



Université de Bourgogne
Ecole Doctorale Environnement-Santé n°554
Centre de Recherche INSERM U866 Lipides-Nutrition-Cancer
AgroSup Dijon

THESE

Discipline : Sciences de la Vie

Spécialité : Physiologie de la Nutrition

Impact de l'obésité sur la détection oro-sensorielle des lipides alimentaires chez la souris et chez l'Homme.

présentée par

Michaël CHEVROT

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

Soutenue publiquement le 29 mars 2013

devant le jury composé de :

M. GUERRE-MILLO	Directrice de Recherche INSERM, Centre de Recherche des Cordeliers, Paris <i>Nutriomique, UMR INSERM U872, Université Pierre et Marie Curie Paris VI</i>	<i>Rapporteur</i>
P. BOREL	Directeur de Recherche INRA, Faculté de Médecine, Marseille <i>Nutrition Obésité et Risque Thrombotique, UMR1062 INSERM/1260 INRA/Université d'Aix-Marseille</i>	<i>Rapporteur</i>
C. MARMONIER	Docteur, CNIEL, Paris <i>Chef de Service Recherche Nutrition-Santé, Direction des Affaires Scientifiques et Techniques</i>	<i>Examinateur</i>
L. LAGROST	Directeur de Recherche INSERM, Faculté de Médecine, Dijon <i>Protéines de transfert des lipides et métabolisme des lipoprotéines, UMR INSERM U866/uB</i>	<i>Examinateur</i>
P. BESNARD	Professeur, AgroSup Dijon, Dijon <i>Physiologie de la Nutrition et Toxicologie, UMR INSERM U866/uB/AgroSup Dijon</i>	<i>Directeur de thèse</i>
P. PASSILLY-DEGRACE	Maître de Conférences, IUT, Université de Bourgogne, Dijon <i>Physiologie de la Nutrition et Toxicologie, UMR INSERM U866/uB/AgroSup Dijon</i>	<i>Co-encadrant de thèse</i>

« *Le gras, c'est la vie* »

Karadoc

Kaamelott, Livre II, *Corpore sano*

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier le professeur Philippe Besnard, Directeur du laboratoire NUTox, de m'avoir accueilli au sein de son équipe de recherche pour réaliser cette thèse qu'il a également dirigé. Merci pour votre encadrement, votre rigueur et votre esprit critique qui m'ont permis d'avancer pendant ces quatre années. Merci également pour les moments « plus informels » de détente et de plaisanterie que nous avons pu connaître ensemble. Et enfin merci pour la confiance que vous m'avez apportée.

Je remercie ensuite le docteur Patricia Passilly-Degrace, maître de conférence à l'IUT de Dijon et co-encadrante de cette thèse. Merci pour l'aide et la gentillesse dont tu as fait preuve pendant cette thèse.

Mes plus sincères remerciements vont ensuite aux membres du jury qui ont accepté d'évaluer mon travail et plus particulièrement aux docteurs Michèle Guerre-Millo et Patrick Borel qui ont accepté d'utiliser de leur temps précieux pour être rapporteurs de mon manuscrit. Je remercie également le docteur Laurent Lagrost et le docteur Corinne Marmonier d'avoir accepté d'examiner mon travail.

Je suis très reconnaissant envers le Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche ainsi que le Conseil Régional de Bourgogne et le Centre National Interprofessionnel de l'Economie Laitière (CNIEL) pour avoir financé cette thèse.

Viennent ensuite tous les membres du laboratoire avec qui j'ai travaillé mais surtout avec qui je suis devenu plus que thésard du labo depuis le jour où j'ai apporté ma tasse pour la pause-café !

Je voudrais, pour commencer, remercier les indissociables Isabelle et Hélène pour les grandes conversations scientifiques ou non qu'on a pu avoir ensemble, pour les grands moments de n'importe quoi aussi et surtout pour le soutien et l'écoute que vous m'avez apporté tout au long de ma thèse et plus particulièrement sur la fin.

Je remercie notre très chère Marie-Claude (*alias* MaliClode). Même si tu as passé une grande partie de ma thèse en convalescence de diverses opérations tu as réussi à répandre ta passion pour les mots-croisés au sein de toute l'équipe de doctorants et à nous faire découvrir de nouveaux mots. Merci pour les cotriades, zoreilles et autres stems !

Je remercie également Christophe et Fabienne pour leur aide précieuse à l'animalerie et au secrétariat mais aussi pour les fous-rires et autres bons moments qu'on a pu passer ensemble (T'as qu'à aller au lac !!! Impeccable !!!)

Un grand merci à la Dream-Team du WP1 : Arnaud, Deb et Jeff. J'ai passé de très bon moments avec vous, c'est très agréable de travailler en chantant, rigolant et se moquant un peu des gens... tout en restant efficaces en fin de compte. Un nouveau travail sans vous ne sera plus pareil, mais on se retrouvera certainement autour d'un bon repas bleu, rouge, violet ou vert à manger des glaces étranges ou encore de la soupe à l'ail !!! En passant je salue également vos moitiés, Olivia, Bobo et Céline sans qui les repas « presque parfaits » ou autres fêtes de la musique ne seraient pas les mêmes !

C'est maintenant au tour de Véro. Chère poulette je te remercie pour tout, ton amitié, ton soutien, ta gentillesse, l'organisation massive de soirées et « afterworks » et aussi ton innocence (« j'sais pas j' me rends pas compte... »). Bon courage pour la fin de ta thèse qui arrive à grand pas.

Bon courage aussi à Marjo qui est en pleine rédaction au moment où j'écris ces lignes ainsi qu'à Lydie qui a intégré notre bureau il y a peu et qui est dans une phase très chargée de sa thèse également. Vous allez y arriver les filles je crois en vous !

Je voudrais ensuite remercier mes prédécesseurs, Céline et Trang. Merci de m'avoir transmis votre savoir-faire si utile pour arriver au bout de cette thèse. Toutes mes félicitations à Trang pour l'heureux évènement ! Dédicace toute particulière pour Céline avec qui j'ai passé de très nombreuses heures à travailler (de manière très efficace !) et surtout de nombreuses soirées « reprise alimentaire bière » par temps de canicule ou de tempête de neige, mais aussi de soirée « poker rhum pomme pomme » avec notre Véro nationale. Merci pour tout et plein de réussite pour la suite.

J'aimerais ensuite remercier tous les gens que j'ai pu croiser au cours de cette thèse sur les tables du RU. Merci à Rémi, Vivi, Céline et plus particulièrement à Mag, Mel, Momo, Deb et Cédric qui m'ont supporté les derniers mois. Une pensée aussi pour ceux que nous recevions de temps à autres à notre table, notamment Jess et Carole

Je salue également mes collègues de stage de M2 : Tony, Louiza, Mélaine, Cécile et Arnaud. C'est un peu grâce à vous que je suis là !

Je remercie tous mes amis, essentiellement thésard, que j'ai rencontré au cours de ces années. Une pensée pour Matt et Julie, Claire et Alex mais aussi à tous les Edificiens avec qui j'ai organisé de nombreux apéros, conférences et journées BIOTechno avec succès, en particulier Matt une nouvelle fois (il est partout ce minet !), Malika, Anne-Laure, Guillaume W., Fred et tous les autres aussi !

