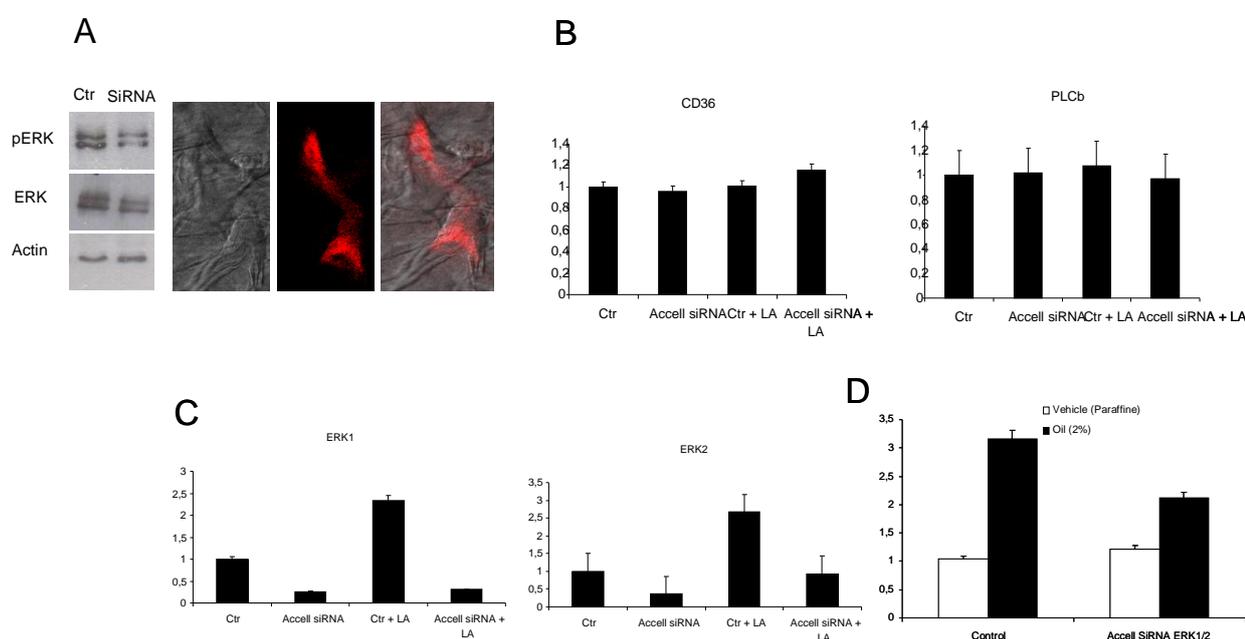
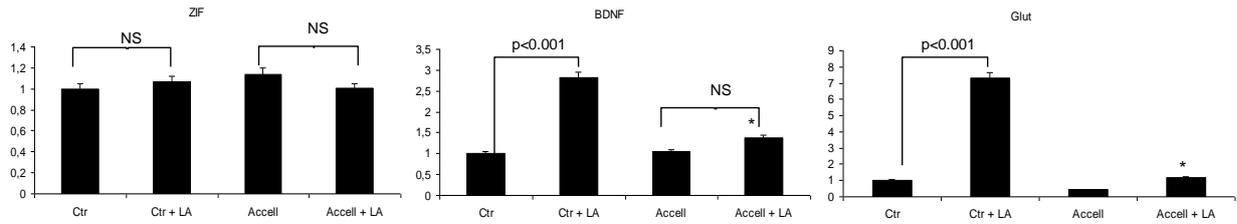


Figure 11 : Effet de Accell siRNA d'ERK1/2 sur la perception gustative. Accell siRNA d'ERK1/2 ou Accell siRNA contrôle (0,5 μ g/souris dans 5 μ l) a été injecté dans la papille caliciforme des souris pendant 72H. **A** : montre les papilles caliciformes injectées par Accell siRNA contrôle détecté par Western blot et visualisées sous microscope confocal en utilisant un Non-target fluorescent. **B** : représente l'expression des ARNm des gènes CD36 et PLC β en présence ou non d'Accell siRNA d'ERK1/2 et de LA dans les papilles caliciformes de la langue. **C** : représente l'expression des ARNm des gènes ERK1/2 en présence ou non d'Accell siRNA ERK1/2 et de LA dans les papilles caliciformes de la langue. **D** : l'effet de Accell siRNA d'ERK1/2 sur la préférence lipidique. * montre une différence significative ($p < 0,001$) des animaux traités par LA et/ou Accell siRNA ERK1/2 par rapport aux animaux contrôles. \$: pas de différence significative constatée entre les deux groupes. Les données représentent la moyenne \pm SEM (n = 6).

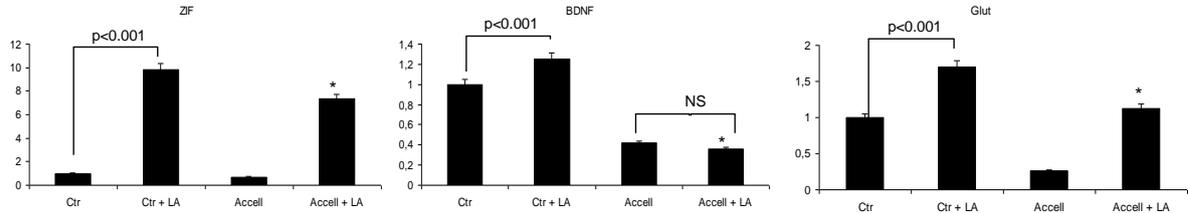
Effet d'administration ERK1/2 siRNA Accell dans la papille circumvallate sur l'activité cérébrale

L'administration sur la langue du siRNA Accell (Nakajima *et coll.*, 2012) nous a permis aussi d'observer les mêmes résultats obtenus avec les animaux ERK1-KO et le PD0325901.

NST



Noyau arqué



Hippocampe

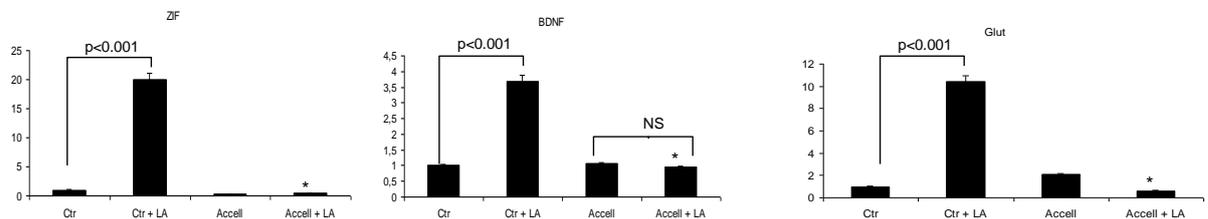


Figure 12 : Effet d'ERK1/2 siRNA Accell sur l'activité cérébrale. Accell siRNA d'ERK1/2 ou Accell siRNA contrôle (0,5µg/souris dans 5µl) a été injecté dans la papille caliciforme des souris pendant 72H. La figure 12 montre l'expression des ARNm des gènes Zif268, BDNF et de Glut1 dans les papilles caliciformes après injection par Accell siRNA contrôle Accell siRNA d'ERK1/2 par RT-qPCR dans le NTS, NA et l'hippocampe. **p<0,001** et * montrent une différence significative des animaux traités par LA et/ou Accell siRNA ERK1/2 par rapport aux animaux contrôles. **NS** : pas de différence significative constatée. Les données représentent la moyenne ± SEM (n = 6).

LA active différentes enzymes nécessaires à la synthèse des monoamines biogènes et la libération de la sérotonine via la cascade des ERK1/2.

De précédentes expériences ont déjà établi que les cellules gustatives communiquaient avec le système nerveux par dépolarisation et libération de neurotransmetteurs. Un lien clair entre la stimulation des cellules gustatives par LA et la libération de la sérotonine a déjà été établi dans de précédents travaux (El-Yassimi *et coll*, 2008). La Figure démontre les enzymes impliquées dans la synthèse de la sérotonine et de la noradrénaline.

Synthèse de la Sérotonine (5-HT) et de la Noradrénaline

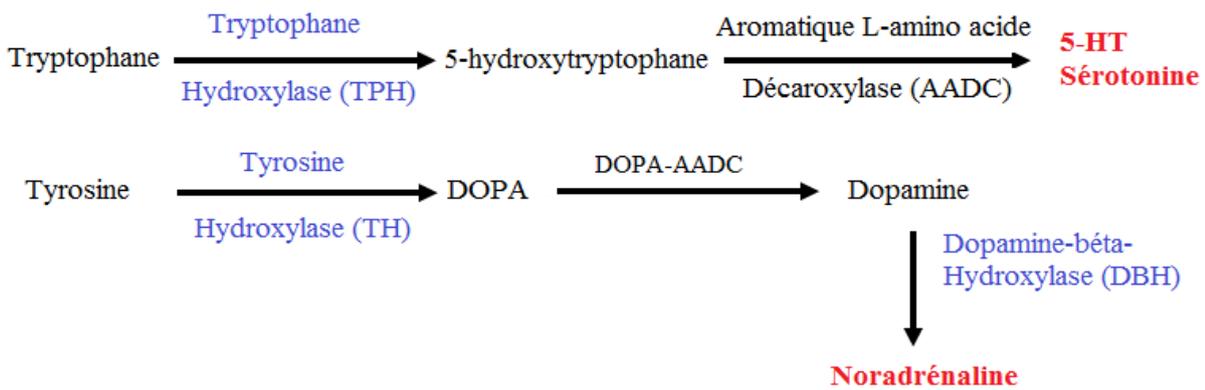


Figure 13: Voies de synthèses de neurotransmetteurs. Schéma présentant les étapes clés de la synthèse des neurotransmetteurs (noradrénaline et sérotonine). Il permet d’observer les rôles joués par les enzymes TPH1, TH, et DBH.

Deux expériences ont été réalisées, la première est une analyse de l’expression des enzymes des voies de synthèse de la sérotonine et de la Noradrénaline par RT-PCR pour confirmer ce lien une nouvelle fois (Figure 14A). Nous constatons clairement l’augmentation de l’expression des enzymes des voies monoaminergiques en présence de LA, d’un facteur 1,5 pour la Tryptophane Hydroxylase (TPH), 1,6 pour la Tyrosine Hydroxylase (TH), et 2 pour la Dopamine- bêta-Hydroxylase (DBH). Ces inductions sont abolies lorsque MEK1/2 est inhibé par U0126. Par la suite, nous avons étudié la libération de la sérotonine, la Figure 14B montre une augmentation d’un facteur 5 de la libération de la sérotonine en présence de LA. Cette augmentation est abolie par U0126. Ce résultats indique que la stimulation par LA des cellules gustatives induit la synthèse et la libération de neurotransmetteurs, en particulier la sérotonine, *via* les MAPK.

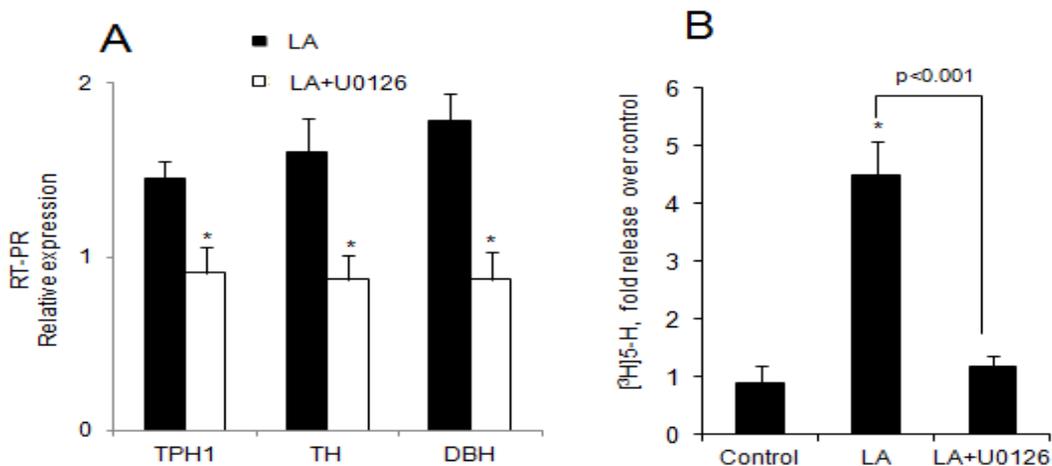


Figure 14: Lien entre la voie des MAP Kinases ERK1/2 et les neurotransmetteurs sérotonine et noradrénaline. A, Histogramme présentant la variation de l’expression de diverses enzymes impliquées dans la synthèse des neurotransmetteurs stimulés avec LA (20µM) ou LA avec U0126 . TPH1 (tryptophan hydroxylase) permet la synthèse

2^{ème} Partie : Apports personnels

Chapitre II : Liste des Publications et Communications

de la sérotonine. TH (Tyrosine hydroxylase), et Dopamine Beta hydroxylase permettent la synthèse de la Noradrénaline. B, Histogramme obtenu a partir de résultats obtenus par radiographie avec des cellules gustatives de papilles caliciformes traitées ou non par LA (20 μ M), ou traitées par LA et U0126. Les astérisques représentent une baisse dans l'expression des ARNm des enzymes en comparaison avec les cellules traitées par LA ($p < 0,001$). Dans la Figures B l'astérisque représente la différence significative par comparaison du contrôle ($p < 0,001$) ($n=3$).

LA induit la phosphorylation de p38 de manière CD36-dépendante

Après avoir étudié la voie des ERK1/2, des expériences ont été faites pour déterminer si les autres voies de MAP Kinases sont également activées par le LA. La même méthode que pour ERK est utilisée, des cellules de papilles caliciformes ont été isolées, traitées ou non à temps variable avec LA, et un western blot est pratiqué (Figure 15A). Les résultats concordent avec ceux des ERK1/2. Après 5 mn de stimulation, la phosphorylation de p38 était 2,5 fois plus importante que dans le contrôle. Elle était de 1,5 après 15 mn et était revenue à la normale après 30 mn. P38 répond 2 fois moins intensément et moins longtemps que ERK1/2, mais la réponse est significative. Pour déterminer si cette réponse est CD36-dépendante une autre expérience a été faite. Les cellules ont été traitées ou non avec LA pendant 10 mn, ou traitées pendant 10 mn après avoir été transfectées avec CD36 SiRNA (Figure 15B). Comme précédemment, p38 est phosphorylé en réponse à LA. Cette phosphorylation de p38 est abolie par l'inactivation de CD36, elle est donc CD36-dépendante.

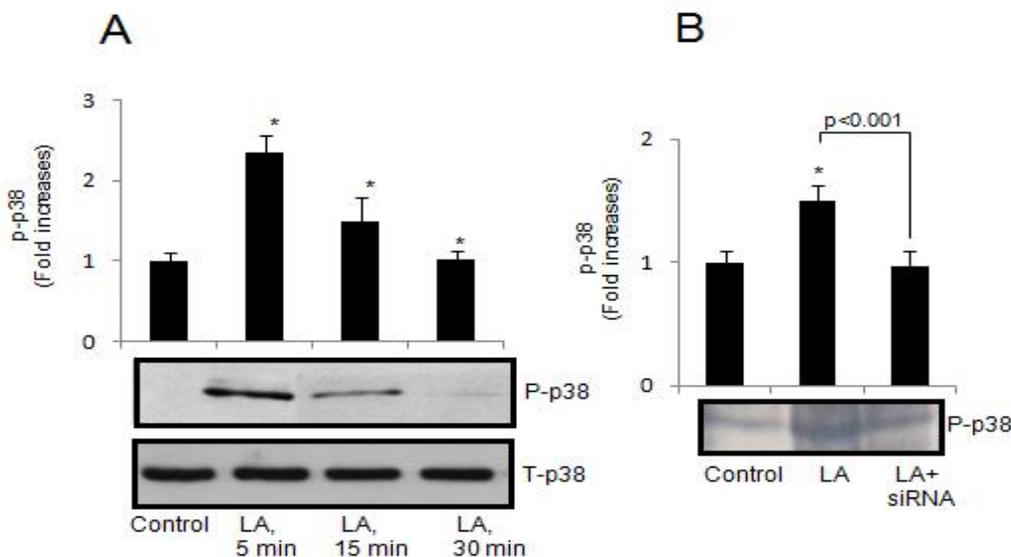


Figure 15: LA induit la phosphorylation des MAP Kinases p38 dans les papilles caliciformes des souris. A, western blot de p38 phosphorylé, p38 totaux stimulés ou non avec LA (20 μ M) pendant 5, 15, ou 30 mn. B, western blot de p38 traité ou non avec LA pendant 10 mn, ou traité par LA avec des cellules transfectées avec un CD36 SiRNA. Les astérisques représentent les différences significatives en comparaison de contrôles respectifs ($p < 0,001$) ($n=3$).