Je salue mes amis de longue date qui ont suivi de près ou de loin mon évolution et avec qui j'ai vécu (et ça continue !!!) de très bons moments : mes premiers merci vous pour Emilie, longtemps

dijonnaise et à mes côtés qui est maintenant exilée en Bretagne mais qui m'a toujours soutenu !
Merci également à Blandine et Romain (toutes mes félicitations !!!), Marilyne et Manu, Thomas, Max et Julie, Betty et Aurélien, Léonie, Catherine (exilée beaucoup plus loin !) Cyril et toute sa famille et j'en oublie certainement...

Je voudrai également remercier toute ma famille au sens très large du terme. Merci de m'avoir soutenu en si grand nombre même si vous n'y comprenez pas grand-chose [;)] et merci d'avoir cru en moi. Un merci particulier pour mes parents et mon frère.

Enfin je voudrais remercier Charlie (*alias* Doudou) pour m'avoir soutenue pendant ces long mois de galère et d'avoir toujours cru en moi (et c'était réciproque !). C'est aussi grâce à toi que j'y suis arrivé (et j'espère que c'est réciproque ?!?). Le mois de mars 2013 a été pour nous un grand tournant de notre vie et j'espère que ce n'est que le début !

J'espère que je n'ai oublié personne mais si c'est le cas j'en suis désolé et je les remercie aussi !

Abréviations

AA	Acide arachidonique
AG	Acide gras
AGCC	Acide gras à courte chaîne
AGCM	Acide gras à chaîne moyenne
AGL	Acide gras libre
AGLC	Acide gras à longue chaîne
AGMI	Acide gras mono-insaturé
AGPI	Acide gras poly-insaturé
AGS	Acide gras saturé
ALA	Acide α -linoléique
ApoAIV	Apolipoprotéine AIV
BPA	Bisphénol A
CCK	Cholécystokinine
CCK1-R	Récepteur de type 1 à la cholécystokinine
CD36	<i>Cluster of differentiation 36</i>
CIF	<i>Calcium influx factor</i>
CV	Papille caliciforme (<i>Circumvallate</i>)
DEXA	Absorption biphotonique à rayons X (<i>Dual energy X-ray absorptiometry</i>)
DHA	Acide docosahexaénoïque
DRK	<i>Delayed-rectifying potassium channel</i>
EPA	Acide eicosapentaénoïque
FTO	<i>Fat mass and obesity associated</i>
FXR	<i>Farnesoid X receptor</i>
GABA	Acide γ -aminobutyrique
GIP	<i>Glucose-dependent insulintropic polypeptide</i>
GLAST	<i>Glutamate-aspartate transporter</i>
GLP-1	<i>Glucagon-like peptide 1</i>
GPCR (GPR40/41/43/120)	<i>G protein-coupled receptor</i>
IMC	Indice de masse corporelle
IP3	Inositol tri-phosphate
IP3R3	Récepteur de type 3 à l'inositol tri-phosphate
iPLA2	Phospholipase A2 inductible
LA	Acide linoléique
LPL	Lipoprotéine lipase
LXR	<i>Liver X receptor</i>
MASH1	<i>Mouse achaete-scute homolog 1</i>
MC4R	Récepteur de type 4 à la mélanocortine
mGLUR4	Récepteur métabotrope au glutamate
NCAM	<i>Neural cell adhesion molecule</i>
NPY	Neuropeptide Y
NTPDase2	Ecto-ATPase de type D2
NTS	Noyau du tractus solitaire
OLA	Acide oléique

Or67d/83b	<i>Olfactory receptor</i>
Orai1/3	<i>Calcium release-activated calcium channel protein</i>
Panx1	<i>Pannexin 1</i>
PC	<i>Phosphatidylcholine</i>
PCSK1	<i>Proprotein convertase subtilisin/kexin type 1</i>
PKD2L1/PKD2L3	<i>Polycystic-kidney-disease like ion channel</i>
PL	<i>Phospholipides</i>
PLCβ2	<i>Phospholipase de type Cβ2</i>
POMC	<i>Pro-opiomélanocortine</i>
PP	<i>Polypeptide pancréatique</i>
PPAR	<i>Peroxisomal proliferator activated receptor</i>
Prox1	<i>Prospero-related homeobox gene 1</i>
PYY	<i>Peptide YY</i>
ROMK	<i>Renal outler medullary K</i>
SNAP25	<i>Synaptic membrane protein 25</i>
SNMP	<i>Sensory neuron membrane protein</i>
SNP	<i>Single-nucleotide polymorphism</i>
SOC	<i>Store-operated calcium</i>
Src-PTK	<i>Src protéine tyrosine kinases</i>
SREBP	<i>Sterol regulatory element-binding protein</i>
SSO	<i>Sulfo-N-succidimidyl oleic acid</i>
STC-1	<i>Plurihormonal murine secretin tumor cell line</i>
STIM1	<i>Stromal interaction molecule 1</i>
T1R (T1R2/T1R3)	<i>Taste receptor 1</i>
T2R	<i>Taste receptor 2</i>
TG	<i>Triglycérides</i>
TLR	<i>Toll-like receptor</i>
TRPM5	<i>Melastatin-related transient receptor potential cation channel type 5</i>
VIP	<i>Vasoactive intestinal peptide</i>

Table des matières

Avant-Propos	1
Revue Bibliographique	3
I. L'épidémie actuelle d'obésité	4
1. Définition	4
2. Les causes de l'obésité	10
2.1. Une balance énergétique déséquilibrée	10
2.2. Les rôles de la génétique	12
2.3. Des causes épigénétiques : l'empreinte métabolique	14
2.4. Des facteurs environnementaux	15
2.5. L'économie, cause de l'obésité	16
3. Les conséquences de l'obésité	17
3.1. Les conséquences sur la santé	17
3.2. Les conséquences sur l'économie	19
II. Les lipides alimentaires	20
1. Structure des lipides alimentaires	21
2. Fonctions cellulaires des lipides alimentaires	24
2.1. Rôle structural	24
2.2. Rôle régulateur	25
2.3. Rôle énergétique	26
3. Fonctions physiologiques des lipides alimentaires : régulation de la prise alimentaire	27
3.1. L'effet gratifiant des lipides	27
3.2. Les effets satiétogènes des lipides	28
3.4.1 Les effets post-ingestifs	28
3.4.2 Les effets post-absorptifs	30
III. La détection oro-sensorielle des lipides alimentaires	31
1.1. La texture	32
1.2. L'olfaction	32
IV. La détection des saveurs par les papilles gustatives	35
1. Les bourgeons du goût	35
2. Les différents types cellulaires des bourgeons du goût	36
2.1. Les cellules sensorielles ou gustatives	36
2.2. Les cellules souches ou basales	41
2.3. Les communications intercellulaires au sein des bourgeons du goût	42
3. Les différents types de récepteurs	43
V. Les lipides alimentaires sont-ils à l'origine d'une sixième saveur ?	45
1. Condition 1 : un stimulus unique. Quelle est la nature des lipides détectés : TG ou AGLC ?	47
2. Condition 2 : des récepteurs spécifiques. Quels sont les lipido-récepteurs candidats ?	49
2.1. Les DRK	49
2.2. Les GPCR	51
2.3. CD36	53
3. Condition 3 : un système de transduction unique du signal. Quelles sont les signalisations cellulaires et les voies nerveuses impliquées dans la détection orale des AGLC ?	57
3.1. La signalisation dans les bourgeons du goût	57

3.2. La transmission du signal jusqu'au cerveau.....	61
3.4.3 Anatomie du système nerveux gustatif.....	61
3.4.4 Activation du système nerveux gustatif par les AGLC	63
4. Condition 4 : provoquer une réponse physiologique. Quelles sont les réponses physiologiques de la détection orale des AGLC ?	64
5. Condition 5 : apporter un avantage évolutif. La détection orale des lipides apporte-t-elle un avantage évolutif ?.....	67
6. Condition 6 : être décrit comme une sensation unique. La détection orale des lipides peut-elle décrite comme une sensation unique ?	68
7. Condition 7 : avoir un système de détection régulable. Régulation de la lipido-réception gustative : cas des CD36 et GPR120.....	69
Problématique.....	75
Résultats	79
I. Quel est l'impact de l'obésité sur la détection orale des lipides chez l'Homme ?.....	80
Matériels et méthodes	82
Projet d'article n° 1.....	87
Discussion	108
II. Quel est l'impact de l'obésité induite par le régime alimentaire sur la détection gustative des lipides chez la souris ?.....	117
Matériels et méthodes	119
Article n° 2	124
Discussion	156
III. Quel est l'impact du « sensing » hypothalamique des lipides sur le comportement alimentaire chez la souris ?	162
Matériels et méthodes	164
Article n° 3	166
Discussion	180
Discussion Générale.....	185
Conclusion et Perspectives	193
Bibliographie	195
Publications et Communications	211

Table des tableaux et figures

Tableau 1 : Définition de l'Indice de Masse Corporelle (IMC) selon l'OMS.	5
Tableau 2 : Les définitions les plus courantes du syndrome métabolique.	19
Tableau 3 : Tests de comportement les plus couramment utilisés pour les mesures de détection oro-sensorielle des lipides chez la souris.	31
Tableau 4 : La définition des différentes modalités gustatives.	46
Tableau 5 : Critères de recrutement pour le protocole clinique.	82
Tableau 6 : Tableau de composition des régimes obésogènes utilisés	119
Figure 1 : Prévalence de l'obésité aux Etats-Unis depuis 1990.	7
Figure 2 : Prévalence de l'obésité en Europe en 2010.	8
Figure 3 : Evolution des différentes classes d'obésité depuis 1997 en France.	9
Figure 4 : La transition nutritionnelle en France.	11
Figure 5 : Part des lipides dans les apports énergétiques conseillés (ANC 2010) et constatés (SU.VI.MAX) pour les français.	12
Figure 6 : Les principales mutations à l'origine de cas d'obésité monogénique.	14
Figure 7 : Complications pour la santé liées à l'obésité.	17
Figure 8 : La nomenclature des acides gras.	23
Figure 9 : Les lipides alimentaires : apports alimentaires et rôles cellulaires.	24
Figure 10 : La régulation de la prise alimentaire par les lipides.	34
Figure 11 : Les papilles gustatives chez l'Homme et la souris.	35
Figure 12 : Les bourgeons du goût dans la papille caliciforme de souris.	36
Figure 13 : Représentation schématique de l'organisation d'un bourgeon du goût.	38
Figure 14 : Caractéristiques morphologiques et fonctionnelles principales des cellules sensorielles des bourgeons du goût.	40
Figure 15 : Modèle de transmission du signal gustatif dans les bourgeons du goût chez la souris.	43
Figure 16 : Les différents types de récepteurs aux molécules sapides.	44
Figure 17 : Représentation schématique de la création d'un microenvironnement favorable à la détection des AGLC dans la papille caliciforme.	48
Figure 18 : Modélisation du mode d'action de Kv1.5.	50
Figure 19 : Structure prédictive du GPR120 chez la souris.	53
Figure 20 : Structure prédictive du CD36 chez l'Homme.	54
Figure 21 : Etude de colocalisation par immunohistochimie de α -gustducine et CD36 dans les papilles caliciformes de souris.	55
Figure 22 : Localisation par immunohistochimie de CD36 dans l'épithélium gustatif chez l'Homme.	56
Figure 23 : La signalisation CD36-dépendante suite à une stimulation par un acide gras à longue chaîne dans les bourgeons du goût chez la souris.	58
Figure 24 : Mesure de la sécrétion de GLP-1 dans des explants de papilles en culture en conditions témoins, stimulés par l'acide α -linoléique ou un agoniste spécifique de GPR120.	60
Figure 25 : Voies nerveuses impliquées dans la transmission du signal gustatif vers le cerveau.	62
Figure 26 : Activation cérébrale suite à une stimulation orale avec une solution lipidique.	64

Figure 27 : Expression génique de CD36, GPR120 et α -gustducine au cours du nyctémère chez la souris.	70
Figure 28 : Cinétique de l'expression de CD36 et GPR120 par Western-blot lors d'une renourriture avec un régime standard chez la souris	71
Figure 29 : Niveaux d'expression de GPR120 (A) et CD36 (B) par western-blot et préférence à court terme pour l'acide linoléique chez des souris CD36 ^{+/+} , CD36 ^{+/-} et CD36 ^{-/-} (B).	72
Figure 30 : Hypothèse de travail.	76
Figure 31 : Mesure de seuils de détection de l'acide oléique chez des sujets présentant un polymorphisme de CD36.....	109
Figure 32 : Représentation schématique des résultats obtenus chez l'Homme.	113
Figure 33 : Cinétique de dosage des TG plasmatiques suite à un dépôt d'eau (n=4) ou de LA pur (n=11) chez la souris.....	114
Figure 34 : Cinétique de dosage des TG plasmatiques suite à un dépôt de solution contenant, ou non 1% de LA chez la souris sauvage (n=6) et CD36 ^{-/-} (n=5).	115
Figure 35 : Mesure de la préférence pour une solution de xanthane enrichie avec 2% d'huile de colza en test à double choix long-terme en fonction du régime alimentaire chez des souris standards ou obèses.....	158
Figure 36 : Analyse par western-blot de l'expression de GPR120 chez des souris en régime contrôle ou en régime obésogène.....	160
Figure 37 : Illustration du cathétérisme permanent posé dans la carotide, en direction du cerveau d'une souris C57Bl6/J.	180
Figure 38 : Protocole de mesure de la reprise alimentaire appliqué chez des souris perfusées avec du sérum physiologique ou de l'intralipide.....	181
Figure 39 : Cinétique de mesure de la reprise alimentaire pendant 4h chez des souris perfusées avec du sérum physiologique (NaCl) ou de l'intralipide (IL).....	181
Figure 40 : Protocole de mesure de la reprise alimentaire appliqué chez des souris perfusées, dans un premier temps, avec de la pyrrolidone (Pyrr) ou du SSO, puis dans un second temps, avec du sérum physiologique ou de l'intralipide.	182
Figure 41 : Cinétique de mesure de la reprise alimentaire pendant 4h chez des souris perfusées, dans un premier temps, avec de la pyrrolidone ou du SSO, puis avec du sérum physiologique ou de l'intralipide (IL).	183
Figure 42 : Cinétique de sécrétion de TG plasmatiques suite à une stimulation orale avec une solution témoin ou contenant 2% d'huile de colza chez des souris minces ou rendues obèses par un régime alimentaire riche en AGS.....	189
Figure 43 : Mesure de la reprise alimentaire chez la souris suite à un dépôt oral de solution contrôle (gomme de xanthane 0.3%) ou de solution lipidique (contrôle + 2% d'huile de colza).....	190
Figure 44 : Représentation schématique des perturbations liées à l'obésité ou aux mutations génétiques sur les mécanismes impliqués dans la lipido-détection orale.....	191