LA induit la phosphorylation de JNK de manière CD36-dépendante

De la même façon que pour ERK et p38, l'expression des protéines JNK phosphorylées a été étudiée par western blot (Figure 16A). Cette Figure permet de tirer les mêmes conclusions que pour ERK et p38. Néanmoins, l'augmentation de la phosphorylation de JNK1/2/3 est plus importante que dans les deux cas précédents d'un facteur 5 à 5 mn et est plus soutenue dans le temps. En effet, après 30 mn, le taux de protéines JNK phosphorylées est encore 4,5 fois supérieur au contrôle. Pour savoir si la phosphorylation de JNK est CD36 dépendant un autre western blot a été fait (Figure 16B). Les cellules ont été traitées ou non avec LA pendant 10 mn, une partie des cellules avait été transfectée avec un siRNA anti CD36. Comme précédemment, la phosphorylation de JNK en présence de LA est très importante. La diminution de la bande en présence de CD36 SiRNA prouve la nécessité de la présence du récepteur CD36 dans ce phénomène.

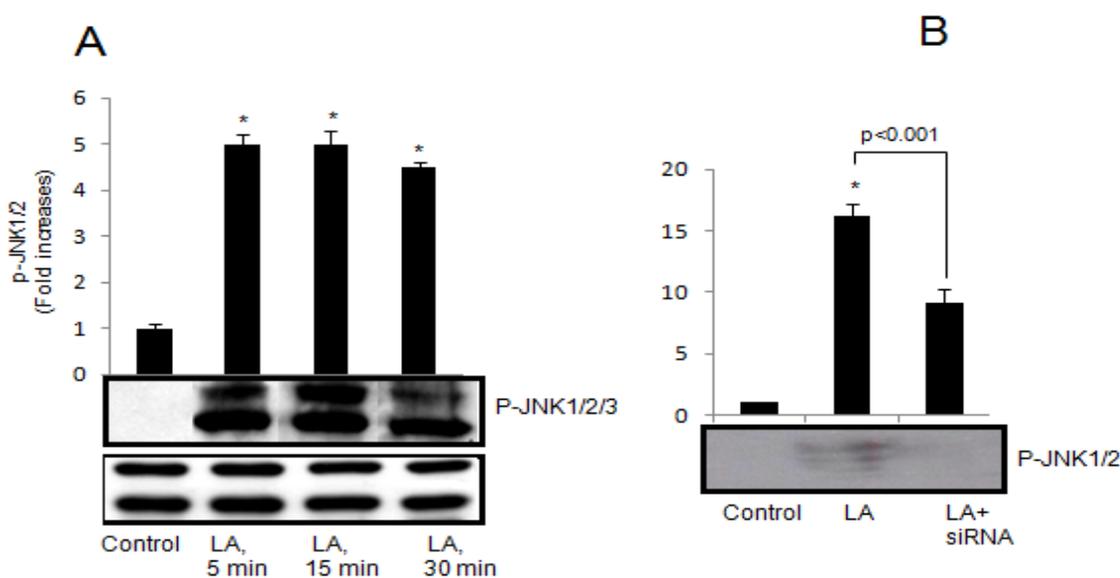


Figure 16: LA induit la phosphorylation des MAP Kinases JNK dans les papilles caliciformes des souris. A, Western blot de JNK 1/2/3 phosphorylés et JNK totaux stimulés ou non avec LA (20 μ M) pendant 5, 15, ou 30 mn. B, western blot de JNK 1/2 phosphorylés, les cellules sont stimulées ou non (contrôles) avec LA (20 μ M) et traitées avec CD36 Si RNA. Les astérix représentent les différences significatives en comparaison de contrôles respectifs (p<0.001) (n=3).

Discussion et conclusion

Dans cette étude, nous avons démontré que la stimulation des cellules gustatives des papilles caliciformes des souris par LA déclenche la phosphorylation de plusieurs protéines appartenant à la cascade des MAP Kinases. L'activation des ERK1/2 par LA est très rapide et diminuerait en fonction du temps. Et cette phosphorylation de la voie ERK est CD36-dépendant. En effet, l'utilisation de Sulfo-N-succinimidyl Oleate (SSO), un inhibiteur de CD36, ou de CD36 siRNA diminuait de façon significative l'activation des ces MAPK induite par LA. Ces observations sont

Chapitre II : Liste des Publications et Communications

en concordance avec ceux suggéré par Baranova *et coll.* (2010), qui stipule que l'activation des protéines ERK1/2 est CD36 dépendant dans les cellules HEH293.

Nous démontrons aussi que la protéine Vav2 et le facteur de transcription Elk-1 sont activés dans cette voie de signalisation *via* CD36 dans ces cellules gustatives de souris. Les protéines p-c-raf, ainsi que Vav1 et Vav2 sont situées en amont de la voie des ERK1/2 dans les macrophages (Lewis *et coll.*, 1998). Nous n'avons pas observé une modification de phosphorylation de la protéine Vav1, et il nous a été difficile de déterminer la phosphorylation de p-c-raf et celle de P90RSK (un facteur de transcription activé *via* la voie des MAPKs). Cette étude a aussi démontré la phosphorylation de p38 et JNK en réponse à LA. Nos résultats sont conformes à ceux observés par Chen *et coll.* (2008) postulant que l'activation de CD36 est associée à la phosphorylation de p38 MAP Kinase dans les cellules endothéliales microvasculaires et de JNK dans les macrophages. Dans la même année une étude suggère que l'EGF régule la différenciation des papilles fungiformes en activant MEK/ERK, p38 (Liu *et coll.*, 2008) les cellules gustatives. D'une manière similaire notre étude confirme la phosphorylation des MAPK p38, et JNK dans les cellules gustatives caliciformes.

Nous avons observé que la stimulation par LA déclenche la synthèse et la libération de la sérotonine grâce à l'activation de la voie des ERK1/2. Il est probable que cette libération de la sérotonine transmet vers le cerveau, plus précisément vers le NTS le message gustatif lors de la perception du goût lipidique. Ceci induira forcément l'activation des neurones. Pour cela, nous avons étudié l'expression des ARNm de trois gènes Zif-268, BDNF et Glut1 dans le NTS, le noyau arqué et l'hippocampe. Ces gènes sont impliqués dans l'activité et la plasticité cérébrale. Nos résultats montrent que chez les souris sauvages, l'application linguale du LA a induit une forte activation de l'expression du Zif-268, du BDNF et du Glut1 dans les trois aires. Chez les souris ERK1^{-/-}, l'effet du LA sur l'activation des aires est moindre comparé aux animaux sauvages. En effet, nous constatons une faible expression d'ARNm du BDNF dans le NTS et l'hippocampe et celle d'ARNm de Glut1 dans le noyau arqué. Par contre nous avons observé une augmentation importante de l'expression de Zif-268 chez les souris ERK1^{-/-}. Ces résultats ont été confirmés quand on utilise deux autres approches, qui consisteraient à diminuer les gènes ERK1/2 par l'administration sur les papilles caliciformes du siRNA Accell (Nakajima *et coll.*, 2012) ou par gavage des souris par le PD0325901, un inhibiteur chimique de MEK (protéine activateur d'ERK1/2) (Henderson *et coll.*, 2010). Nos données confirment l'importance des protéines ERK1/2 dans l'activité neuronale suggérée par Silingardi *et coll.*, (2011). Cette augmentation de l'expression de Zif-268 peut s'expliquer par le fait que le gène Zif-268 est un gène exprimé peu de temps après l'activité neuronale et que l'inactivation du gène de Zif-268 chez la souris conduit à des déficits dans la mémoire (Jones *et coll.*, 2009).

Chapitre II : Liste des Publications et Communications

Nous démontrons également que la voie de cascade de signalisation d'ERK1/2 est indispensable pour la perception oro-gustative des lipides car non seulement l'inactivation d'ERK1 mais aussi la diminution par siRNA et par PD0325901 des gènes ERK1/2 chez la souris diminuent la préférence spontanée pour les lipides alimentaires observée chez les animaux contrôles dans un test de double choix. Cela peut expliquer la diminution de l'expression de BDNF observée chez les souris ERK1^{-/-}. En effet, la suppression du gène *BDNF* entraîne une baisse de la prise alimentaire chez la souris (Wang *et coll.*, 2007).

Nos résultats suggèrent pour la première fois l'implication de la voie ERK1/2 dans la signalisation des cellules gustatives induite par LA *via* CD36 en activant des aires cérébrales et par conséquent module la prise alimentaire lipidique.

TROISIÈME PARTIE

DISCUSSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES

Discussion générale

La perception oro-sensorielle des lipides alimentaires est multiparamétrique. Les travaux actuels indiquent qu'il existe, parallèlement à la texture et à l'olfaction, une dimension gustative à ce phénomène chez le rongeur et fort probable chez l'Homme. Ce sont les AGLC qui sont détectés par des molécules réceptrices spécialisées et localisées au niveau des bourgeons du goût. Chez la souris, le CD36 et probablement certains récepteurs de la famille GPCR comme le GPR120 jouent le rôle de lipido-récepteurs gustatifs participant à la couverture des besoins énergétiques de l'organisme en sélectionnant et en favorisant la digestion des nutriments lipidiques.

Activation des récepteurs du goût par les AGLC

Les acides gras activent de manières différentes les cellules réceptrices de bourgeons du goût de la papille caliciforme qui expriment la protéine CD36. Cette activation dépend de la structure, de la longueur de la chaîne carbonée et du degré de saturation. El Yassimi *et coll.* (2008) ont étudié les interactions de différents acides gras avec le CD36 dans des cellules fraîchement purifiées dans des papilles caliciformes de souris. Ils ont testé deux acides gras saturés, l'acide caprylique (CA, 10:0) et l'acide palmitique (PA, 16:0), deux acides gras polyinsaturés à longue chaîne carbonée, l'acide docosahexaénoïque (DHA, 22:6 *n*-3) et l'acide linoléique (LA, 18:3*n*-6). Il a été observé que, les AGLC saturés et insaturés induisent des réponses rapides, en augmentant différemment le calcium intracellulaire. Et l'induction de l'acide linoléique est la plus importante. Partant du mécanisme de signalisation précédemment décrit, suite à l'activation de CD36 par l'acide linoléique, nous avons cherché à comprendre les phénomènes qui avaient lieu en amont du déclenchement de cette signalisation, pendant cette signalisation et en aval de la signalisation.

Rôles des PLA₂ et ses produits dans la signalisation calcique

Nous avons observé que LA induit une augmentation significative de $[Ca^{2+}]_i$, ce qui n'a pas été le cas à moyen terme, dans un milieu extracellulaire pauvre en calcium. Sachant que LA induit une augmentation de $[Ca^{2+}]_i$, par la production d'IP₃, suivi par l'influx de calcium dans les cellules CD36-positives (El-Yassimi *et coll.*, 2008), nous avons cherché à élucider l'effet de l'activation des PLA₂ par LA, en présence ou en l'absence de calcium dans le milieu de dosage. Nous avons observé que l'activation induite par LA, des sPLA₂ et cPLA₂ est plus importante en présence de calcium dans le milieu extracellulaire, comme cela est indiqué dans les cellules HepG2 (Caro et Cederbaum, 2007). Comme prévu, l'activation induite par LA des iPLA₂ a aussi été accrue lorsque le calcium a

Discussion générale

été chélaté par EGTA dans le milieu extracellulaire comme l'ont d'ailleurs démontré Smani *et coll.*, (2004). Plusieurs auteurs rapportent que l'augmentation de $[Ca^{2+}]_i$, par certains agonistes est contrôlée par les PLA₂ et la libération d'AA (Tsumoda et Owayng, 1993; Tornquist *et coll.*, 1994). Nos résultats sont en accord avec les observations de Suh *et coll.* (2008) qui ont montré que LA induit des augmentations de $[Ca^{2+}]_i$, et l'activation des cPLA₂ dans les hépatocytes de poulet. LA recrute aussi du calcium à partir du pool du réticulum endoplasmique (El-Yassimi *et coll.*, 2008). Nous avons observé que LA induit la libération d'AA- $[^3H]$ dans les cellules CD36-positives et que, l'acide aristolochique et BPB, les inhibiteurs des PLA₂ (BEL et ATK) inhibent, de manière significative, la libération d'AA- $[^3H]$ induite par LA dans les cellules CD36-positives. Ces résultats suggèrent que la libération d'AA induite par LA est PLA₂ dépendante. Par ailleurs, LA exerce son action en se liant à CD36, une liaison qui est diminuée par SSO. La libération d'AA- $[^3H]$ est aussi diminuée par SSO.

Nos observations suggèrent que les cellules CD36-positives expriment les trois isoformes de PLA₂, et qu'elles sont activement impliquées dans la catalyse de l'AA. Il est à noter que LA n'a pas exercé son action sur la libération de d'AA- $[^3H]$ *via* ses métabolites, car l'indométacine, un inhibiteur de la voie de la cyclo-oxygénase, NGDA, un inhibiteur de la voie de la lipoxigénase, et 1-aminobenzotriazole (ABT), un inhibiteur de la cytochrome P450 (CYP450 epoxygénases), n'ont pas réussi à influencer l'action de cet acide gras.

Pour comprendre l'effet que peut jouer l'AA dans la signalisation calcique, nous avons effectué des expériences dans un tampon ne contenant aucun ion Ca^{2+} où le calcium a été remplacé par l'EGTA. Dans un tampon 0% Ca^{2+} , l'AA seul n'a pas induit une augmentation de $[Ca^{2+}]_i$. En appliquant un protocole CFCR (Calcium Free/Calcium Reintroduction), en présence de TG, un inhibiteur des pompes calciques ATPasiques du RE, l'AA exogène a une action dose-dépendante sur les augmentations de $[Ca^{2+}]_i$ dans les cellules CD36-positives. Dans un tampon contenant du Ca^{2+} , les inhibiteurs des trois isoformes de PLA₂ réduisent l'influx de calcium induit par TG dans les cellules CD36-positives. Ces observations suggèrent que l'AA est responsable de l'influx de calcium dans ces cellules. Nos résultats corroborent les conclusions de plusieurs chercheurs qui ont montré que cet acide gras induit l'influx de calcium dans différentes lignées cellulaires (Hichami *et coll.*, 2002). Rappelons que l'influx de calcium, provoqué par l'AA, n'a pas été influencé par ses métabolites, ce qui a été confirmé par Mignen *et coll.* (2003). Puisque l'action des PLA₂ est associée à l'apparition d'AA libres dans le milieu extracellulaire et à la production de lyso-phospholipides dans les membranes plasmiques, nous nous sommes intéressés au rôle du lyso-PC, dont nous avons observé sa production dans les cellules CD36-positives. Lyso-PC induit un influx de calcium dans ces cellules, mais aussi, Lyso-PE et Lyso-PI, dans une moindre proportion par rapport à lyso-PC. Ces résultats corroborent les conclusions de Smani *et coll.* (2004) qui ont montré

Discussion générale

que les lysophospholipides, y compris lyso-PC, induiraient l'ouverture de canaux calciques dans les cellules musculaires lisses de souris. Boittin *et coll.* (2010) ont récemment démontré que Lyso-PC a déclenché l'entrée du calcium *via* les canaux SOC (*stored operated calcium channel*) dans les fibres dystrophiques.

Nous avons observé que l'addition d'AA après lyso-PC et vice-versa a induit une réponse additive sur l'influx du calcium. Ceci suggère que les canaux ouverts par ces deux agents sont différents. L'influx de calcium stimulé par l'AA n'est pas contrôlé par des mécanismes classiques. Des inhibiteurs comme le diltiazem et ω -conotoxine, inhibiteurs respectifs des canaux calciques de type L et de type N, n'ont pas pu bloquer l'influx de calcium induit par l'AA dans nos cellules. En outre, il a été démontré que Lyo-PC ouvrira les canaux SOC formés par Orai1 (Smani *et coll.*, 2004; Bolotina, 2008). L'influx de Ca^{2+} *via* les canaux SOC (Orai1) entraînera une forte augmentation de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ qui participera à l'activation de sPLA₂ et cPLA₂ tel que cela a été proposé par Bolotina (2008). En effet, ces chercheurs s'accordent avec le fait que l'influx de Ca^{2+} est fortement impliqué dans l'activation de ces isoformes de PLA₂.

De nombreux travaux récemment publiés sont en accord avec notre hypothèse (Mignen *et coll.*, 2001; Mignen *et coll.*, 2009). Ils ont montré l'existence d'un courant ARC (Arachidonic acid Regulated Calcium channel) spécifique à l'AA, dans les cellules HEK293.

Nous nous proposons l'hypothèse, lors de l'activation des cellules CD36-positives, que LA va induire la mobilisation des réserves intracellulaires de calcium par la voie de l'IP₃ (El-Yassimi *et coll.*, 2008) et, par conséquent la production de CIF. CIF activerait iPLA₂ Type VI en déplaçant la calmoduline comme le décrivent Smani *et coll.* (2004). Nous avons observé que l'action de l'inhibiteur de la calmoduline, CMZ, et la déplétion du calcium libre intracellulaire par activation de BAPTA (1,2-bis (2-aminophenoxy)-éthane-N, N, N', N'-tetraacetic acid), induit l'activité d'iPLA₂ dans ces cellules.