Avant-Propos

L'épidémie actuelle d'obésité est un problème de santé publique majeur de très nombreux pays à travers le monde. Cette épidémie s'explique en partie par une abondance de nourriture à haute densité énergétique associée à une sédentarisation de la population. Les Etats concernés investissent énormément de moyens pour lutter contre ce phénomène avec notamment le développement de plans de santé publique, tel que le PNNS (Plan National Nutrition Santé) en France, mais également le financement de programmes de recherche ambitieux sur le sujet. La thématique du Laboratoire de recherche dans lequel cette thèse a été réalisée s'inscrit totalement dans cette démarche. En effet, les travaux menés au sein du laboratoire de Physiologie de la Nutrition et Toxicologie ont pour objectifs de déterminer comment les lipides alimentaires sont perçus au niveau du tractus oro-intestinal, afin de mieux comprendre les éventuels dysfonctionnements à l'origine d'une surconsommation des lipides, voire de l'obésité. En utilisant des modèles murins, l'équipe de recherche du Laboratoire a réussi à mettre en évidence une détection orale et intestinale des lipides alimentaires s'inscrivant dans une sorte de *continuum* fonctionnel. Ainsi, les résultats obtenus au niveau oral font état d'une détection des lipides alimentaires chez la souris à l'origine de mécanismes physiologiques tels que la préférence pour les lipides ou encore une boucle céphalique de la digestion suite à un dépôt oral de lipides. Une protéine membranaire multifonctionnelle appelée CD36, présente dans de nombreux tissus, a été identifiée au niveau lingual comme récepteur aux lipides, même si d'autres lipido-récepteurs candidats tels que certains membres de la famille des récepteurs couplés aux protéines G (GPCR) ne sont pas exclus. Au cours de cette thèse, les expérimentations ont été encore plus poussées puisque cette fois-ci et pour la première fois au Laboratoire, des études sur la perception oro-sensorielle des lipides alimentaires ont été menées chez l'Homme. Dans ce manuscrit seront détaillées les avancées qui ont été réalisées dans le domaine de la perception oro-sensorielle des lipides alimentaires, à la fois chez la souris et chez l'Homme, dans le but de répondre à une question essentielle : existe-t-il des liens entre la perception oro-sensorielle des lipides alimentaires et l'obésité ?

Revue Bibliographique

I. L'épidémie actuelle d'obésité

1. Définition

Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), « le surpoids et l'obésité se définissent comme une accumulation anormale ou excessive de graisse corporelle qui représente un risque pour la santé. L'indice de masse corporelle (IMC) est un moyen simple de mesurer l'obésité dans la population : il correspond au poids de la personne (en kilogrammes) divisé par le carré de sa taille (en mètres). Une personne ayant un IMC de 30 ou plus est généralement considérée comme obèse. Une personne dont l'IMC est égal ou supérieur à 25 est considérée comme étant en surpoids. Le surpoids et l'obésité sont des facteurs de risque majeurs pour un certain nombre de maladies chroniques, parmi lesquelles le diabète, les maladies cardio-vasculaires et le cancer. Autrefois considérés comme un problème propre aux pays à revenu élevé, le surpoids et l'obésité augmentent désormais de façon spectaculaire dans les pays à faible ou moyen revenu, surtout en milieu urbain ». L'obésité peut être considérée comme une maladie à part entière car elle altère le bien-être physique, psychologique et social des individus atteints. Elle est d'ailleurs reconnue officiellement comme telle par l'OMS depuis juin 1997. Le caractère universel de cette maladie en fait la première épidémie mondiale non virale reconnue par l'OMS depuis 2000.

Afin de mesurer l'obésité dans la population, plusieurs outils ont été développés. Selon Thibaut de Saint Pol, de l'observatoire du changement à Paris (de Saint Pol 2007), du point de vue épidémiologique un bon indicateur de corpulence doit remplir trois critères principaux : il doit le moins possible être corrélé à la taille, il doit être un bon prédicateur de la mortalité et il doit le plus possible être corrélé à la masse grasse. L'IMC répond à ces trois paramètres et est donc devenu l'outil de mesure de l'obésité privilégié dans le monde entier.

Cet indice permet de classer des individus selon leur corpulence : un rapport P/T^2 (Poids / Taille²) compris entre 18.5 et 24.9 correspond aux personnes de poids normal, les personnes présentant un indice strictement inférieur à 18.5 sont dans un état de maigreur, entre 25 et 29.9 on parle de surpoids, enfin au-delà de 30 il s'agit d'obésité avec plusieurs classes à l'intérieur même de cette catégorie (**Tableau 1**).

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

Etat physique	IMC (kg.m ⁻²)
Maigreur	< 18,5
Poids normal (de référence)	18,5 – 24,9
Surpoids	25 – 29,9
Obésité	30 – 34,9
Obésité sévère	35 – 39,9
Obésité massive	≥ 40

Tableau 1 : Définition de l'Indice de Masse Corporelle (IMC) selon l'OMS.

Cependant la mesure de l'IMC n'est pas parfaite et présente quelques limites, notamment sur l'analyse individuelle de cet indice. Tout d'abord, même s'il est corrélé à la masse grasse, il ne renseigne pas sur la localisation de celle-ci. En effet, la localisation de la masse grasse peut être androïde (abdomen) ou gynoïde (hanches, fesses et cuisses) et cette répartition différente conditionne en partie le risque sur la santé. Par exemple, l'accumulation de graisse abdominale est associée à une prévalence accrue des maladies métaboliques et vasculaires. Le sexe de l'individu influence également l'IMC, de par la localisation de la masse grasse comme on vient de le voir précédemment mais également du ratio masse grasse / masse maigre (ou musculaire). Effectivement, chez l'homme la masse musculaire est plus importante que chez la femme, d'autant plus s'il s'agit d'un sportif. Un autre paramètre limitant à prendre en compte est l'âge de l'individu. Il a été montré que le ratio masse grasse / masse maigre augmente avec l'âge même si l'IMC varie très peu. De plus, cet indice n'est pas applicable chez les enfants, pour lesquels il existe d'autres prédicateurs. Enfin, l'IMC ne prend pas en compte les différences ethniques. Cet indice a été conçu en partie pour la population caucasienne mais il ne s'applique pas forcément aux autres ethnies, telle que la population asiatique par exemple, pour qui une autre échelle de seuil a été fixée par l'International Obesity Task Force (IOTF) en 2000. D'après ce tour d'horizon sur l'IMC, il apparaît clairement qu'il s'agit à l'heure actuelle du meilleur indice pour comparer deux populations proches mais que dans le cas d'analyses individuelles, l'utilisation de méthodes en supplément s'avère nécessaire.

En effet, il existe de nombreux autres moyens pour mesurer l'obésité. En premier lieu, des méthodes anthropométriques ont été mises au point, telles que la mesure du tour de taille qui est un excellent prédicteur de la masse grasse abdominale ou bien encore la mesure de l'épaisseur et de la circonférence de différents plis cutanés : bicipital, tricipital, sous-scapulaire et supra-iliaque. Ces méthodes, alternatives à l'IMC, restent simples d'accès à titre individuel mais sont malheureusement plus difficilement applicables à l'échelle d'une population. En effet, il y a de fortes variations d'appréciation d'un manipulateur à un autre et ces mesures ne prennent pas en compte la masse grasse gynoïde. D'autres méthodes, plus sophistiquées, ont également été développées. L'impédancemétrie bioélectrique permet de mesurer la masse grasse à l'aide de la différence de conductivité électrique de la masse grasse par rapport à la masse maigre (essentiellement constituée d'eau donc meilleur conducteur). L'hydrodensitométrie, quant à elle, consiste à calculer la masse grasse d'un individu à partir de sa densité, obtenue en l'immergeant dans l'eau. Cette méthode repose sur le principe d'Archimède. La dernière méthode, beaucoup plus coûteuse, est l'absorptiométrie biphotonique à rayons X (DEXA, en anglais). Elle consiste à balayer le corps entier ou en partie uniquement avec des rayons X de deux niveaux d'énergie. Le rapport d'atténuation des deux rayonnements varie en fonction des tissus traversés et permet donc d'une manière très précise de déterminer la masse grasse mais également les masses maigres et osseuses d'un individu en une seule mesure. Toutes ces méthodes sont trop onéreuses, trop lourdes technologiquement et nécessitent des moyens humains trop importants pour des mesures sur des populations entières. Le calcul de l'IMC reste donc la méthode la plus utilisée actuellement pour mesurer l'obésité.

La prévalence du surpoids et de l'obésité est en constante augmentation dans les pays riches mais également dans ceux en développement et notamment en milieu urbain. Selon l'OMS, le nombre de personnes obèses à travers le monde a doublé depuis 1980. En 2008, 1.4 milliards de personnes âgées de 20 ans et plus étaient en surpoids, dont 500 millions atteintes d'obésité. On estime que plus d'un adulte sur 10 est obèse. Malheureusement, cette épidémie atteint également les enfants. En effet, en 2010, l'OMS a estimé que 42 millions d'enfants étaient atteints de surpoids à travers le monde, dont 35 millions dans des pays en développement. De plus, il est avéré qu'un enfant obèse a une forte probabilité de le rester à l'état adulte et présentera des risques accrus de

développements de maladies associées, alourdissant encore plus le bilan de l'obésité dans les pays en développement. Cependant, tous les pays ne sont pas égaux devant l'épidémie d'obésité. En effet, les pays d'Amérique du Nord et en particulier les Etats-Unis, qui ont été le premier pays touché, voient leur taux d'obésité exploser dramatiquement. Ce taux est certes resté stable dans les années 60 et 70 avec un taux de 13.4% des adultes et 5% des enfants obèses en 1978 mais il a par la suite très rapidement augmenté pour atteindre 33.8% en 2007-2008 chez les adultes de plus de 20 ans, soit 1/3 des adultes américains (**Figure 1**). Chiffre encore plus alarmant, le surpoids (IMC ≥ 25) atteint un taux de 68% chez les plus de 20 ans aux Etats-Unis soit 2/3 des adultes environs. (Source : Center for Diseases Control and Prevention, National Center for Health Statistics). L'obésité morbide (ou massive : IMC ≥ 40), quant à elle, touchait 5.7% des adultes aux Etats-Unis en 2007-2008, soit environ 13 millions de personnes selon les chiffres du dernier recensement de 2010 réalisé aux Etats-Unis (Source : U.S. Census Bureau).

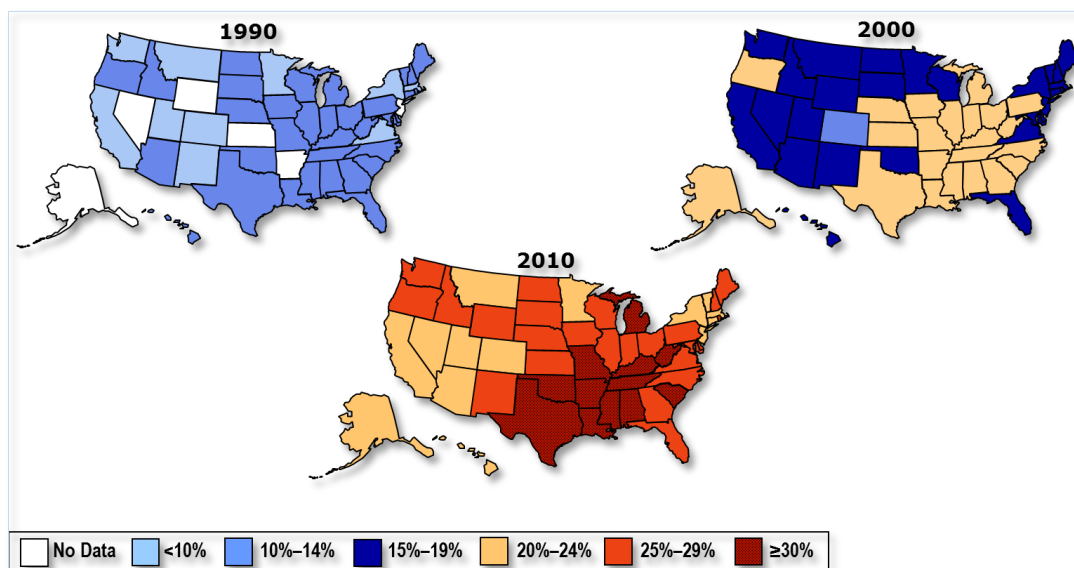


Figure 1 : Prévalence de l'obésité aux Etats-Unis depuis 1990. Exprimée en pourcentage de la population adulte totale. (Source : Center for Diseases Control and Prevention, National Center for Health Statistics, USA)

La situation au Canada est moins dramatique mais tout de même alarmante. En effet, entre 2007 et 2009, la prévalence de l'obésité a été estimée à 24.1% de la population adulte dont 3.1% d'obésité massive (Source : Statistique Canada).