Notre hypothèse est étayée par les observations de Chang et Parekh (2004) qui ont montré que, dans cellules les RBL-1, l'entrée de Ca^{2+} par la voie SOC, induit l'épuisement des réserves intracellulaires de Ca^{2+} et l'activation de cPLA₂. Alors, on se demanderait si les réserves intracellulaires étaient capables d'activer ces enzymes. La réponse est non, même si il y avait un fort signal intracellulaire de Ca^{2+} .

Rôle des canaux Orai 1 et 3 dans la signalisation calcique

Les canaux SOC se composent de quatre unités codées par des gènes Orai (Baryshnikov *et coll.*, 2009). Les canaux calciques Orai1 sont des constituants moléculaires de l'activation de courants I_{CRAC} . En effet, l'inactivation du gène d'Orai1 produit une inhibition spectaculaire de I_{CRAC}

Discussion générale

et l'activation de l'influx SOC (Bolotina, 2008). Dans un premier temps, nous avons cherché à savoir si les cellules CD36-positives possèdent ces canaux. Nous avons observé que ces cellules expriment à la fois l'ARNm et la protéine des canaux Orai1 et Orai3. Nous avons aussi provoqué la diminution de l'expression des canaux Orai1 et Orai3 grâce à la technologie *siRNA*. Sans surprise, la réponse de lyso-PC sur l'entrée du calcium a été significativement réduite dans les cellules dans lesquelles Orai1 est diminué, mais l'influx calcique induit par l'AA n'a été que faiblement diminué dans ces cellules. Précisons que l'influx calcique induit par l'AA a été considérablement réduit dans les cellules CD36-positives transfectées à la fois avec les protéines Orai1 et Orai3. Parallèlement, l'influx de calcium induit par Lyo-PC ou CIF a été complètement réduit dans les *Orai1^{-/-}*. En ce qui concerne l'influx de calcium induit par l'AA, il a été aussi très réduit dans ces cellules.

De même, les canaux ARC seraient formés par un ensemble heteropentameric d'Orai1 et Orai3, dans une proportion de trois sous-unités Orai1 et de deux sous-unités Orai3 (Mignen *et coll.*, 2009). Les canaux SOC et ARC, sont totalement distincts et peuvent coexister dans les mêmes cellules (Shuttleworth *et coll.*, 2004). L'AA peut ouvrir divers canaux calciques en particulier les canaux ARC (Shuttleworth *et coll.*, 2004).

STIM1 et signalisation des lipides

STIM1 (Stromal Interaction Molecule 1) est une protéine transmembranaire, localisée dans la membrane du RE, qui interagit avec des protéines Orai dans la membrane plasmique pour initier l'entrée du calcium *via* les canaux SOC et puis, le remplissage de réserve du RE (Bolotina *et coll.*, 2008). Lors de la déplétion de calcium du RE, le STIM1 perd le calcium de ses motifs dits « RF-hands » est, en suite, localisé à la proximité (10-25 nM) de la membrane plasmique pour contrôler l'ouverture des canaux SOC. Si le STIM1 ouvre les canaux calciques, le facteur qui contrôle l'entrée sélective, nécessaire pour remplir la réserve du RE restait inconnu. C'est en 1993 que l'équipe de Ramdriamampita *et coll.*, puis celle de Victoria Bolotina *et coll.*, (2008) ont démontré qu'un facteur nommé CIF (Calcium Influx Facteur) est impliqué dans la détection du calcium qui est nécessaire pour remplir la réserve intracellulaire. Nous démontrons que STIM1 déclenche la libération du CIF à partir du RE lors de la mobilisation du calcium intracellulaire. En effet, les cellules qui sont déficientes en STIM1 ne peuvent pas produire le CIF et par conséquent l'influx calcique SOC. CIF induit l'activation d'une phospholipase A₂ (PLA₂) calcium-indépendante (iPLA₂). Il est intéressant de noter que les cellules réceptrices du goût appelées TRC (Taste Receptor Cells) de souris expriment abondamment iPLA₂ VIb qui joue un rôle clé dans la régulation de l'influx SOC dans différents types cellulaires (Bolotina *et coll.*, 2008). Dans des conditions normales, l'iPLA₂ VIb se trouve associée avec la calmoduline (CaM), donc, inactive. Ainsi, nous avons démontré que le CIF, ainsi produit, permet l'élimination de la CaM et rend cette

Discussion générale

enzyme active qui, ultérieurement, va libérer l'AA et lyso-phosphatidylcholine (Lyso-PC) à partir de membrane plasmique. A leur tour, le lyso-PC ouvre les canaux calciques Orai1 et l'AA, les canaux calciques hétérodimériques Orai1/3. En effet, la réponse de lyso-PC sur l'augmentation du $[Ca^{2+}]_i$ est complètement supprimée dans ces cellules gustatives lipidiques des souris *Orai1*^{-/-}.

L'activité du CIF est sous contrôle stricte de STIM1 car le CIF purifié à partir des cellules réceptrices du goût, provenant des souris *STIM1*^{-/-}, n'active pas cette enzyme. En utilisant la technique d'électrophysiologie, nous avons démontré que le CIF exerce son action à la face intérieure de la cellule.

Les cellules réceptrices du goût de souris expriment aussi les PLA₂-calcium dépendantes (cPLA₂ et sPLA₂), principalement le sPLA₂ V, le sPLA₂ IIa et le cPLA₂ Vc. L'influx calcique, à nouveau, va activer ces deux familles des PLA₂ qui, à leur tour, vont agir en synergie sur la phosphatidylcholine membranaire et produire un influx calcique massif *via* l'AA et Lyso-PC. Les siRNA, destinés à ces deux familles de PLA₂, bloquent les mécanismes en aval de la signalisation cellulaire. Il faut rappeler que le CIF n'a aucune action sur le cPLA₂ et sPLA₂, et que son action est donc spécifique en ce qui concerne l'iPLA₂Vb.

Cette augmentation massive du $[Ca^{2+}]_i$, *via* le CD36, est impliquée dans l'exocytose de la sérotonine (5-hydroxytryptamine, 5-HT) qui va permettre le transfert du message gustatif vers le nerf afférent qui apporte l'information au cerveau pour déclencher les mécanismes d'anticipation, tels que la sécrétion d'hormones responsable pour la digestion.

La signalisation calcique, régulée par le STIM1, est indispensable à la perception orogustative des lipides car l'inactivation du gène de STIM1 chez la souris diminue la préférence spontanée pour les lipides alimentaires dans un test de double choix. Les souris invalidées pour le gène de STIM1 sont des animaux de phénotype normal, excepté des signes de splénomégalie. Nous avons démontré que cette pathologie n'a aucun effet sur la perception gustative lipidique car l'induction de splénomégalie, en injectant le chlorure de cadmium chez la souris, n'influence pas ce phénomène.

La perception gustative des lipides et la signalisation cellulaire médiée *via* CD36 sont modifiées lors de l'obésité.

Bien que l'origine de l'épidémie de l'obésité soit clairement multifactorielle, les habitudes alimentaires, en particulier la surconsommation d'aliments à forte densité énergétique, agréables au goût, semble jouer un rôle important dans cette situation. Plusieurs éléments indiquent que les rongeurs de laboratoire et les humains montrent une préférence pour les aliments riches en lipides par des mécanismes mal connus (Mattes *et coll.*, 2011 ; Gaillard *et coll.*, 2008). Toutefois, si la préférence pour les lipides est la cause et / ou la conséquence de l'obésité, cela reste à élucider.

Discussion générale

Nous avons mené notre études sur deux types de modèle : le premier modèle est *Psammomys obesus* (rat des sables), un modèle de rongeur unique de l'obésité, de l'insulino-résistance et du diabète de type 2. Son habitat naturel est les régions désertiques du Moyen-Orient, où il est maintenu à un régime de sel brousse et reste maigre avec une glycémie normale (Shafrir *et coll.*, 1993). Toutefois, lorsqu'il est transféré dans des conditions de laboratoire et nourri *d'ad libitum*, un régime sur lequel de nombreuses autres espèces de rongeurs restent en bonne santé, une gamme de réponses métaboliques ont été observées entre autres : une hyperinsulinémie, une hyperglycémie, associées à un gain de poids (Kalderon *et coll.*, 1996 ; Barnett *et coll.*, 1994 ; Marquié *et coll.*, 1984). Et l'autre modèle est des souris rendues obèses par un régime obésogène. Nos résultats montrent que les *Psammomys* obèses présentent une forte préférence pour les solutions de lipides dans un test de double choix comparés aux animaux normaux. Les mêmes résultats ont été observés chez nos souris rendues obèses suite au régime. Ces résultats peuvent s'expliquer par un manque de sensibilité des animaux en face des solutions gras ce qui les poussent à consommer d'avantage. En effet, les souris obèses ne sont pas seulement incapables de détecter correctement les faibles concentrations d'huile (0,02%), mais également elles affichent une préférence plus faible pour des concentrations élevées (2,0% d'huile) que chez les souris témoins, ce qui démontre que les régimes obésogéniques augmentent le seuil de détection orale (c-a-d diminuer la sensibilité) pour les lipides. Les mêmes résultats sont observés chez les rats rendus obèses par un régime obésogène (Shin *et coll.*, 2011). Bien que l'activité des lipases par voie orale soit particulièrement efficace chez la souris (Kawai *et coll.*, 2003) et est impliqué dans le seuil de détection des lipides chez l'homme (Pepino, *et coll.*, 2012), une diminution de l'expression et/ou l'activité de la lipase linguale chez les souris obèses semble peu probable. En effet, les animaux rendus obèses affichent également une attraction faible pour des solutions contenant un acide gras libre (AGL). Ces résultats nous ont incités à explorer le mécanisme responsable de la diminution de la détection orale des graisses induite par l'obésité. CD36, une molécule candidate responsable de ce phénomène, a été étudiée. En effet, CD36 lingual est connu pour jouer un rôle majeur dans la préférence pour les matières grasses. Enfin, une diminution du niveau d'expression de CD36 a été récemment rapportée dans la muqueuse gustative des rats rendus obèses (Zhang *et coll.*, 2011). Nous avons observé les mêmes résultats chez les *Psammomys obesus* comparés aux animaux contrôles. En revanche un tel changement n'a pas été observé chez les souris obèses quels que soient les régimes obésogéniques utilisés. Cette différence pourrait être due à des différences expérimentales (par exemple, la durée du traitement, la composition du régime alimentaire) qui pourrait conduire à un état inflammatoire différent. En effet, l'inflammation interfère avec le renouvellement des cellules du goût (Cohn *et coll.* 2010). Le fait que le nombre des papilles soit clairement diminué dans les cellules caliciformes de rats obèses (Zhang *et coll.* 2011), contrairement à ce qui se trouve chez les souris obèses, est compatible

Discussion générale

avec cette hypothèse.

Nous avons montré que, dans les cellules caliciformes de la souris, les AGPI déclenchent *via* CD36 une cascade de signalisation complexe produisant une augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$ qui serait à l'origine de la libération des neurotransmetteurs (Dramane *et coll.*, 2012). Conformément à cette idée, une réduction de la mobilisation du Ca^{2+} induite par LA a été observée en utilisant l'imagerie calcique dans les cellules du bourgeon de goût à CD36-positives fraîchement isolées de souris obèses, en comparaison avec leurs contrôles. En revanche, chez les *Psammomys* LA induit une augmentation de $[Ca^{2+}]_i$ dans les cellules du bourgeon goût *via* CD36, et il était plus élevé chez les animaux obèses que les rongeurs contrôles. Une explication plausible sur l'augmentation de Ca^{2+} signalisation chez les animaux obèses n'est pas disponible. Il est possible que d'autres protéines comme GPR120 [Cartoni *et coll.*, 2010], également considéré comme un lipido-récepteur, participent également à la mobilisation calcique induite par LA. Cependant, l'implication de GPR120 dans ces cellules reste à évaluer plus tard.

Activation de la voie MEK/ERK1/2 /Elk-1 en réponse au LA *via* CD36

L'implication de la voie des MAPKs dans la perception du goût lipidique n'est pas connue. En revanche l'activation de ces protéines Kinases par les acides gras libres a été suggérée par Sharma *et coll.* (2013), montrant que les signalisations des protéines JNK1/2, p38 et ERK1/2 sont activées de manière dose-dépendante dans les cellules L β T2 gonadotropes par les AGL tels que l'AA, l'acide laurique, l'acide linoléique, l'acide myristique, l'acide oléique. Ceci a été confirmé par Jiang *et coll.* (2013), dont l'administration orale du DHA active la voie GDNF-MAPK-CERB dans l'hippocampe chez les rats. Mais aucune étude n'est disponible quant-à l'activation des MAPK par les acides gras libres dans les cellules gustatives lipidiques. Dans ces cellules, un facteur de croissance (epidermal growth factor) régule le nombre des papilles gustatives en activant MEK/ERK, p38 Kinase, et PI3K (Liu *et coll.*, 2008).

Nos résultats montrent que la stimulation des cellules gustatives des papilles caliciformes des souris par le LA déclenche la cascade de phosphorylation des MAP Kinases MEK/ERK1/2/Elk-1. L'activation des ERK1/2 par LA est très rapide et diminuerait en fonction du temps. Nous démontrons également, que cette cascade d'activation de la voie ERK est CD36-dépendant. En effet, l'utilisation de Sulfo-N-succinimidyl Oleate (SSO), un inhibiteur de CD36 ou de CD36 siRNA diminuait de façon significative l'activation des ces MAPK induite par LA. Il a été suggéré que, dans les cellules HEH293 transfectées par un plasmide contenant CD36, l'activation par le serum amyloid A (SAA, une famille d'apolipoprotéines) du CD36 induit l'activation des ERK1/2, ce qui augmente l'expression de cytokines comme l'IL-8 (Baranova *et coll.*, 2010). De même, dans des cellules Hela transfectées avec CLA-1 (un récepteur membranaire contribuant au métabolisme

Discussion générale

des lipides et l'athérogenèse), la fixation de SAA provoque *via* CD36 l'activation des ERK1/2, par l'intermédiaire de MEK1. Le même phénomène est observé dans les mêmes conditions avec des cellules monocytaires (Baranova *et coll.*, 2005). Une autre étude sur des cellules CHO, transfectées par des plasmides contenant CD36, la phospholipase A₂ est activée par une phosphorylation des MAP Kinases de la famille des ERK1/2 de façon CD36-dépendante (Kuda *et coll.*, 2011).

En ce qui concerne le couplage des MAPK en amont et en aval, les différentes cascades des MAP Kinases ont déjà été étudiées (Lewis *et coll.*, 1998), les précédentes études ont montré que les protéines p-c-raf, ainsi que les Vav1 et Vav2 étaient généralement en amont de la voie des ERK1/2 dans les macrophages. Après sa phosphorylation, ERK1/2 active généralement des facteurs de transcription, tels qu'ELK-1, ou p90RSK. Nos résultats indiquent que dans les cellules gustatives de souris, d'une part seule le facteur de transcription Elk-1 serait impliqué et non pas P90RSK et, d'autre part, en amont de la voie ERK, seule la protéine Vav2 serait impliquée *via* CD36. Il a été suggéré que le signal émis par une famille de protéine Vav1/2/3 est indispensable pour l'activation des MAPK impliquées dans le développement et la maturité des cellules T (Fujikawa *et coll.*, 2003).

Des études ont montré que dans les cellules endothéliales microvasculaires, l'activation de CD36 est associée à la phosphorylation de p38 MAP Kinase (Chen *et coll.*, 2008). Dans les macrophages, c'est JNK qui est activé *via* CD36 (Chen *et coll.*, 2008). Dans les plaquettes, le CD36 activé par les LDL-oxydés recrute vers la membrane plasmique Fyn et Lyn qui vont induire la phosphorylation de c-jun kinase kinase (JNKK)], puis de JNK2, une isoforme de JNK (Chen *et coll.*, 2008). Dans les macrophages de rats, SAA, *via* le CD36, phosphoryle les 3 familles de MAP Kinases, principalement JNK, ce qui induit la production d'une cytokine (Baranova *et coll.*, 2010). Le SR-BI (récepteur des lipoprotéines de haute densité) présent dans l'intestin a été identifié comme jouant un rôle dans le "sensing" des micelles postprandiales. Leur activation entraîne l'activation de différentes protéines Kinases: MEK1/2, ERK, et p38. Ces protéines Kinases vont aboutir à la sécrétion de triglycérides riches en lipides (Béaslas *et coll.*, 2009). Dans les cellules gustatives, l'EGF régule la différenciation des papilles fungiformes en activant MEK/ERK, p38 (Liu *et coll.*, 2008). D'une manière similaire notre étude confirme la phosphorylation des MAPK p38, et JNK dans les cellules gustatives caliciformes.