L'épidémie d'obésité touche aussi l'Union Européenne (associée, dans l'étude décrite, à la Suisse, la Norvège et la Turquie) mais dans une moindre mesure. Certes, plus de

la moitié des adultes européens (50.1%) sont en surpoids mais « seulement » 15.5% sont obèses. Malgré tout, ces chiffres cachent une importante hétérogénéité au sein de l'UE. Effectivement, si certains pays ont un taux très faible d'obésité au sein de leur population (Roumanie : 7.9%, Italie : 9.9%, Norvège : 10%), d'autres atteignent des valeurs comparables à celles observées en Amérique du Nord (Malte : 22.3%, Irlande : 23% et Royaume-Uni : 24.5%) (**Figure 2**). (Sources : OCDE et UE, Health at a glance Europe 2010)

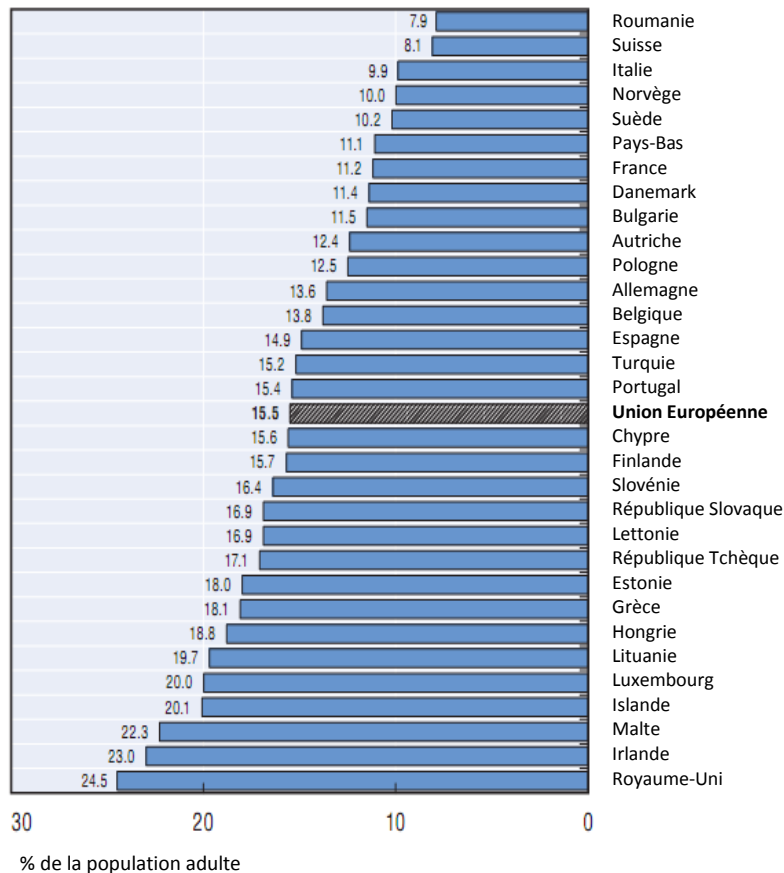


Figure 2 : Prévalence de l'obésité en Europe en 2010.
 Exprimée en pourcentage de la population adulte totale. (Sources : OCDE et UE, Health at a glance Europe 2010)

La France n'est pas épargnée par cette épidémie malgré les niveaux encore relativement faibles d'obésité mesurés de nos jours. On constate tout de même une évolution inquiétante au cours des 20 dernières années. Une enquête épidémiologique est réalisée tous les 3 ans afin de mesurer le surpoids et l'obésité au sein de la population française : il s'agit d'Obepi. Les résultats les plus récents datent de 2012 et font état d'une prévalence du surpoids de 47.3% dont 15% d'obésité parmi la population française. Au final,

l'augmentation relative moyenne de la prévalence de l'obésité depuis 2009 est plus modeste, correspondant à un ralentissement significatif de sa progression (**Figure 3**).

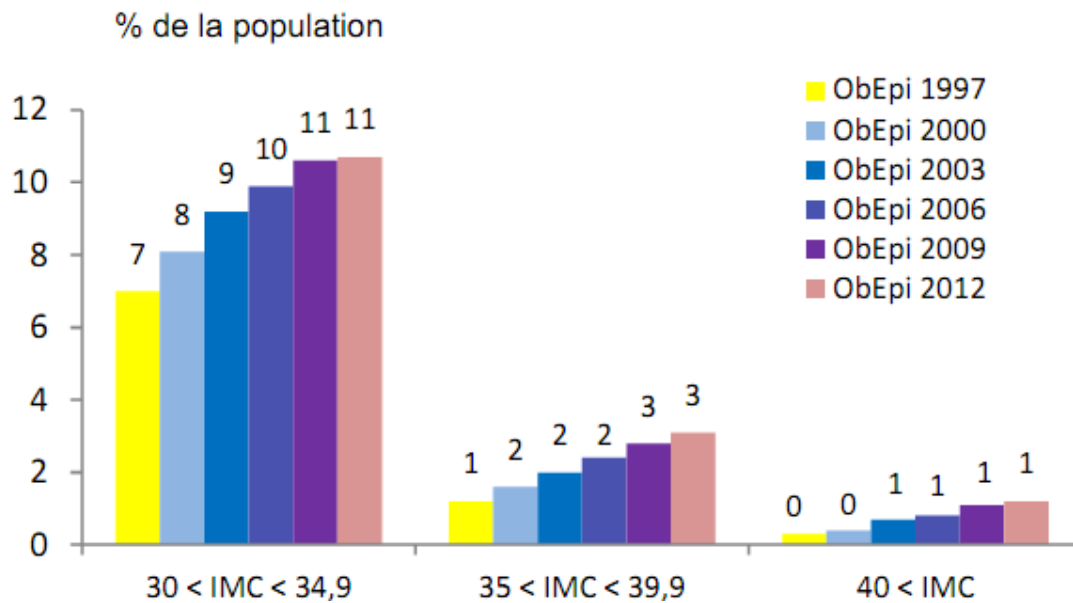


Figure 3 : Evolution des différentes classes d'obésité depuis 1997 en France. Exprimée en pourcentage de la population adulte totale. (Source : Obépi 2012, INSERM / KANTAR HEALTH / ROCHE)

L'augmentation de la prévalence de l'obésité s'accompagne d'une augmentation du tour de taille, marqueur d'une augmentation du taux de graisse abdominal. Ce paramètre est un des principaux critères pour diagnostiquer un syndrome métabolique chez un patient. En 2012, le tour de taille moyen des français était de 95.1 cm et celui des françaises de 86.5 cm, c'est-à-dire au-delà des seuils fixés par l'IDF (International Diabetes Federation). Ainsi, 52.3% des hommes et 67.6% des femmes ont atteint ou dépassé ces seuils. Des statistiques régionales ont également été réalisées et montrent que, pour la région Bourgogne, la prévalence de l'obésité a augmenté de 52% entre 1997 et 2012, passant de 9.8% à 14.9%. Ces chiffres classent, malgré tout, cette région parmi celles dont l'augmentation est la moins importante sur cette période. Il est à noter que la prévalence de l'obésité pour la région Bourgogne était de 15.5% en 2009. Il y a donc une diminution du nombre de personnes obèses de 3.9% sur cette période en Bourgogne.

Enfin, l'obésité touche également les pays en développement et se propage de manière alarmante. Si on s'intéresse à l'exemple de l'Egypte, une étude réalisée en 2002 montre qu'il y a un taux important d'obésité dans la population adulte, présentant des

différences en fonction du sexe des individus (certainement dues à la culture), mais également en fonction de l'habitat (les citadins ayant un accès facilité à la nourriture). Ainsi, les chiffres de 1998-99 font état d'une prévalence de l'obésité chez la femme de 40.6% en milieu urbain et 19.4% à la campagne contre 20% et 6% respectivement pour les hommes. (Galal 2002).

Pour expliquer cette propagation fulgurante au niveau mondial, il faut cerner les facteurs responsables de l'obésité. De nombreuses causes ont été identifiées à l'heure actuelle. Quelles sont-elles ?

2. Les causes de l'obésité

L'obésité est une maladie dont l'origine est clairement multifactorielle. Parmi les grandes causes identifiées, les deux principaux facteurs incriminés à l'heure actuelle sont la consommation excessive d'aliments énergétiques associée à une diminution des dépenses énergétiques.

2.1. Une balance énergétique déséquilibrée

La principale cause permettant d'expliquer l'épidémie actuelle d'obésité est l'alimentation et plus particulièrement le déséquilibre des apports énergétiques par rapport aux dépenses. L'évolution générale de la consommation alimentaire dans notre société est alarmante. Ainsi, on peut constater sur la **Figure 4** que si la quantité de protéines consommée reste stable, il y a une diminution de la consommation de glucides (due essentiellement aux glucides complexes) en faveur des lipides. Cette inversion de tendance de consommation, qui a débuté à la révolution industrielle, s'est accélérée vers 1960, correspondant au développement des industries agro-alimentaires et des grandes surfaces alimentaires. D'une manière intéressante, cette augmentation de la consommation de lipides ces 30 dernières années correspond au développement massif de l'épidémie d'obésité dans notre pays. Seulement, depuis les années 2000, la consommation de lipides à tendance à stagner autour de 40% des apports énergétiques totaux, correspondant presque aux Apports Nutritionnels Conseillés (ANC, 2010), qui fixent les apports énergétiques apportés par les lipides entre 35 et 40% des apports totaux. Ainsi, pour expliquer l'épidémie actuelle d'obésité, il faut également s'intéresser à la forte diminution des dépenses

énergétiques des français. En effet, si au début du XX^{ème} siècle, la dépense énergétique moyenne se situait à environ 3000 kcal/jour, le français moderne a une dépense énergétique de 2400 kcal/jour et la française de 1800 kcal/jour. Cette sédentarité de plus en plus marquée, due à une diminution des activités physiques en tout genre (sport mais aussi marche à pied au travail, au domicile), renforce l'apparition de l'obésité liée à une surconsommation de lipides.

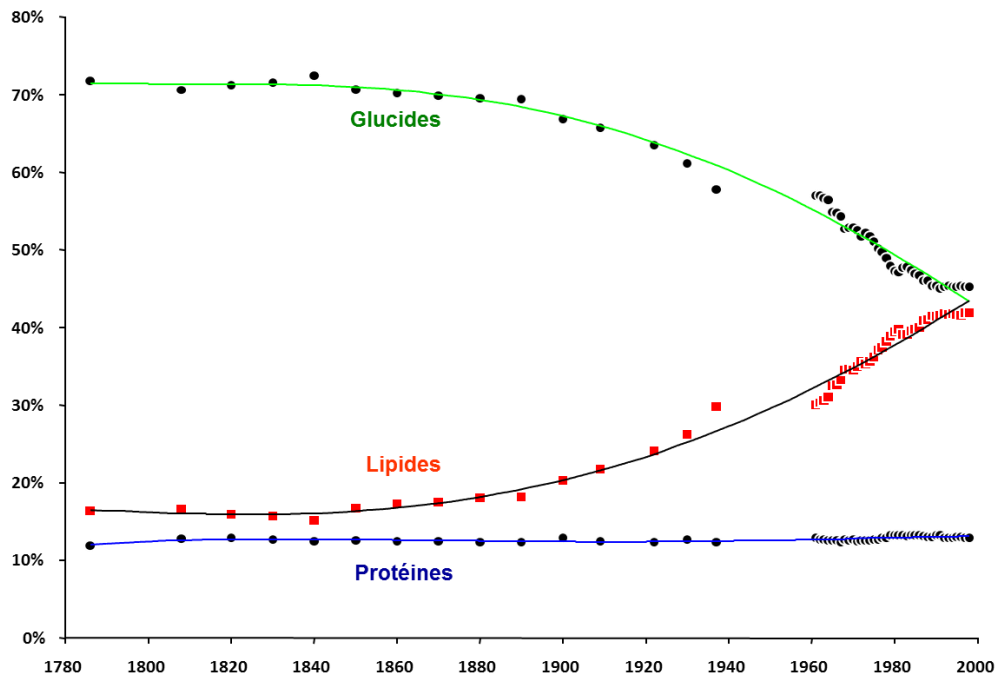


Figure 4 : La transition nutritionnelle en France.

Evolution de la consommation énergétique en glucides (vert), lipides (rouge) et protéines (bleu) de 1780 à nos jours en France. (Source : J.C. Toutain, FAO Stat)

Cependant, bien plus que le déséquilibre quantitatif des apports en lipides, c'est l'existence d'un déséquilibre qualitatif qui est incriminé (**Figure 5**). En effet, il existe dans les apports élémentaires des français, décrit par l'Etude SUVIMAX, un déficit d'acides gras mono-insaturés (AGMI) en faveur des acides gras saturés (AGS). De plus, une forte part des acides gras poly-insaturés (AGPI) consommés sont de la famille des oméga 6, qui favorisent l'adipogenèse, alors que ceux de la famille des oméga 3, dont le rôle cardio-protecteur a été démontré, sont très peu consommés (Simopoulos 2008). Ainsi, le rapport oméga 6 / oméga 3, qui devrait être de 4, est en réalité de 17, confirmant un réel déséquilibre qualitatif.

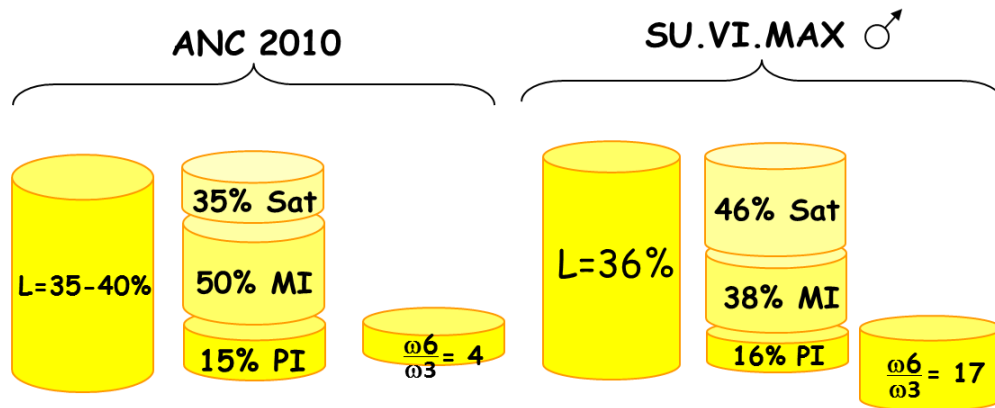


Figure 5 : Part des lipides dans les apports énergétiques conseillés (ANC 2010) et constatés (SU.VI.MAX) pour les français.