ERK1/2 sont impliqués dans la préférence gustative lipidique

Nos résultats ont montrés que l'inactivation du gène codant pour ERK1 diminue de façon drastique la préférence spontanée pour les AGLC chez la souris. Ces résultats ont été confirmés par deux autres tests *in vivo* dans lesquels nous avons diminué les gènes ERK1/2 par l'administration sur la langue du siRNA Accell (Nakajima *et coll.*, 2012) ou par gavage des souris par le

Discussion générale

PD0325901, un inhibiteur chimique de MEK (protéine activateur d'ERK1/2) (Henderson *et coll.*, 2010). Il est important de noter qu'aucune étude n'est disponible quandt-aux rôles des MAPKs dans la préférence gustative lipidique.

ERK1/2 jouent un rôle important dans l'activation des aires cérébrales lors de la perception gustative

L'implication des ERK1/2 dans la consolidation de la mémoire de reconnaissance a été suggérée par deux études employant l'administration intraventriculaire ou systémique des inhibiteurs d'ERK1/2 (Kelly *et coll.*, 2003). Plusieurs expériences effectuées dans les neurones ont identifié son rôle central dans la plasticité synaptique et dans la consolidation de la mémoire à long terme impliquant l'hippocampe, l'amygdale (Goeldner *et coll.*, 2008 ; Dupont *et coll.*, 2011). Otsubo *et coll.*, (2011), ont montré, pour la première fois, que l'administration intragastrique de glutamate monosodique, de sucre ou encore de NaCl active les aires cérébrales, telles que le noyau arqué *via* l'induction de l'expression du *Zif268*, du *BDNF* et du *Glut 1*. Le BDNF joue un rôle très important dans l'activité neuronale. En effet, la suppression du gène *BDNF* entraîne une baisse de la prise alimentaire chez la souris (Wang *et coll.*, 2007). Nous avons voulu savoir si les mêmes constats pourront être observés lors de la perception gustative lipidique. Pour cela, nous avons étudié l'expression des ARNm de trois gènes (*Zif-268*, *BDNF* et *Glut1*) dans le NTS, le noyau arqué et l'hippocampe. Nos résultats montrent que chez les souris sauvages, l'application linguale du LA a induit une forte activation de l'expression du *Zif-268*, du *BDNF* et du *Glut1* dans les trois aires. Chez les souris *ERK1^{-/-}*, l'effet du LA sur l'activation des aires est moindre. Chez ces souris *ERK1^{-/-}*, on remarque aussi que l'expression d'ARNm du gène *BDNF* n'est exprimée ni dans le NTS, ni dans l'hippocampe et que l'expression d'ARN du gène *Glut1* n'est pas exprimée dans le noyau arqué. Le *Glut1* est un transporteur du glucose dont la présence au niveau du cerveau reflète l'intensité de l'activité cérébrale. Nos données confirment l'importance des protéines ERK1/2 dans l'activité neuronale suggérée par Silingardi *et coll.*, (2011). Ce manque d'activité neuronale observée chez les souris *ERK1^{-/-}*, peut entraîner la transcription des certains gènes à réponse tardive. Cette hypothèse est probable car nous constatons une augmentation importante de l'expression de *Zif-268* chez les souris *ERK1^{-/-}*. *Zif-268* est un gène qui est principalement induit peu de temps après l'activité neuronale et que l'inactivation du gène de *Zif-268* chez la souris conduit à des déficits dans la mémoire des préférences alimentaires (Jones *et coll.*, 2009). La particularité de notre travail réside dans le fait que nous avons utilisé plusieurs approches pour mettre en évidence le rôle des ERK1/2 dans l'implication des aires cérébrales dans la perception gustative : hormis les souris invalidées pour le gène *ERK1^{-/-}*. Ces résultats ont été confirmés par deux autres tests *in vivo* dans lesquels nous avons diminué les gènes ERK1/2 par l'administration dans les papilles caliciformes

Discussion générale

du siRNA Accell (Nakajima *et coll.*, 2012) ou par gavage des souris par le PD0325901, un inhibiteur chimique de MEK (protéine activateur d'ERK1/2) (Henderson *et coll.*, 2010). Nos résultats suggèrent aussi que l'implication des ERK1/2 dans l'activation des ces aires induite par LA s'effectue *via* CD36. En effet, Il a été démontré qu'un dépôt oral d'AGLC entraîne chez la souris une forte activation neuronale, au niveau du NTS (Gaillard *et coll.*, 2008). Ce phénomène est strictement dépendant de la présence du CD36 car il n'est plus reproduit chez les animaux invalidés pour le gène de CD36 (Gaillard *et coll.*, 2008). Enfin, nos résultats montrent pour la première fois l'implication de la voie des MAP kinases (ERK1/2) dans la signalisation cellulaire qui contribuera probablement dans le futur à la 6^{ième} modalité de goût dédiée aux lipidiques.

Conclusions & Perspectives

Dans cette étude nous avons, pour la première fois mis en évidence un module de signalisation cellulaire en réponse à un acide gras à longue chaîne (acide linoléique, LA) impliquant CD36, le calcium, STIM1 et les MAPK dans les cellules caliciformes de souris. Nos résultats obtenus démontrent que ces voies appartenant à ce module de signalisation concourent à la transduction d'un signal spécifique qui favoriserait la perception oro-gustative des lipides alimentaires. Concernant notre travail, plusieurs perspectives pourraient être envisagées. Vu l'importance de STIM1 dans cette nouvelle modalité gustative, il serait intéressant tout d'abord, de savoir, si les sujets possédant un polymorphisme du gène STIM1 présentent-ils une modification de la perception gustative des lipides alimentaires ?

En ce qui concerne les MAPK, la voie de signalisation ERK1/2 a été la plus étudiée dans ce travail. **Des résultats préliminaires pour les autres voies des MAPK, telles que la voie JNK et P38 semblent être activées par LA. De ce fait, une perspective consisterait à approfondir le rôle de ces voies dans la perception gustative des lipides.**

D'autres acides gras polyinsaturés sont biologiquement plus puissants que l'acide linoléique, notamment le DHA, **il serait par conséquent intéressant de déterminer son action dans cette signalisation cellulaire gustative.** Des études sont en cours et laissent penser qu'il y aurait une signalisation calcique induite, **mais via quel récepteur et quel mécanisme cellulaire en découlent ?** Toujours dans le même ordre d'idée, **est-ce que d'autres systèmes de senseurs lipidiques sensibles, par exemple, aux acides gras à chaîne moyenne ou à chaîne courte, sont présents au niveau des papilles gustatives?**

La connaissance des mécanismes moléculaires et cellulaires impliqués dans la perception oro-gustative des lipides alimentaires est un enjeu majeur très important pour la prévention et le traitement de l'obésité. Imaginons à l'avenir, si on pouvait synthétiser des molécules, dites « faux lipides » qui vont déclencher la même sensation que des lipides alimentaires mais qui n'auront pas d'apports énergétiques. Ces agents pourront être utilisés dans le traitement de l'obésité et dans les pathologies liées à ce fléau mondial. **C'est pour cela qu'il sera important d'effectuer des études chez l'homme similaires à celle effectuées chez la souris non seulement sur des cellules gustatives humaines mais aussi, des tests de préférences gustatives qui seraient plus complets. En effet, l'homme pourrait facilement faire le choix des aliments et leur appréciation.** A ce sujet précisément, des études récentes ont démontré que le polymorphisme du gène de CD36, aboutissant à une baisse de l'expression de celui-ci, est responsable d'une baisse du seuil de

Conclusions & Perspectives

sensibilité gustative des lipides alimentaires chez les obèses (Pepino *et coll.*, 2012). C'est pour cette raison que les obèses, en partie, consomment les lipides en grande quantité. Donc il n'y a plus de doute du rôle majeur que joue CD36 dans le comportement alimentaire lié à la consommation d'aliments gras. **Il serait donc très intéressant d'étudier en profondeur le polymorphisme de ce gène, sorte "d'anomalie" génétique qui pourrait avoir un impact sur la perception en bouche des lipides, notamment chez l'homme.**

Des études sur le polymorphisme du gène de CD36, en corrélation avec l'obésité, devraient être un objet d'étude en Afrique : en effet, dans le nouveau rapport de l'Organisation des Nations Unies pour l'agriculture et l'alimentation (FAO) en date du 4 juin 2013 (Italie), le surpoids et l'obésité touchent de plus en plus l'Afrique. En 1980, moins de 20% de la population africaine souffrait de surpoids et à peine 5% d'obésité, par contre, en 2008, c'est un tiers du continent qui est concerné par le surpoids et 10% par l'obésité.

Pour accepter l'existence du goût du gras il faut la présence d'un vrai système oro-intestinal de détection des lipides, partant des bourgeons du goût (là où sont détectés chimiquement les aliments) pour aller jusqu'aux centres nerveux, avec une production de neuromédiateurs avertissant de la présence de lipides. Selon Richard Mattes de l'Université de Purdue (Indiana, USA), six conditions de base sont requises pour définir un goût primaire. Il faut :

- 1- *une classe unique de molécules sapides,*
- 2- *un système de réception spécifique couplé à une cascade de signalisation localisé au niveau des cellules gustatives,*
- 3- *une réponse physiologique,*
- 4- *une implication des voies nerveuses gustatives,*
- 5- *un avantage adaptatif,*
- 6- *la production d'une sensation unique.*

Les études présentées dans cette thèse, renforcent l'hypothèse de l'existence de cette sixième modalité gustative, destinée à la perception orosensorielle du goût du gras et, permettent aussi de répondre à certaines questions concernant ce mécanisme de détection. Cependant il nous reste encore du chemin à parcourir car cet axe de recherche suscite encore de nombreuses interrogations.

Les récepteurs couplés aux protéines G (GPCR) sont des protéines membranaires intégrales avec sept domaines transmembranaires (Von Zastrow, 2003). Les récepteurs des goûts comme sucré, amer et umami sont médiés par des liaisons spécifiques aux GPCR (par exemple, les hétérodimères T1R2/T1R3 pour le goût sucré) (Lindemann, 2001). **Le récepteur GPR120 est devenu une molécule candidate comme senseur lipidique ou lipido-récepteur dans la perception des lipides.** En effet, l'activation de GPR120 au niveau intestinal déclenche une signalisation cellulaire impliquant la sécrétion de GLP-1 et qu'il agit comme un récepteur au AGPI

Conclusions & Perspectives

(Hirasawa *et coll.*, 2005), et que les souris GPR120^{-/-} perdraient la reconnaissance des acides gras alimentaires (Cartoni *et coll.*, 2010). Par ailleurs Martin *et coll.* (2011) ont montré que les cellules réceptrices du goût (papilles caliciformes) expriment GPR120. Toutefois, aucune description du mécanisme n'a été proposée jusqu'à ce jour mais on peut se poser la question **des rôles respectifs de CD36 et GPR120 au niveau des papilles gustatives. Peut-il y en avoir deux récepteurs ou deux protéines pour un même goût ? La question reste posée. Toujours en perspectives :**

- Est-ce que la détection orale des lipides influence la perception d'autres saveurs?

- Existe-t-il une relation entre la consommation d'aliments gras, le seuil de détection des lipides, et l'obésité?

Une meilleure caractérisation des mécanismes moléculaires et des conséquences physiologiques de ce système de détection pourrait déboucher, à terme, sur des stratégies nutritionnelles et/ou pharmacologiques inédites visant corriger des comportements alimentaires à risque pour la santé.

Références bibliographiques

- Abdoul-Azize S, Dramane G, Subramaniam S, Simonin A-M, Besnard P, Khan NA, (2012). STIM1, CD36 lingual et perception gustative lipidique. *Med/Sci.* 28: 1053-55.
- Abumrad NA, (2005). CD36 may determine our desire for dietary fats. *J Clin Invest.* 115: 2965-7.
- Adachi M, Fukuda M, Nishida E, (2000). Nuclear export of MAP kinase (ERK) involves a MAP kinase kinase (MEK)-dependent active transport mechanism. *J Cell Biol.* 148:849-56.
- Alessandrini A, Brott BK, Erikson RL, (1997). Differential expression of MEK1 and MEK2 during mouse development. *Cell Growth Differ.* 8: 505-11.
- Alessi DR, Cuenda A, Cohen P, Dudley DT, Saltiel AR, (1995). PD098059 is a specific inhibitor of the activation of mitogen-activated protein kinase kinase in vitro and in vivo. *J Biol Chem.* 270:27489-94.
- Alessi DR, Gomez N, Moorhead G, Lewis T, Keyse SM, Cohen P, (1995). Inactivation of p42 MAP kinase by protein phosphatase 2A and a protein tyrosine phosphatase, but not CL100, in various cell lines. *Curr Biol.* 5: 283-95.
- Baillie AG, Coburn CT, Abumrad NA, (1996). Reversible binding of long-chain fatty acids to purified FAT, the adipose CD36 homolog. *J Membr Biol.* 153: 75-81.
- Baranova IN, Bocharov AV, Vishnyakova TG, Kurlander R, Chen F, Fu D, Arias IM, Csako G, Patterson AP, Eggerman TL, (2010). CD36 Is a Novel Serum Amyloid A (SAA) Receptor Mediating SAA Binding and SAA-induced Signaling in Human and Rodent Cells. *J. Biol. Chem.* 285: 8492-8506.
- Baranova IN, Vishnyakova TG, Bocharov AV, Kurlander R, Chen Z, Kimelman ML, Remaley AT, Csako G, Thomas F, Eggerman TL, Patterson AP, (2005). Serum Amyloid A Binding to CLA-1 (CD36 and LIMPII Analogous-1) Mediates Serum Amyloid A Protein-induced Activation of ERK1/2 and p38 Mitogen-activated Protein Kinases. *J. Biol. Chem.* 280: 8031-8040.
- Barnett M, Collier GR, Collier FM, Zimmet P, O'Dea K, (1994). A cross-sectional and short-term longitudinal characterization of NIDDM in *Psammomys obesus*. *Diabetologia.* 37: 671- 676.
- Barrowman JA, Darnton SJ, (1970). The lipase of rat gastric mucosa. A histochemical demonstration of the enzymatic activity against a medium chain triglyceride. *Gastroenterology.* 59: 13-21.
- Béaslas O, Cueille C, Delers F, Chateau D, Chambaz J, Rousset M, Carrière V, (2009). Sensing of Dietary Lipids by Enterocytes: A New Role for SR-BI/CLA-1. *PLoS ONE.* 4(1): e4278
- Begin ME, Ells G, Das UN, Horrobin DF, (1986). Differential killing of human carcinoma cells supplemented with n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acids. *J Natl Cancer Inst.* 77: 1053-10962.
- Bernhardt SJ, Naim M, Zehavi U, Lindemann B, (1996). Changes in IP3 and cytosolic Ca²⁺ in response to sugars and non-sugar sweeteners in transduction of sweet taste in the rat. *J Physiol.* 490: 325-336.
- Berridge MJ, (1984). Inositol trisphosphate and diacylglycerol as second messengers. *Biochem J.* 220: 345-60.

Références bibliographiques

- Bessesen DH, Bull S, Cornier MA, (2008). Trafficking of dietary fat and resistance to obesity. *Physiol. Behav.* 94: 681–688.
- Blank N, Burger R, Duerr B, Bakker F, Wohlfarth A, Dumitriu I, Kalden JR, Herrmann M, (2002). MEK inhibitor U0126 interferes with immunofluorescence analysis of apoptotic cell death. *Cytometry.* 48:179-84.
- Bloch-Schilderman E, Jiang H, Abu-Raya S, Linial M, Lazarovici L, (2001). Involvement of Extracellular Signal-Regulated Kinase (ERK) in Pardaxin-Induced Dopamine Release from PC12 Cells. *J Pharmacol Exp Ther.* 296: 704–711.
- Boulay G, Brown DM, Qin N, Jiang M, Dietrich A, Zhu MX, Chen Z, Birnbaumer M, Mikoshiba K, Birnbaumer L, (1999). Modulation of Ca(2+) entry by polypeptides of the inositol 1,4, 5-trisphosphate receptor (IP3R) that bind transient receptor potential (TRP): evidence for roles of TRP and IP3R in store depletion-activated Ca(2+) entry. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96: 14669-71.
- Braun A, Varga-Szabo D, Kleinschnitz C, Pleines I, Bender M, Austinat M, Bösl M, Stoll G, Nieswandt B, (2009). Orail (CRACM1) is the platelet SOC channel and essential for pathological thrombus formation. *Blood.* 113: 2056-63.
- Briscoe CP, Tadayyon M, Andrews JL, Benson WG, Chambers JK, Eilert MM, Ellis C, Elshourbagy NA, Goetz AS, Minnick DT, Murdock PR, Sauls HR Jr, Shabon U, Spinage LD, Strum JC, Szekeres PG, Tan KB, Way JM, Ignar DM, Wilson S, Muir AI, (2003). The Orphan G Protein-coupled Receptor GPR40 Is Activated by Medium and Long Chain Fatty Acids. *J. Biol. Chem.* 278: 11303-11311.
- Brondello JM, Brunet A, Pouyssegur J, McKenzie FR, (1997). The dual specificity mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 and -2 are induced by the p42/p44MAPK cascade. *J Biol Chem.* 272: 1368-76.
- Brondello JM, Pouyssegur J, McKenzie FR, (1999). Reduced MAP kinase phosphatase-1 degradation after p42/p44MAPK-dependent phosphorylation. *Science.* 286:2514-7.
- Bruinsma KA, Taren DL, (2000). Dieting, essential fatty acid intake and depression. *Nutr Rev.* 58: 98-108.
- Buettner R, Parhofer KG, Woenckhaus M, Wrede CE, Kunz-Schughart LA, Schölmerich J, Bollheimer LC, (2006). Defining High-Fat-Diet rat models: metabolic and molecular effects of different fat types. *J. Mol. Endocrinol.* 36: 485–501.
- Burack WR, Sturgill TW, (1997). The activating dual phosphorylation of MAPK by MEK is nonprocessive. *Biochemistry.* 36:5929-33.
- Burgess JR, Stevens L, Zhang W, Peck L, (2000). Long-chain polyunsaturated fatty acids in children with attention- deficit hyperactivity disorder. *Am J Clin Nutr.* 71: 327S-330S.
- Cacace AM, Michaud NR, Therrien M, Mathes K, Copeland T, Rubin GM, Morrison DK, (1999). Identification of constitutive and ras-inducible phosphorylation sites of KSR: implications for 14-3-3 binding, mitogen-activated protein kinase binding, and KSR overexpression. *Mol Cell Biol.* 19: 229-40.
- Calviello G, Palozza P, Di Nicuolo F, Maggiano N, Bartoli GM, (2000). N-3 PUFA dietary supplementation inhibits proliferation and store-operated calcium influx in thymoma cells growing in Balb/c mice. *J Lipid Res.* 41: 182-9.
- Calviello G, Palozza P, Piccioni E, Maggiano N, Frattucci A, Franceschelli P, Bartoli GM, (1998). Dietary supplementation with eicosapepntaenoic and docosqahexaenoic acid inhibits growth of MLorris hepatocarcinoma 3924A in rats: effects on proliferation and apoptosis. *Int J Cancer.* 75: 699-705.

Références bibliographiques

- Camps M, Nichols A, Arkininstall S, (2000). Dual specificity phosphatases: a gene family for control of MAP kinase function. *Faseb J.* 14: 6-16.
- Camps M, Nichols A, Gillieron C, Antonsson B, Muda M, Chabert C, Boschert U, Arkininstall S, (1998). Catalytic activation of the phosphatase MKP-3 by ERK2 mitogen-activated protein kinase. *Science.* 280:1262-5.
- Cardone MH, Salvesen GS, Widmann C, Johnson G, Frisch SM, (1997). The regulation of anoikis: MEKK-1 activation requires cleavage by caspases. *Cell.* 90: 315-23.
- Carroll JM, Taichman LB, (1992). Characterization of the human involucrin promoter using a transient beta-galactosidase assay. *J Cell Sci.* 103: 925-30.
- Cartoni C, Yasumatsu K, Ohkuri T, Shigemura N, Yoshida R, Godinot N, le Coutre J, Ninomiya Y, Damak S, (2010). Taste preference for fatty acids is mediated by GPR40 and GPR120. *J Neurosci.* 30: 8376-8382.
- Chale-Rush A, Burgess JR, Mattes RD, (2007). Evidence for human orosensory (taste?) sensitivity to free fatty acids. *Chem Senses.* 32: 423-431.
- Chalon S, Vancassel S, Zimmer L, Guilloteau D, Durand G, (2001). Polyunsaturated fatty acids and cerebral function: focus on monoaminergic neurotransmission. *Lipids.* 36: 937-944.
- Chandrashekar J, Hoon MA, Ryba NJ, Zuker CS, (2006). The receptors and cells for mammalian taste. *Nature.* 444: 288–294.
- Chang F, Steelman LS, Lee JT, Shelton JG, Navolanic PM, Blalock WL, Franklin RA, McCubrey JA, (2003). Signal transduction mediated by the Ras/Raf/MEK/ERK pathway from cytokine receptors to transcription factors: potential targeting for therapeutic intervention. *Leukemia.* 17: 1263-93.
- Chaudhari N, Yang H, Lamp C, Delay E, Cartford C, Than T, Roper S, (1996). The taste of monosodium glutamate: membrane receptors in taste buds. *J. Neurosci.* 16:3817-3826.
- Chavez-Jauregui RN, Mattes RD, Parks EJ, (2010). Dynamics of Fat Absorption and Effect of Sham Feeding on Postprandial Lipema. *Gastroenterology.* 139: 1538-48.
- Chen K, Febbraio M, Li2 W, Silverstein RL, (2008). A specific CD36-dependent signaling pathway is required for platelet activation by oxLDL. *Circ Res.* 102 (12): 1512–19
- Chen Z, Gibson TB, Robinson F, Silvestro L, Pearson G, Xu B, Wright A, Vanderbilt C, Cobb MH, (2001). MAP kinases. *Chem Rev.* 101:2449-76.
- Chen Z, Seimiya H, Naito M, Mashima T, Kizaki A, Dan S, Imaizumi M, Ichijo H, Miyazono K, Tsuruo T, (2003). Mechanism of p38 MAP kinase activation in vivo. *Genes Dev.* 17: 1969-78.
- Chen, Z., H. Seimiya, M. Naito, T. Mashima, A. Kizaki, S. Dan, M. Imaizumi, H. Ichijo, K. Miyazono, and T. Tsuruo. 1999. ASK1 mediates apoptotic cell death induced by genotoxic stress. *Oncogene* 18:173-80.
- Chinnakkaruppan A, Rosenblum K, (2012). The role of protein phosphorylation in the gustatory cortex and amygdale during taste learning. *Exp Neurobiol.* 21: 37-51.
- Chiu VK, Bivona T, Hach A, Sajous JB, Silletti J, Wiener H, Johnson RL 2nd, Cox AD, Philips MR, (2002). Ras signalling on the endoplasmic reticulum and the Golgi. *Nat Cell Biol.* 4: 343-50.
- Choeiri C, Staines W, Miki T, Seino S, Messier C, (2005). Glucose transporter plasticity during memory processing. *Neuroscience.* 130: 591-600.

Références bibliographiques

- Chong H, Vikis HG, Guan KL, (2003). Mechanisms of regulating the Raf kinase family. *Cell Signal*. 15: 463-9.
- Clapham DE, (2003). TRP channels as cellular sensors. *Nature*. 426: 517-24.
- Cohn ZJ, Kim A, Huang L, Brand J, Wang H, (2010). Lipopolysaccharide-induced inflammation attenuates taste progenitor cell proliferation and shortens the life span of taste bud cells. *BMC Neurosci*. doi: 10.1186/1471-2202-11-72. 11: 72.
- Corbit KC, Trakul N, Eves EM, Diaz B, Marshall M, Rosner MR, (2003). Activation of Raf-1 signaling by protein kinase C through a mechanism involving Raf kinase inhibitory protein. *J Biol Chem*. 278:13061-8.
- Cretzschmar J, (1828)." In atlas zu der Reise in Nördlichen Afrika". Sangethiere, von Eduard Rüppel, 56-58.
- Crystal SR, Teff KL, (2006). Tasting fat: cephalic phase hormonal responses and food intake in restrained and unrestrained eaters. *Physiol Behav*. 89: 213-220.
- Cutler RE Jr, Stephens RM, Saracino MR, Morrison DK, (1998). Autoregulation of the Raf-1 serine/threonine kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 95: 9214-9.
- Daly M, Daly S, (1973)." On the feeding ecology of *Psammomys obesus* (Rodentia, gerbillidae) in the wadi saoura, Algeria ". *Mammalia*. 35: 546-561.
- Das UN, (1991). Tumoricidal action of cis-unsaturated fatty acids and their relationship to free radicals and lipid peroxidation. *Cancer Lett*. 56: 235-243.
- Das UN, (1999). Essential fatty acids, lipid peroxidation and apoptosis. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*.61: 157-163
- Davies SP, Reddy H, Caivano M, Cohen P, (2000). Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors. *Biochem J*. 351: 95-105.
- Davies H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S, Teague J, Woffendin H, Garnett MJ, Bottomley W, Davis N, Dicks E, Ewing R, Floyd Y, Gray K, Hall S, Hawes R, Hughes J, Kosmidou V, Menzies A, Mould C, Parker A, Stevens C, Watt S, Hooper S, Wilson R, Jayatilake H, Gusterson BA, Cooper C, Shipley J, Hargrave D, Pritchard-Jones K, Maitland N, Chenevix-Trench G, Riggins GJ, Bigner DD, Palmieri G, Cossu A, Flanagan A, Nicholson A, Ho JW, Leung SY, Yuen ST, Weber BL, Seigler HF, Darrow TL, Paterson H, Marais R, Marshall CJ, Wooster R, Stratton MR, Futreal PA, (2002). Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature*. 417: 949-54.
- De Caterina R, Basta G, Madonna R, Statile D, Zimarino M, Gallina S, Procopio AD, (2000). Endothelial cell transfections: a way for studying promoter activity of genes involved in atherogenesis. *Ital Heart J*. 3: S55-58.
- De Fea KA, Zalevsky J, Thoma MS, Déry O, Mullins RD, Bunnett NW, (2000). beta-arrestin-dependent endocytosis of proteinase-activated receptor 2 is required for intracellular targeting of activated ERK1/2. *J Cell Biol*. 148: 1267-81.
- Degen AA, (1993). " Energy requirements of the fat sand rat (*Psammomys obesus*) when consuming the salt bush, *Atriplex halimus*: a review". *J Basic Clin Physiol Pharmacol*. 4: 13-28.
- Delion S, Chalon S, Guilloteau D, Lejeune B, Besnard JC, Durand G, (1997). Age-related changes in phospholipids fatty acid composition and monoaminergic neurotransmission in the hippocampus of rats fed a balanced or an n-3 polyunsaturated fatty acid -deficient diet. *J Lipid Res*. 38: 680-689.

Références bibliographiques

- DeNigris SJ, Hamosh M, Kasbekar DK, Lee TC, Hamosh P, (1988). Lingual and gastric lipases: species differences in the origin of prepancreatic digestive lipases and in the localization of gastric lipase. *Biochim Biophys Acta*. 959: 38-45.
- Dérijard B, Hibi M, Wu IH, Barrett T, Su B, Deng T, Karin M, Davis RJ, (1994). JNK1: a protein kinase stimulated by UV light and Ha-Ras that binds and phosphorylates the c-Jun activation domain. *Cell*. 76: 1025-37.
- Dérijard B, Raingeaud J, Barrett T, Wu IH, Han J, Ulevitch RJ, Davis RJ, (1995). Independent human MAP-kinase signal transduction pathways defined by MEK and MKK isoforms. *Science*. 267: 682-5.
- Dhillon AS, Pollock C, Steen H, Shaw PE, Mischak H, Kolch W, (2002). Cyclic AMP-dependent kinase regulates Raf-1 kinase mainly by phosphorylation of serine 259. *Mol Cell Bio*. 22: 3237-46.
- Dougherty MK, Müller J, Ritt DA, Zhou M, Zhou XZ, Copeland TD, Conrads TP, Veenstra TD, Lu KP, Morrison DK, (2005). Regulation of Raf-1 by direct feedback phosphorylation. *Mol Cell*. 17: 215-24.
- Downward J, (1996). Control of ras activation. *Cancer Surv*. 27: 87-100.
- Dramane G, Akpona S, Simonin AM, Besnard P, Khan NA (2011). Cell signaling mechanisms of gustatory perception of lipids: can the taste cells be the target of anti-obesity agents? *Curr Med Chem*. 18:3417-22.
- Drewnowski A, Brunzell JD, Sande K, Iverius PH, Greenwood MR, (1985). Sweet tooth reconsidered: taste responsiveness in human obesity. *Physiol. Behav*. 35: 617-622.
- Dreyer C, Keller H, Mahflmdi A, Laudet V, Krey G, Wahli W, (1993). Positive regulation of the peroxisomal β oxidation pathway by fatty acids through activation of peroxisome proliferator activated receptors (PPAR). *Biol Cell*. 77: 67-76.
- Dudley DT, Pang L, Decker SJ, Bridges AJ, Saltiel AR, (1995). A synthetic inhibitor of the mitogen-activated protein kinase cascade. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 92: 7686-9.
- Dumaz N, Light Y, Marais R, (2002). Cyclic AMP blocks cell growth through Raf-1-dependent and Raf-1-independent mechanisms. *Mol Cell Biol*. 22: 3717-28.
- Dupont E, Stevens L, Cochon L, Falempin M, Bastide B, Canu MH, (2011). ERK is involved in the reorganization of somatosensory cortical maps in adult rats submitted to hindlimb unloading. *PLoS One*. 6:e17564
- Eblen ST, Slack-Davis JK, Tarcsafalvi A, Parsons JT, Weber MJ, Catling AD, (2004). Mitogen-activated protein kinase feedback phosphorylation regulates MEK1 complex formation and activation during cellular adhesion. *Mol Cell Biol*. 24: 2308-17.
- Ehrenreiter K, Piazzolla D, Velamoor V, Sobczak I, Small JV, Takeda J, Leung T, Baccarini M, (2005). Raf-1 regulates Rho signaling and cell migration. *J Cell Biol*. 168:955-64.
- El-Yassimi A, Hichami A, Besnard P, Khan NA, (2008). Linoleic acid induces calcium signaling, SRC-kinase phosphorylation and neurotransmitters release in mouse CD36-positive gustatory cells. *J. Biol. Chem*. 283: 12949-12959.
- Fabian JR, Daar IO, Morrison DK, (1993). Critical tyrosine residues regulate the enzymatic and biological activity of Raf-1 kinase. *Mol Cell Biol*. 13: 7170-9.
- Favata MF, Horiuchi KY, Manos EJ, Daulerio AJ, Stradley DA, Feeser WS, Van Dyk DE, Pitts WJ, Earl RA, Hobbs F, Copeland RA, Magolda RL, Scherle PA, Trzaskos JM, (1998). Identification of a novel inhibitor of mitogen-activated protein kinase kinase. *J Biol Chem* 273:18623-32.

Références bibliographiques

- Ferrell JE Jr, Bhatt RR, (1997). Mechanistic studies of the dual phosphorylation of mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem.* 272: 19008-16.
- Feske S, (2009). ORAI1 and STIM1 deficiency in human and mice: roles of store-operated Ca^{2+} entry in the immune system and beyond. *Immunol Rev.* 231: 189-209.
- Feske S, (2010). CRAC channelopathies. *Pflugers Arch.* 460: 417-35.
- Feske S, Gwack Y, Prakriya M, Srikanth S, Puppel SH, Tanasa B, Hogan PG, Lewis RS, Daly M, Rao A, (2006). A mutation in Orai1 causes immune deficiency by abrogating CRAC channel function. *Nature.* 441: 179-85.
- Feske S, Skolnik EY, Prakriya M, (2012). Ion channels in lymphocyte function and immunity. *Nat Rev Immunol.* 12: 532-47.
- Finstad HS, Drevon CA, Kulseth MA, Synstad AV, Knudsen E, Kolset SO, (1998). Cell proliferation, apoptosis and accumulation of lipid droplets in U9376-1 cells incubated with eicosapentaenoic acid. *Biochem J.* 336: 451-9.
- Formstecher E, Ramos JW, Fauquet M, Calderwood DA, Hsieh JC, Canton B, Nguyen XT, Barnier JV, Camonis J, Ginsberg MH, Chneiweiss H, (2001). PEA-15 mediates cytoplasmic sequestration of ERK MAP kinase. *Dev Cell.* 1:239-50.
- Frenkel G, Shaham Y, Kraicer PF, (1972). " Establishment of conditions for the sandrat *Psammomys obesus* ". *Laboratory animal sciences.* 22: 40-47.
- Fujikawa K, Miletic AV, Alt FW, Faccio R, Brown T, Hoog J, Fredericks J, Nishi S, Mildiner S, Moores SL, Brugge J, Rosen FS, Swat W, (2003). Vav1/2/3-null mice define an essential role for Vav family proteins in lymphocyte development and activation but a differential requirement in MAPK signaling in T and B cells. *J Exp Med.* 198:1595-608.
- Fukuda M, Gotoh I, Adachi M, Gotoh Y, Nishida E, (1997). A novel regulatory mechanism in the mitogen-activated protein (MAP) kinase cascade. Role of nuclear export signal of MAP kinase kinase. *J Biol Chem.* 272: 32642-8.
- Fukuwatari T, Kawada T, Tsuruta M, Hiraoka T, Iwanaga T, Sugimoto E, Fushiki T, (1997). Expression of the putative membrane fatty acid transporter (FAT) in taste buds of the circumvallate papillae in rats. *FEBS Lett.* 414 : 461-4.
- Fukuwatari T, Shibata K, Iguchi K, Saeki T, Iwata A, Tani K, Sugimoto E, Fushiki T, (2003). Role of gustation in the recognition of oleate and triolein in anosmic rats. *Physiol Behav.* 78: 579-83.
- Fumeron F, Brigant L, Ollivier V, de Prost D, Driss F, Darcet P, Bard JM, Parra HJ, Fruchart JC, Apfelbaum M, (1991). n-3 polyunsaturated fatty acids raise low-density lipoproteins, high-density lipoprotein 2, and plasminogen-activator inhibitor in healthy young men. *Am J Clin Nutr.* 54: 118-22.
- Gachelin G, (2008). De l'animal expérimental au modèle en recherche biomédicale. *Recherches Epistémologiques et Historiques sur les Sciences Exactes et les Institutions Scientifiques (REHSEIS)*, 1: 1-8)
- Gaillard D, Laugerette F, Darcel N, El-Yassimi A, Passilly-Degrace P, Hichami A, Khan NA, Montmayeur JP, Besnard P, (2008). The gustatory pathway is involved in CD36-mediated orosensory perception of long-chain fatty acids in the mouse. *FASEB J.* 22:1458-68.
- Gaudillière J-P, (2006). Produire et utiliser les souris in bred, complexe biomedical, cancer et obésité aux Etats-Unis après 1945 in G. Gachelin(dir). *Les organismes modèles dans la recherche médicale. Presses universitaires de France, Paris, 163-180.*

Références bibliographiques

- Gilbertson TA, Boughter JD Jr, (2003). Taste transduction: appetizing times in gustation. *Neuroreport*. 14: 905-911.
- Gilbertson TA, Fontenot DT, Liu L, Zhang H, Monroe WT, (1997). Fatty acid modulation of K⁺ channels in taste receptor cells: gustatory cues for dietary fat. *Am J Physiol*. 272: C1203-1210.
- Gilbertson TA, Liu L, Kim I, Burks CA, Hansen DR, (2005). Fatty acid responses in taste cells from obesity-prone and -resistant rats. *Physiol Behav*. 86: 681-690.
- Giroux S, Tremblay M, Bernard D, Cardin-Girard JF, Aubry S, Larouche L, Rousseau S, Huot J, Landry J, Jeannotte L, Charron J, (1999). Embryonic death of Mek1-deficient mice reveals a role for this kinase in angiogenesis in the labyrinthine region of the placenta. *Curr Biol*. 9:369-72.
- Glading A, Bodnar RJ, Reynolds IJ, Shiraha H, Satish L, Potter DA, Blair HC, Wells A, (2004). Epidermal growth factor activates m-calpain (calpain II), at least in part, by extracellular signal-regulated kinase-mediated phosphorylation. *Mol Cell Biol*. 24: 2499-512.
- Glatz JF, Lagarde M, (2007). Lipid sensing and lipid sensors. *Cell Mol Life Sci*. 64: 2449-51.
- Goeldner C, Reiss D, Wichmann J, Meziane H, Kieffer BL, Ouagazzal AM, (2008). Nociceptin receptor impairs recognition memory *via* interaction with NMDA receptor-dependent mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase signaling in the hippocampus. *J Neurosci*. 28: 2190-2198.
- Goetz CA, O'Neil JJ, Farrar MA, (2003). Membrane localization, oligomerization, and phosphorylation are required for optimal raf activation. *J Biol Chem*. 278: 51184-9.
- Gonzalez FA, Seth A, Raden DL, Bowman DS, Fay FS, Davis RJ, (1993). Serum-induced translocation of mitogen-activated protein kinase to the cell surface ruffling membrane and the nucleus. *J Cell Biol*. 122:1089-101.
- Graves LM, Guy HI, Kozlowski P, Huang M, Lazarowski E, Pope RM, Collins MA, Dahlstrand EN, Earp HS 3rd, Evans DR, (2000). Regulation of carbamoyl phosphate synthetase by MAP kinase. *Nature*. 403: 328-32.
- Gredinger E, Gerber AN, Tamir A, Tapscott SJ, Bengal E, (1998). Mitogen-activated protein kinase pathway is involved in the differentiation of muscle cells. *J Biol Chem*. 273:10436-44.
- Gruarin P, Thorne RF, Dorahy DJ, Burns GF, Sitia R, Alessio M, (2000). CD36 is a ditopic glycoprotein with the N-terminal domain implicated in intracellular transport. *Biochem Biophys Res Commun*. 275: 446-54.
- Gupta S, Campbell D, Derijard B, Davis RJ, (1995). Transcription factor ATF2 regulation by the JNK signal transduction pathway. *Science* 267:389-93.
- Gwack Y, Srikanth S, Feske S, Cruz-Guilloty F, Oh-hora M, Neems DS, Hogan PG, Rao A, (2007). Biochemical and functional characterization of Orai proteins. *J Biol Chem*. 282: 16232-43.
- Hamosh M, Burns WA, (1977). Lipolytic activity of human lingual glands (Ebner). *Lab Invest*. 37: 603-08.
- Hamosh M, Scow RO, (1973a). Lingual lipase and its role in the digestion of dietary lipid. *J Clin Invest*. 52: 88-95.
- Hamosh M, Scow RO, (1973b). Lingual lipase. *Symp Oral Sens Percept*. 4: 311-22.
- Harmon CM, Luce P, Beth AH, Abumrad NA, (1991). Labeling of adipocyte membranes by sulfo-N-succinimidyl derivatives of long-chain fatty acids: inhibition of fatty acid transport. *J Membr Biol*. 121: 261-8.

Références bibliographiques

- Harrer MI, Travers SP, (1996). Topographic organization of Fos-like immunoreactivity in the rostral nucleus of the solitary tract evoked by gustatory stimulation with sucrose and quinine. *Brain Res.* 711: 125-137.
- Haslam DW, James WPT, (2005). Obesity. *Lancet.* 366: 1197-1209.
- Hatano N, Mori Y, Oh-hora M, Kosugi A, Fujikawa T, Nakai N, Niwa H, Miyazaki J, Hamaoka T, Ogata M, (2003). Essential role for ERK2 mitogenactivated protein kinase in placental development. *Genes Cells* 8:847-56.
- Henderson YC, Chen Y, Frederick MJ, Lai SY, Clayman GL, (2010). MEK inhibitor PD0325901 significantly reduces the growth of papillary thyroid carcinoma cells in vitro and in vivo. *Mol Cancer Ther.* 9: 1968-76.
- Hennen G, (1995). Les matériaux biologiques de base. In: Hennen G., Biochimie 1er cycle. *Dunod (Paris)* : 8-35.
- Hirasawa A, Tsumaya K, Awaji T, Katsuma S, Adachi T, Yamada M, Sugimoto Y, Miyazaki S, Tsujimoto G, (2005). Free fatty acids regulate gut incretin glucagon-like peptide-1 secretion through GPR120. *Nat Med.* 11: 90-94.
- Ho AS, Hori E, Nguyen PH, Urakawa S, Kondoh T, Torii K, Ono T, Nishijo H, (2011). Hippocampal neuronal responses during signaled licking of gustatory stimuli in different contexts. *Hippocampus.* 21: 502-519.
- Holman RT, (1970). Biological activities of polyunsaturated fatty acids. *Prog Chem fats lipids.* IX: 607-682.
- Honore E, Barhanin J, Attali B, Lesage F, Lazdunski M, (1994). External blockade of the major cardiac delayed-rectifier K⁺ channel (Kv1.5) by polyunsaturated fatty acids. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91: 1937-1941.
- Hoogstraal H, (1963). " A brief review of the contemporary land mammals of Egypt (including sinäï)". *J. Egypt. Publ. Health. Assn.* 38: 1-35.
- Horrobin DF, (1988). The membrane phospholipids hypothesis as a biochemical basis for the neurodevelopmental concept of schizophrenia. *Schizophr Res.* 30: 193-208.
- Hoth M, Penner R, (1992). Depletion of intracellular calcium stores activates a calcium current in mast cells. *Nature.* 355: 353-56.
- Huang AL, Chen X, Hoon MA, Chandrashekar J, Guo W, Tränkner D, Ryba NJ, Zuker CS, (2006). The cells and logic for mammalian sour taste detection. *Nature.* 442: 934-8.
- Huang C, Jacobson K, Schaller MD, (2004). MAP kinases and cell migration. *J Cell Sci.* 117:4619-28.
- Huang MM, Bolen JB, Barnwell JW, Shattil SJ, Brugge JS, (1991). Membrane glycoprotein IV (CD36) is physically associated with the Fyn, Lyn, and Yes protein-tyrosine kinases in human platelets. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 88: 7844-7848.
- Jaumot M, Hancock JF, (2001). Protein phosphatases 1 and 2A promote Raf-1 activation by regulating 14-3-3 interactions. *Oncogene.* 20: 3949-58.
- Jayaraman T, Ondriasova E, Ondrias K, Harnick DJ, Marks AR, (1995). The inositol 1,4,5-trisphosphate receptor is essential for T-cell receptor signaling. *Proc Natl Acad Sci US A.* 92: 6007-11.
- Ji W, Xu P, Li Z, Lu J, Liu L, Zhan Y, Chen Y, Hille B, Xu T, Chen L, (2008). Functional stoichiometry of the unitary calcium-release-activated calcium channel. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 105: 13668-73.

Références bibliographiques

- Jiang LH, Yan S, Wang J, Liang QY, (2013). Oral administration of docosahexaenoic acid activates the GDNF-MAPK-CERB pathway in hippocampus of natural aged rat (2013). *Pharm Biol.* [Epub ahead of print]
- Jones MW, Errington ML, French PJ, Fine A, Bliss TV, Garel S, Charnay P, Bozon B, Laroche S, Davis S, (2009). A requirement for the immediate early gene *Zif268* in the expression of late LTP and long-term memories. *Nature Neuroscience.* 4: 289-296.
- June CH, Fletcher MC, Ledbetter JA, Schieven GL, Siegel JN, Phillips AF, Samelson LE, (1990). Inhibition of tyrosine phosphorylation prevents T-cell receptor-mediated signal transduction. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 87: 7722-26.
- Juo P, Kuo CJ, Reynolds SE, Konz RF, Raingeaud J, Davis RJ, Biemann HP, Blenis J, (1997). Fas activation of the p38 mitogen-activated protein kinase signalling pathway requires ICE/CED-3 family proteases. *Mol Cell Biol.* 17: 24-35.
- Kahle W, Leonhardt H, Platzer W, Cabrol C, (1998). Anatomie, 3, Système nerveux et organes des sens - Flammarion Médecine-Sciences, Paris, 372 p.
- Kaiser N, Cerasi E, Leibowitz G, (2012). Diet-induced diabetes in the sand rat (*Psammomys obesus*). *Methods Mol Biol.* 933: 89-102.
- Kalderon B, Gutman A, Levy E, Shafir E, Adler JH, (1996). Characterization of stages in the development of obesity-diabetes syndrome in sand rat (*Psammomys obesus*). *Diabetes.* 6: 717-724.
- Kanety H, Moshe S, Shafir E, Lunenfeld B, Karasik A, (1994). Hyperinsulinemia induces a reversible impairment in insulin receptor function leading to diabetes in the sand rat model of non-insulindependent diabetes mellitus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91: 1853-1857.
- Kawai T, Fushiki T, (2003). Importance of lipolysis in oral cavity for orosensory detection of fat. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 285: R447-54.
- Kelley DS, Branch LB, Love JE, Taylor PC, Rivera YML, Iacono JM, (1991). Dietary alpha-linolenic acid and immunocompetence in humans. *Am J Clin Nutr.* 53: 40-46.
- Kelly A, Laroche S, Davis S, (2003). Activation of mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase in hippocampal circuitry is required for consolidation and reconsolidation of recognition memory. *J. Neurosci.* 23: 5354–5360.
- Keyse SM, (2000). Protein phosphatases and the regulation of mitogen-activated protein kinase signalling. *Curr Opin Cell Biol* 12: 186-92.
- Khokhlatchev AV, Canagarajah B, Wilsbacher J, Robinson M, Atkinson M, Goldsmith E, Cobb MH, (1998). Phosphorylation of the MAP kinase ERK2 promotes its homodimerization and nuclear translocation. *Cell* 93: 605-15.
- Klemke RL, Cai S, Giannini AL, Gallagher PJ, de Lanerolle P, Cheresch DA, (1997). Regulation of cell motility by mitogen-activated protein kinase. *J Cell Biol.* 137:481-92.
- Kolch W, (2000). Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions. *Biochem J.* 351 Pt 2: 289-305.
- Kontoyiannis D, Kotlyarov A, Carballo E, Alexopoulou L, Blackshear PJ, Gaestel M, Davis R, Flavell R, Kollias G, (2001). Interleukin-10 targets p38 MAPK to modulate ARE-dependent TNF mRNA translation and limit intestinal pathology. *Embo J.* 20: 3760-70.
- Kretschmer BD, Schelling P, Beier N, Liebscher C, Treutel S, Krüger N, Scholz HP, Haus A, (2005). Modulatory role of food, feeding regime and physical exercise on body weight and insulin resistance. *Life Sci.* 76: 1553–1573.

Références bibliographiques

- Kromann N, Green A, (1980). Epidemiological studies in the Upernavik district, Greenland Incidence of some chronic diseases 1950-1974. *Acta Med Scand.* 208: 401-06.
- Kromhout D, (1989). Food consumption patterns in the Seven Countries Study. Seven Countries Study Research Group. *Ann Med.* 21: 237-8.
- Krysan, K, Dalwadi H, Sharma S, Pold M, Dubinett S, (2004). Cyclooxygenase 2-dependent expression of survivin is critical for apoptosis resistance in non-small cell lung cancer. *Cancer Res.* 64: 6359-62.
- Kuan CY, Yang DD, Samanta Roy DR, Davis RJ, Rakic P, Flavell RA, (1999). The Jnk1 and Jnk2 protein kinases are required for regional specific apoptosis during early brain development. *Neuron.* 22: 667-76.
- Kuda O, Jenkins CM, Skinner JR, Moon SH, Su X, Gross RW, Abumrad NA, (2011). CD36 Protein Is Involved in Store-operated Calcium Flux, Phospholipase A2 Activation, and Production of Prostaglandin E2. *J. Biol. Chem.* 286: 17785–17795.
- Kurihara K, Kashiwayanagi M, (1998). Introductory remarks on umami taste. *Annals NY Acad Sci.* 855: 393-397.
- Kyriakis JM, Avruch J, (2001). Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiol Rev.* 81:807-69.
- Kyriakis JM, Banerjee P, Nikolakaki E, Dai T, Rubie EA, Ahmad MF, Avruch J, Woodgett JR, (1994). The stress-activated protein kinase subfamily of c-Jun kinases. *Nature.* 369:156-60.
- Laugerette F, Gaillard D, Passilly-Degrace P, Niot I, Besnard P, (2007). Do we taste fat? *Biochimie.* 89: 265-9.
- Laugerette F, Passilly-Degrace P, Patris B, Niot I, Febbraio M, Montmayeur JP, Besnard P, (2005). CD36 involvement in orosensory detection of dietary lipids, spontaneous fat preference, and digestive secretions. *J Clin Invest.* 115(11):3177–3184.
- Lauritzen L, Hansen HS, Jorgensen MMH, Michaelsen KF, (2001). The essentiality of long chain n-3 fatty acids in relation to development and function of the brain and retina. *Prog Lipid Res.* 40: 1-94.
- Lavoie JN, L'Allemain G, Brunet A, Müller R, Pouyssegur J, (1996). Cyclin D1 expression is regulated positively by the p42/p44MAPK and negatively by the p38/HOGMAPK pathway. *J Biol Chem.* 271: 20608-16.
- Le Magnen J, (1974). Advances in studies in the physiological control and regulation of food intake. In: Progress in Physiological Psychology, edited by E. Stellar and J. M. Sprague. New-York: Academic Press, 204-261.
- Lenormand P, Sardet C, Pages G, L'Allemain G, Brunet A, Pouyssegur J, (1993). Growth factors induce nuclear translocation of MAP kinases (p42mapk and p44mapk) but not of their activator MAP kinase kinase (p45mapkk) in fibroblasts. *J Cell Biol.* 122:1079-88.
- Li W, Han M, Guan KL, (2000). The leucine-rich repeat protein SUR-8 enhances MAP kinase activation and forms a complex with Ras and Raf. *Genes Dev.* 14:895-900.
- Liao J, Schultz PG, (2003). Three sweet receptor genes are clustered in human chromosome 1. *Mammalian Genome.* 14: 291-301.
- Lindemann B, (2001). Receptors and transduction in taste. *Nature.* 413: 219–225.
- Liu HX, Henson BS, Zhou Y, D'Silva NJ, Mistretta CM, (2008). Fungiform papilla pattern: regulates inter-papilla lingual epithelium and decreases papilla number by means of PI3K/Akt, MEK/ERK, and p38 MAPK signaling. *Dev Dynam.* 237:2378-93.

Références bibliographiques

- Liu J, Lin A, (2005). Role of JNK activation in apoptosis: a double-edged sword. *Cell Res* 15:36-42.
- Liu L, Hansen DR, Kim I, Gilbertson TA, (2005). Expression and characterization of delayed rectifying K⁺ channels in anterior rat taste buds. *Am J Physiol Cell Physiol.* 289: C868-880.
- Liu S, Thomas SM, Woodside DG, Rose DM, Kiosses WB, Pfaff M, Ginsberg MH, (1999). Binding of paxillin to alpha4 integrins modifies integrindependent biological responses. *Nature.* 402:676-81.
- Lorenz K, Lohse MJ, Qwitterer U, (2003). Protein kinase C switches the Raf kinase inhibitor from Raf-1 to GRK-2. *Nature.* 426:574-9.
- Luttrell LM, Ferguson SS, Daaka Y, Miller WE, Maudsley S, Della Rocca GJ, Lin F, Kawakatsu H, Owada K, Luttrell DK, Caron MG, Lefkowitz RJ, (1999). Beta-arrestin-dependent formation of beta2 adrenergic receptor-Src protein kinase complexes. *Science.* 283: 655-61.
- Manji SS, Parker NJ, Williams RT, van Stekelenburg L, Pearson RB, Dziadek M, Smith PJ, (2000). STIM1: a novel phosphoprotein located at the cell surface. *Biochim Biophys Acta.* 1481: 147-55.
- Mansour SJ, Candia JM, Matsuura JE, Manning MC, Ahn NG, (1996). Interdependent domains controlling the enzymatic activity of mitogen-activated protein kinase kinase 1. *Biochemistry.* 35: 15529-36.
- Marais R, Light Y, Paterson HF, Mason CS, Marshall CJ, (1997). Differential regulation of Raf-1, A-Raf, and B-Raf by oncogenic ras and tyrosine kinases. *J Biol Chem.* 272:4378-83.
- Marchetti S, Gimond C, Chambard JC, Touboul T, Roux D, Pouyssegur J, Pagès G, (2005). Extracellular signal-regulated kinases phosphorylate mitogen-activated protein kinase phosphatase 3/DUSP6 at serines 159 and 197, two sites critical for its proteasomal degradation. *Mol Cell Biol.* 25:854-64.
- Marchetti S, Gimond C, Chambard JC, Touboul T, Roux D, Pouyssegur J, Pagès G, (2005). Extracellular signal-regulated kinases phosphorylate mitogenactivated protein kinase phosphatase 3/DUSP6 at serines 159 and 197, two sites critical for its proteasomal degradation. *Mol Cell Biol* 25: 854-64.
- Martin C, Passilly-Degrace P, Gaillard D, Merlin JF, Chevrot M, Besnard P, (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.
- Mason CS, Springer CJ, Cooper RG, Superti-Furga G, Marshall CJ, Marais R, (1999). Serine and tyrosine phosphorylations cooperate in Raf-1, but not B-Raf activation. *Embo J.* 18:2137-48.
- Matheny SA, Chen C, Kortum RL, Razidlo GL, Lewis RE, White MA, (2004). Ras regulates assembly of mitogenic signalling complexes through the effector protein IMP. *Nature.* 427: 256-60.
- Matsumura S, Mizushige T, Yoneda T, Iwanaga T, Tsuzuki S, Inoue K, Fushiki T, (2007). GPR expression in the rat taste bud relating to fatty acid sensing. *Biomed Res.* 28: 49- 55.
- Mattes RD, (1996). Oral fat exposure alters postprandial lipid metabolism in humans. *Am J Clin Nutr.* 63: 911-917.
- Mattes RD, (2001a). Oral exposure to butter, but not fat replacers elevates postprandial triacylglycerol concentration in humans. *J Nutr.* 131: 1491-1496.

Références bibliographiques

- Mattes RD, (2001b). The taste of fat elevates postprandial triacylglycerol. *Physiol Behav.* 74: 343-348.
- Mattes RD, (2002). Oral fat exposure increases the first phase triacylglycerol concentration due to release of stored lipid in humans. *J Nutr.* 132: 3656-3662.
- Mattes RD, (2005). Fat taste and lipid metabolism in humans. *Physiol Behav.* 86: 691-697.
- Mazzucchelli C, Vantaggiato C, Ciamei A, Fasano S, Pakhotin P, Krezel W, Welzl H, Wolfer DP, Pagès G, Valverde O, Marowsky A, Porrazzo A, Orban PC, Maldonado R, Ehrenguber MU, Cestari V, Lipp HP, Chapman PF, Pouysségur J, Brambilla R, (2002). Knockout of ERK1 MAP kinase enhances synaptic plasticity in the striatum and facilitates striatal-mediated learning and memory. *Neuron.* 34:807-20.
- McCormack DN, Clyburn VL, Pittman DW, (2006). Detection of free fatty acids following a conditioned taste aversion in rats. *Physiol Behav.* 87: 582-594.
- McDonald PH, Chow CW, Miller WE, Laporte SA, Field ME, Lin FT, Davis RJ, Lefkowitz RJ, (2000). Beta-arrestin 2: a receptor-regulated MAPK scaffold for the activation of JNK3. *Science.* 290: 1574-7.
- Mela DJ, (1988). Sensory assessment of fat content in fluid dairy products. *Appetite.* 10: 37-44.
- Mela DJ, Sacchetti DA, (1991). Sensory preferences for fats: relationships with diet and body composition. *Am. J. Clin. Nutr.* 53: 908-915.
- Mischak H, Seitz T, Janosch P, Eulitz M, Steen H, Schellerer M, Philipp A, Kolch W, (1996). Negative regulation of Raf-1 by phosphorylation of serine 621. *Mol Cell Biol.* 16: 5409-18.
- Miyamoto T, Miyazaki T, Okada Y, Sato T, (1996). Whole-cell recording from non-dissociated taste cells in mouse taste bud. *J Neurosci Methods.* 64:245-52.
- Montell C, (1997). New light on TRP and TRPL. *Mol.Pharmacol.* 52: 755-763.
- Mori TA, Beilin LJ, (2004). Omega-3 fatty acids and inflammation. *Curr Atheroscler Rep.* 6:461-67.
- Müller J, Cacace AM, Lyons WE, McGill CB, Morrison DK, (2000). Identification of B-KSR1, a novel brain-specific isoform of KSR1 that functions in neuronal signaling. *Mol Cell Biol.* 20: 5529-39.
- Nakajima H, Kubo T, Semi Y, Itakura M, Kuwamura M, Izawa T, Azuma YT, Takeuchi T, (2012). A rapid, targeted, neuron-selective, in vivo knockdown following a single intracerebroventricular injection of a novel chemically modified siRNA in the adult rat brain. *J Biotechnol.* 157: 326-33.
- Nantel A, Mohammad-Ali K, Sherk J, Posner BI, Thomas DY, (1998). Interaction of the Grb10 adapter protein with the Raf1 and MEK1 kinases. *J Biol Chem.* 273: 10475-84.
- Nelson G, Chandrashekar J, Hoon MA, Feng L, Zhao G, Ryba NJ, Zuker CS (2002) An amino-acid taste receptor. *Nature* 416: 199-202.
- Nelson G, Hoon MA, Chandrashekar J, Zhang Y, Ryba NJ, Zuker CS, (2001).Mammalian Sweet taste receptors. *Cell.* 106: 381-390.
- Neuringer M, Connor WE, Lin DS, Barstad L, Luck S, (1986). Biochemilcalk and functional effects of prenatal and postnatal omega 3 fatty acid deficiency on retina and brain in rhesus monkeys. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 83: 4021-4025.
- Neuroreport.* 14: 905-911.

Références bibliographiques

- Nguyen A, Burack WR, Stock JL, Kortum R, Chaika OV, Afkarian M, Muller WJ, Murphy KM, Morrison DK, Lewis RE, McNeish J, Shaw AS, (2002). Kinase suppressor of Ras (KSR) is a scaffold which facilitates mitogenactivated protein kinase activation in vivo. *Mol Cell Biol.* 22: 3035-45.
- Niot I, Poirier H, Besnard P, (1997). Regulation of gene expression by fatty acids: special reference to fatty acid-binding protein (FABP). *Biochimie.* 79: 129-33.
- Nishizuka Y, (1986). Studies and perspectives of protein kinase C. *Science.* 233: 305-12.
- Nishizuka Y, (1988). The molecular heterogeneity of protein kinase C and its implications for cellular regulation. *Nature* 25: 661-65.
- Ohmachi M, Rocheleau CE, Church D, Lambie E, Schedl T, Sundaram MV, (2002). C. elegans ksr-1 and ksr-2 have both unique and redundant functions and are required for MPK-1 ERK phosphorylation. *Curr Biol.* 12: 427-33.
- Oike H, Matsumoto I, Abe K, (2006a). Group IIA phospholipase A(2) is coexpressed with SNAP-25 in mature taste receptor cells of rat circumvallate papillae. *J Comp Neurol.* 494: 876-86.
- Oike H, Wakamori M, Mori Y, Nakanishi H, Taguchi R, Misaka T, Matsumoto I, Abe K, (2006b). Arachidonic acid can function as a signaling modulator by activating the TRPM5 cation channel in taste receptor cells. *Biochim Biophys Acta.* 1761: 1078-84.
- Okazaki K, Sagata N, (1995). The Mos/MAP kinase pathway stabilizes c-Fos by phosphorylation and augments its transforming activity in NIH 3T3 cells. *Embo J* 14:5048-59.
- Otsubo H, Kondoh T, Shibata M, Torii K, Ueta Y, (2011). Induction of Fos expression in the rat forebrain after intragastric administration and monosodium L-glutamate, glucose and NaCl. *Neuroscience.* 196: 97-103.
- Otten W, Iaizzo PA, Eichinger HM, (1997). Effects of a high n-3 fatty acid diet on membrane lipid composition of heart and skeletal muscle in normal swine and in swine with the genetic mutation for malignant hyperthermia. *J Lipid Res.* 38: 2023-34.
- Pagès G, Guérin S, Grall D, Bonino F, Smith A, Anjuere F, Auburger P, Pouyssegur J, (1999). Defective thymocyte maturation in p44 MAP kinase (Erk 1) knockout mice. *Science.* 286:1374-7.
- Pages G, Lenormand P, L'Allemain G, Chambard C, Meloche S, Pouyssegur J, (1993). Mitogen-activated protein kinases p42mapk and p44mapk are required for fibroblast proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 90:8319-23.
- Papin C, Denouel-Galy A, Laugier D, Calothy G, Eychène A, (1998). Modulation of kinase activity and oncogenic properties by alternative splicing reveals a novel regulatory mechanism for B-Raf. *J Biol Chem.* 273: 24939-47.
- Parekh AB, Penner R, (1997). Store depletion and calcium influx. *Physiol Rev.* 77: 901-30.
- Park SY, Kim YW, Kim JY, Jang EC, Doh KO, Lee SK, (2001). Effect of high fat diet on insulin resistance: dietary fat versus visceral fat mass. *J. Korean Med. Sci.* 16:386-390.
- Parker NJ, Begley CG, Smith PJ, (1996). Fox RM. Molecular cloning of a novel human gene (D11S4896E) at chromosomal region 11p15.5. *Genomics.* 37: 253-6.
- Payne DM, Rossomando AJ, Martino P, Erickson AK, Her JH, Shabanowitz J, Hunt DF, Weber MJ, Sturgill TW, (1991). Identification of the regulatory phosphorylation sites in pp42/mitogen-activated protein kinase (MAP kinase). *Embo J.* 10:885-92.
- Peinelt C, Vig M, Koomoa DL, Beck A, Nadler MJ, Koblan-Huberson M, Lis A, Fleig A, Penner R, Kinet JP, (2006). Amplification of CRAC current by STIM1 and CRACM1 (Orai1). *Nat Cell Biol.* 8: 771-3.

Références bibliographiques

- Pepino MY, Love-Gregory L, Klein S, Abumrad NA, (2012). The fatty acid translocase gene CD36 and lingual lipase influence oral sensitivity to fat in obese subjects. *J Lipid Res.* 53:561-66
- Pereira, DB, Carvalho AP, Duarte CB, (2002). Non-specific effects of the MEK inhibitors PD098059 and U0126 on glutamate release from hippocampal synaptosomes. *Neuropharmacology.* 42:9-19.
- Petter F, (1961). "Répartition géographique et écologique des rongeurs désertiques". *Mammalia.* 25: 1-222.
- Pettiford SM, Herbst R, (2000). The MAP-kinase ERK2 is a specific substrate of the protein tyrosine phosphatase HePTP. *Oncogen.* 19: 858-69.
- Peyssonnaud C, Eychène A, (2001). The Raf/MEK/ERK pathway: new concepts of activation. *Biol Cell.* 93: 53-62.
- Pittman DW, Labban CE, Anderson AA, O'Connor HE, (2006). Linoleic and oleic acids alter the licking responses to sweet, salt, sour, and bitter tastants in rats. *Chem Senses.* 31: 835-843.
- Polit L, Rotstein N, Carri N, (2001). Effects of docosahexaenoic acid on retinal development: cellular and molecular aspects. *Lipids.* 36: 927-935.
- Porras A, Muszynski K, Rapp UR, Santos E, (1994). Dissociation between activation of Raf-1 kinase and the 42-kDa mitogen-activated protein kinase/90-kDa S6 kinase (MAPK/RSK) cascade in the insulin/Ras pathway of adipocytic differentiation of 3T3 L1 cells. *J Biol Chem.* 269: 12741-8.
- Posada J, Cooper JA, (1992), Requirements for phosphorylation of MAP kinase during meiosis in *Xenopus* oocytes. *Science.* 255: 212-5.
- Prange HD, Schmidt-Nielsen K, Hackel DB, (1968). "Care and breeding of the fat sand rat (*Psammomys obesus* Cretzschmar) ". *Laboratory animal care.* 18: 170-179.
- Puri PL, Wu Z, Zhang P, Wood LD, Bhakta KS, Han J, Feramisco JR, Karin M, Wang JY, (2000). Induction of terminal differentiation by constitutive activation of p38 MAP kinase in human rhabdomyosarcoma cells. *Genes Dev.* 14: 574-84.
- Putney JW, McKay RR, (1999). Capacitative calcium entry channels. *Bioessays.* 21: 38-46.
- Ramdriampita C, Tsien RY, (1993). Emptying of intracellular Ca²⁺ stores releases a novel small messenger that stimulates Ca²⁺ influx. *Nature.* 364:809-14.
- Raught B, Gingras AC, (1999). eIF4E activity is regulated at multiple levels. *Int J Biochem Cell Biol.* 31: 43-57.
- Ray LB, Sturgill TW, (1987). Rapid stimulation by insulin of a serine/threonine kinase in 3T3-L1 adipocytes that phosphorylates microtubule-associated protein 2 in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA.* 84:1502-6.
- Reddy BS, Burill C, Rigotty J, (1991). Effect of diets high in omega-3 and omega-6 fatty acids on initiation and postinitiation stages of colon carcinogenesis. *Cancer Res.* 51: 487-491.
- Reed MJ, Meszaros K, Entes LJ, Claypool MD, Pinkett JG, Gadbois TM, Reaven GM, (2000). A New Rat Model of Type 2 Diabetes: The Fat-Fed, Streptozotocin-Treated Rat. *Metabolism.* 49:1390-1394.
- Rosado JA, Sage SO, (2002). The ERK cascade, a new pathway involved in the activation of store-mediated calcium entry in human platelets. *Trends Cardiovasc Med.* 12: 229-34.

Références bibliographiques

- Rothrock DW, Foster DM, (1990). Effects of fish oil on VLDL triglyceride kinetics in humans. *J. Lipid Res.* 31: 1549–1558.
- Ruiz CJ, Stone LM, McPheeters M, Ogura T, Böttger B, Lasher RS, Finger TE, Kinnamon SC, (2001). Maintenance of rat taste buds in primary culture. *Chem Senses.* 26:861-73.
- Sabapathy K, Jochum W, Hochedlinger K, Chang L, Karin M, Wagner EF, (1999). Defective neural tube morphogenesis and altered apoptosis in the absence of both JNK1 and JNK2. *Mech Dev.* 89: 115-24.
- Sanchez-Muniz FJ, Bastida S, Viejo JM, Terpstra AH, (1999). Small supplements of N-3 fatty acids change serum low density lipoprotein composition by decreasing phospholipid and apolipoprotein B concentrations in young adult women. *Eur J Nutr.* 38: 20-27.
- Schaeffer HJ, Catling AD, Eblen ST, Collier LS, Krauss A, Weber MJ, (1998). MP1: a MEK binding partner that enhances enzymatic activation of the MAP kinase cascade. *Science.* 281: 1668-71.
- Schemmel R, Mickelsen O, Gill JL (1969). Dietary obesity in rats: Body weight and body fat accretion in seven strains of rats. *J. Nutr.* 100: 1041-1048.
- Schenk U, Menna E, Kim T, Passafaro M, Chang S, De Camilli P, Matteoli M, (2005). A Novel Pathway for Presynaptic Mitogen-Activated Kinase Activation via AMPA Receptors. *J Neurosci.* 25 (7):1654–63.
- Schiffman SS, Graham BG, Sattely-Miller E, Warwick ZS, (1998). Orosensory perception of dietary fat. *Current Directions in Psychological Science.*7: 137-143.
- Schulze A, Nicke B, Warne PH, Tomlinson S, Downward J, (2004). The transcriptional response to raf activation is almost completely dependent on mitogen- activated protein kinase kinase activity and shows a major autocrine component. *Mol Biol Cell.* 15:3450-63.
- Sclafani A, Ackroff K, Abumrad NA, (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: R1823-32.
- Sclafani A, Springer D, (1976). Dietary obesity in adult rats: similarities to hypothalamic and human obesity syndromes. *Physiol. Behav.* 17: 461-471.
- Sebolt-Leopold JS, Dudley DT, Herrera R, Van Becelaere K, Wiland A, Gowan RC, Tecle H, Barrett SD, Bridges A, Przybranowski S, Leopold WR, Saltiel AR, (1999). Blockade of the MAP kinase pathway suppresses growth of colon tumors in vivo. *Nat Med.* 5:810-6.
- Sewing A, Wiseman B, Lloyd AC, Land H, (1997). High-intensity Raf signal causes cell cycle arrest mediated by p21Cip1. *Mol Cell Biol* 17:5588-97.
- Shafirir E, Gutman A, (1993). *Psammomys obesus* of the Jerusalem colony: A model for nutritionally induced, non-insulin-dependent diabetes. *J. Basic Clin. Physiol. Pharm.* 4: 83-99.
- Sharma S, Morinaga H, Hwang V, Fan W, Fernandez MO, Varki N, Olefsky JM, Webster NJ, (2013). Free Fatty Acids Induce Lhb mRNA but Suppress Fshb mRNA in Pituitary LβT2 Gonadotropes and Diet-Induced Obesity Reduces FSH Levels in Male Mice and Disrupts the Proestrous LH/FSH Surge in Female Mice. *Endocrinology.* 154: 2188-99.
- Shin AC, Townsend RL, Patterson LM, Berthoud HR, (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: R1267-1280.

Références bibliographiques

- Siddiqui RA, Jenski LJ, Neff K, Harvey K, Kovacs RJ, Stillwell W, (2001). Docosahexaenoic acid induces apoptosis in Jurkat cells by a protein phosphatase-mediated process. *Biochim Biophys Acta*. 1499: 265-275.
- Sieburth DS, Sun Q, Han M, (1998). SUR-8, a conserved Ras-binding protein with leucine-rich repeats, positively regulates Ras-mediated signaling in *C. elegans*. *Cell*. 94:119-30.
- Siegel I, Liu TL, Yaghoubzadeh E, Keskey TS, Gleicher N, (1987). Cytotoxic effects of free fatty acids on ascites tumor cells. *J Natl Cancer Inst*. 78: 271-277.
- Silingardi D, Angelucci A, De Pasquale R, Borsotti M, Squitieri G, Brambilla R, Putignano E, Pizzorusso T, Berardi N, (2011). ERK pathway activation bidirectionally affects visual recognition memory and synaptic plasticity in the perirhinal cortex. *Front Behav Neurosci*. 5:84
- Simons PJ, Kummer JA, Luiken JJ, Boon L, (2010). Apical CD36 immunolocalization in human and porcine taste buds from circumvallate and foliate papillae. *Acta Histochem*. 113: 839-43.
- Slack DN, Seternes OM, Gabrielsen M, Keyse SM, (2001). Distinct binding determinants for ERK2/p38alpha and JNK map kinases mediate catalytic activation and substrate selectivity of map kinase phosphatase-1. *J Biol Chem*. 276: 16491-500.
- Slack-Davis JK, Eblen ST, Zecevic M, Boerner SA, Tarcsafalvi A, Diaz HB, Marshall MS, Weber MJ, Parsons JT, Catling AD, (2003). PAK1 phosphorylation of MEK1 regulates fibronectin-stimulated MAPK activation. *J Cell Biol*. 162: 281-91.
- Smani T, Zakharov SI, Csutora P, Leno E, Trepakova ES, Bolotina VM, (2004). A novel mechanism for the store-operated calcium influx pathway. *Nat Cell Biol*. 6: 113-20.
- Soria A, Chicco A, D'Alessandro ME, Rossi A, Lombardo YB, (2002). Dietary fish oil reverse epididymal tissue adiposity, cell hypertrophy and insulin resistance in dyslipemic sucrose fed rat model. *J. Nutr. Biochem*. 13:209-218.
- Stewart JE, Feinle-Bisset C, Golding M, Delahunty C, Clifton PM, Keast RS, (2010). Oral sensitivity to fatty acids, food consumption and BMI in human subjects. *Br. J. Nutr*. 1- 8.
- Storlien LH, Higgins JA, Thomas TC, Brown MA, Wang HQ, Huang XF, Else PL, (2000). Diet composition and insulin action in animal models. *Br. J. Nutr*. 83: S85-S90.
- Stratford JM, Curtis KS, Contreras RJ, (2006). Chorda tympani nerve transection alters linoleic acid taste discrimination by male and female rats. *Physiol. Behav*. 89: 311-19.
- Sundaram M, Han M, (1995). The *C. elegans* ksr-1 gene encodes a novel Raf-related kinase involved in Ras-mediated signal transduction. *Cell*. 83: 889-901.
- Sweatt,JD, (2004). Mitogen-activated protein kinases in synaptic plasticity and memory. *Curr Opin Neurobiol*. 14:311-7.
- Takeda M, Imaizumi M, Fushiki T, (2000). Preference for vegetable oils in the two-bottle choice test in mice. *Life Sci*. 67: 197-204.
- Tanaka T, Katsuma S, Adachi T, Koshimizu TA, Hirasawa A, Tsujimoto G, (2008). Free fatty acids induce cholecystokinin secretion through GPR120. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 377: 523-527.
- Tang Y, Yu J, Field J, (1999). Signals from the Ras, Rac, and Rho GTPases converge on the Pak protein kinase in Rat-1 fibroblasts. *Mol Cell Biol*. 19: 1881-91.
- Tarrega C, Blanco-Aparicio C, Munoz JJ, Pulido R, (2002). Two clusters of residues at the docking groove of mitogen-activated protein kinases differentially mediate their functional interaction with the tyrosine phosphatases PTP-SL and STEP. *J Biol Chem*. 277: 2629-36.

Références bibliographiques

- Taupin D, Podolsky DK, (1999). Mitogen-activated protein kinase activation regulates intestinal epithelial differentiation. *Gastroenterology*. 116:1072-80.
- Teis D, Wunderlich W, Huber LA, (2002). Localization of the MP1-MAPK scaffold complex to endosomes is mediated by p14 and required for signal transduction. *Dev Cell*. 3:803-14.
- Therrien M, Chang HC, Solomon NM, Karim FD, Wassarman DA, Rubin GM, (1995). KSR, a novel protein kinase required for RAS signal transduction. *Cell*. 83:879-88.
- Thomas O, (1908)." The *Psammomys* of alluvial soil of the Nile delta". *Ann Nat Hist*. 2: 91-92.
- Thorson JA, Yu LW, Hsu AL, Shih NY, Graves PR, Tanner JW, Allen PM, Piwnica-Worms H, Shaw AS, (1998). 14-3-3 proteins are required for maintenance of Raf-1 phosphorylation and kinase activity. *Mol Cell Biol*. 18: 5229-38.
- Tolwinski NS, Shapiro PS, Goueli S, Ahn NG, (1999). Nuclear localization of mitogen- activated protein kinase kinase 1 (MKK1) is promoted by serum stimulation and G2-M progression. Requirement for phosphorylation at the activation lip and signaling downstream of MKK. *J Biol Chem*. 274: 6168-74.
- Tsuruta M, Kawada T, Fukuwatari T, Fushiki T, (1999). The orosensory recognition of long chain fatty acids in rats. *Physiol Behav*. 66: 285-8.
- Tzivion G, Luo Z, Avruch J, (1998). A dimeric 14-3-3 protein is an essential cofactor for Raf kinase activity. *Nature*. 394: 88-92.
- Voice JK, Klemke RL, Le A, Jackson JH, (1999). Four human ras homologs differ in their abilities to activate Raf-1, induce transformation, and stimulate cell motility. *J Biol Chem*. 274: 17164-70.
- Volmat V, Pouyssegur J, (2001). Spatiotemporal regulation of the p42/p44 MAPK pathway. *Biol Cell*. 93:71-9.
- Vomastek T, Schaeffer HJ, Tarcsafalvi A, Smolkin ME, Bissonette EA, Weber MJ, (2004). Modular construction of a signaling scaffold: MORG1 interacts with components of the ERK cascade and links ERK signaling to specific agonists. *Proc Natl Acad Sci USA*. 101:6981-6.
- Von zastrow M, (2003). Mechanisms regulating membrane trafficking of G protein-coupled receptors in the endocytic pathway. *Life Sci*. 74: 217-224.
- Wan PT, Garnett MJ, Roe SM, Lee S, Niculescu-Duvaz D, Good VM, Jones CM, Marshall CJ, Springer CJ, Barford D, Marais R, (2004). Mechanism of activation of the RAF-ERK signaling pathway by oncogenic mutations of B-RAF. *Cell*. 116: 855-67.
- Weis M, Schlegel J, Kass GE, Holmstrom TH, Peters I, Eriksson J, Orrenius S, Chow SC, (1995). Cellular events in Fas/APO-2-mediated apoptosis in JURKAT T lymphocytes. *Exp Cell Res*. 219: 699-708.
- West DB, York B, (1998). Dietary fat, genetic predisposition, and obesity: lessons from animal models. *Am. J. Clin. Nutr*. 67: 505S-512S.
- Williams RT, Manji SS, Parker NJ, Hancock MS, Van Stekelenburg L, Eid JP, Senior PV, Kazenwadel JS, Shandala T, Saint R, Smith PJ, Dziadek MA, (2001). Identification and characterization of the STIM (stromal interaction molecule) gene family: coding for a novel class of transmembrane proteins. *Biochem J*. 357: 673-85.
- Wolf CM, Reynolds JE, Morana SJ, Eastman A, (1997).The temporal relationship between protein phosphatase, ICE/CED-3 proteases, intracellular acidification, and DNA fragmentation in apoptosis. *Exp Cell Res*. 230: 22-27.

Références bibliographiques

- Wu J, Dent P, Jelinek T, Wolfman A, Weber MJ, Sturgill TW, (1993). Inhibition of the EGF-activated MAP kinase signaling pathway by adenosine 3',5'-monophosphate. *Science*. 262: 1065-9.
- Wunderlich W, Fialka I, Teis D, Alpi A, Pfeifer A, Parton RG, Lottspeich F, Huber LA, (2001). A novel 14-kilodalton protein interacts with the mitogen-activated protein kinase scaffold mp1 on a late endosomal/lysosomal compartment. *J Cell Biol*. 152:765-76.
- Xia Z, Dickens M, Ringeaud J, Davis RJ, Greenberg ME, (1995). Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. *Science*. 270: 1326-31.
- Xia Z, Dudek H, Miranti CK, Greenberg ME, (1996). Calcium influx *via* the NMDA receptor induces immediate early gene transcription by a MAP kinase/ERK-dependent mechanism. *J Neurosci*. 16:5425-36.
- Yaffe MB, Rittinger K, Volinia S, Caron PR, Aitken A, Leffers H, Gambelin SJ, Smerdon SJ, Cantley LC, (1997). The structural basis for 14-3-3: phosphopeptide binding specificity. *Cell*. 91:961-71.
- Yan J, Roy S, Apolloni A, Lane A, Hancock JF, (1998). Ras isoforms vary in their ability to activate Raf-1 and phosphoinositide 3-kinase. *J Biol Chem*. 273: 24052-6.
- Yang DD, Kuan CY, Whitmarsh AJ, Rincón M, Zheng TS, Davis RJ, Rakic P, Flavell RA, (1997). Absence of excitotoxicity-induced apoptosis in the hippocampus of mice lacking the Jnk3 gene. *Nature*. 389: 865-70.
- Yang S, Zhang JJ, Huang XY, (2009). Orai1 and STIM1 are critical for breast tumor cell migration and metastasis. *Cancer Cell*. 15:124-34.
- Yao Y, Li W, Wu J, Germann UA, Su MS, Kuida K, Boucher MD, (2003). Extracellular signal-regulated kinase 2 is necessary for mesoderm differentiation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 100: 12759-64.
- Ye J, Keller JN, (2010). Regulation of energy metabolism by inflammation: a feedback response in obesity and calorie restriction. *Aging (Albany NY)*. 2: 361-8.
- Yeung K, Janosch P, McFerran B, Rose DW, Mischak H, Sedivy JM, Kolch JM, (2000). Mechanism of suppression of the Raf/MEK/extracellular signal-regulated kinase pathway by the raf kinase inhibitor protein. *Mol Cell Biol*. 20:3079-85.
- York RD, Yao H, Dillon, Ellig CL, Eckert SP, McCleskey EW, Stork PJ, (1998). Rap1 mediates sustained MAP kinase activation induced by nerve growth factor. *Nature*. 392:622-6.
- Yung HW, Wyttenbach A, Tolkovsky AM, (2004). Aggravation of necrotic death of glucose-deprived cells by the MEK1 inhibitors U0126 and PD184161 through depletion of ATP. *Biochem Pharmacol*. 68: 351-60.
- Yung Y, Yao Z, Hanoch T, Seger R, (2000). ERK1b, a 46-kDa ERK isoform that is differentially regulated by MEK. *J Biol Chem*. 275: 15799-808.
- Zarubin T, Han J, (2005). Activation and signaling of the p38 MAP kinase pathway. *Cell Res*. 15: 11-8.
- Zhang BH, Tang ED, Zhu T, Greenberg ME, Vojtek AB, Guan KL, (2001). Serum- and glucocorticoid-inducible kinase SGK phosphorylates and negatively regulates B-Raf. *J Biol Chem*. 276: 31620-6.
- Zhang XJ, Zhou LH, Ban X, Liu DX, Jiang W, Liu XM, (2011). Decreased expression of CD36 in circumvallate taste buds of high-fat diet induced obese rats. *Acta Histochem*. 113: 663-667.

Références bibliographiques

- Zhang Y, Hoon MA, Chandrashekar J, Mueller KL., Cook B, Wu D, Zuker CS, Ryba NJP, (2003). Coding of Sweet, Bitter, and Umami Tastes Different Receptor Cells Sharing Similar Signaling Pathways. *Cell*. 112: 293-301.
- Zheng CF, Guan KL, (1993). Properties of MEKs, the kinases that phosphorylate and activate the extracellular signal-regulated kinases. *J Biol Chem*. 268: 23933-9.
- Zheng CF, Guan KL, (1994). Activation of MEK family kinases requires phosphorylation of two conserved Ser/Thr residues. *Embo J*. 13: 1123-31.
- Zhong SP, Ma WY, Dong Z, (2000). ERKs and p38 kinases mediate ultraviolet B-induced phosphorylation of histone H3 at serine 10. *J Biol Chem*. 275: 20980-4.
- Zhou BB, Li H, Yuan J, Kirschner MW, (1998). Caspase –dependent activation of cyclin-dependent kinases during Fas- induced apoptosis in Jurkat cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 95: 6785-6790.
- Zimmer L, Vancassel S, Cantagrel S, Breton P, Delamanche S, Guilloteau D, Durand G, Chalon S, (2002). The dopamine mesocorticolimbic pathway is affected by deficiency in n-3 polyunsaturated fatty acids. *Am J Clin Nutr*. 75: 662-667.
- Zimmermann S, Moelling K, (1999). Phosphorylation and regulation of Raf by Akt (protein kinase B). *Science*. 286: 1741-4.
- Zimmet P, Whitehouse S, Kiss J, (1979). Ethnic variability in the plasma insulin response to oral glucose in Polynesian and Micronesian subjects, *Diabetes*. 28: 624-628.
- Ziv E, Kalman R, Hershkop K, Barash V, Shafrir E, Bar-On H, (1996). Insulin resistance in the NIDDM model *Psammomys obesus* in the normoglycemic, normoinsulinemic state. *Diabetologia*. 39: 1269-1275.