L : lipides, Sat : acides gras saturés ; MI : acides gras mono-insaturés ; PI : acides gras poly-insaturés ; ANC : Apports Nutritionnels Conseillés. (Source : P. Besnard)

La présence en grande quantité dans notre alimentation d'acides gras *trans* d'origine industrielle pose également un problème de santé publique, notamment pour leurs effets délétères au niveau des taux d'insuline circulant. On observe également une stéatose hépatique et une inflammation du tissu adipeux chez les souris qui consomment des AG *trans* (L. Clément et al. 2002; Hélène Poirier et al. 2006).

2.2. Les rôles de la génétique

Une autre piste pour expliquer le risque d'obésité est la génétique. L'obésité peut être causée par un défaut d'un seul gène dans le génome, on parle d'obésité monogénique. Actuellement, 8 gènes sont connus comme étant à l'origine d'obésité monogénique (**Figure 6**). Par exemple, chez les souris *ob/ob*, une mutation responsable de l'absence d'une hormone, la leptine dont le rôle principal est de limiter la prise alimentaire, est associée à une très forte obésité (Zhang et al. 1994). Le récepteur à cette hormone est également impliqué, notamment chez la souche de souris *db/db* ou bien encore chez le rat *fa/fa* chez qui il y a une absence de synthèse du récepteur associée encore une fois à une obésité (Tartaglia et al. 1995; Phillips et al. 1996). Ces découvertes ont été à l'origine de nombreuses études chez l'Homme visant à déterminer si la leptine et son récepteur étaient responsables de l'épidémie actuelle d'obésité. Malgré beaucoup d'espoir il s'est avéré que chez les patients atteints d'obésité massive, le nombre de cas chez qui ces défauts de synthèse étaient présents est très rare (Montague et al. 1997; K. Clément et al. 1998; Strobel et al. 1998). Au fil du temps, d'autres cas d'obésité monogénique ont été découverts chez

l'Homme mais avec une très faible représentation au sein de la population obèse. En revanche, il existe d'autres polymorphismes plus fréquents associés à l'obésité, comme ceux du gène PCSK1 (Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin type 1), codant pour une enzyme impliquée dans la biosynthèse de l'insuline ou bien le clivage de la pro-opiomélanocortine (Meyre et al. 2009) ou bien encore MC4R, le récepteur de type 4 aux mélanocortines, impliqué dans le contrôle hypothalamique de la prise alimentaire. On dénombre à ce jour une centaine de mutations identifiées chez des enfants et des adultes obèses (Dubern et al. 2008). Certaines de ces mutations peuvent être corrélées avec plus de 4% des cas d'obésité étudiés (Vaisse et al. 1998; Vaisse et al. 2000). D'autres polymorphismes, corrélés à l'obésité, et dans le cas du gène FTO (FaT mass and Obesity associated), corrélés également au diabète de type 2, ont été mis en évidence (Frayling et al. 2007). Ainsi, compte tenu de la rareté des cas, l'obésité monogénique ne permet pas d'expliquer l'épidémie d'obésité.

Les formes les plus communes d'obésité ont été caractérisées comme ayant une origine multi-génique : on parle d'obésité polygénique. Ainsi, un nombre très important de gènes ou de *loci* du génome humain a été associé à des phénotypes obésogènes (Rankinen et al. 2006). C'est le cas pour les gènes dit économes ou d'épargne. Dans cette théorie darwiniste, des mutations de ces gènes, au cours de l'évolution, confèrent un avantage évolutif aux personnes porteuses (Neel 1962). En effet, les mutations sont à l'origine d'une utilisation optimisée des lipides alimentaires et donc, en période de famine, présentent un avantage certain. Seulement, pendant des périodes de pléthore, comme celle que nous connaissons actuellement, ces mutations, qui favorisent le stockage des lipides, présentent surtout des inconvénients.

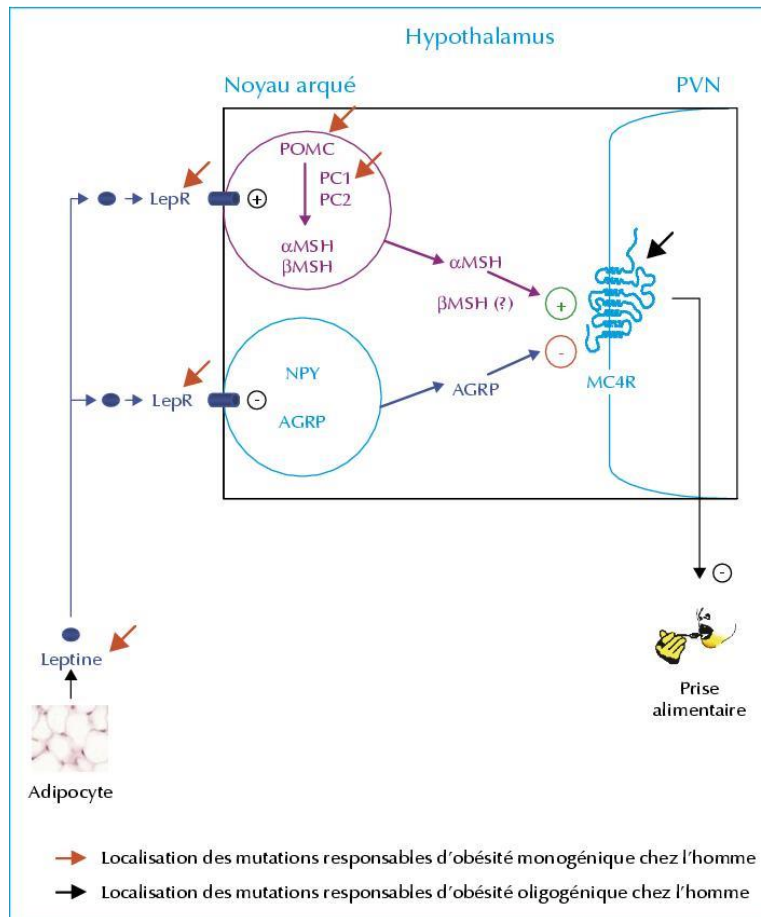


Figure 6 : Les principales mutations à l'origine de cas d'obésité monogénique. LepR : récepteur à la leptine ; POMC : pro-opiomélanocortine ; PC : proprotéine convertase ; MSH : mélanocortine ; NPY : neuropeptide Y ; AGRP : *agouti-related peptide* ; MC4R : récepteur de type 4 aux mélanocortines. (Source : Dubern, 2008)

2.3. Des causes épigénétiques : l'empreinte métabolique

L'épigénétique est l'étude des changements héréditaires de l'expression génique indépendants de l'altération de la séquence nucléotidique de l'ADN. A cause de leur réversibilité, ces changements sont fortement soumis aux modifications de l'environnement. Les modifications épigénétiques les plus étudiées sont la méthylation de l'ADN et les modifications des histones (acétylation, méthylation, phosphorylation...) (Junien et al. 2005). Ainsi, des états nutritionnels particuliers (carences protéiques, régimes hyperlipidiques...) pendant la période pré-natale peuvent entraîner des modifications épigénétiques qui conduisent à des troubles métaboliques à l'âge adulte, comme le diabète de type 2 ou encore l'obésité. Les études concernant ces changements chez l'Homme sont encore rares mais il en existe de nombreuses chez l'animal montrant des liens entre les régimes alimentaires, les changements épigénétiques, et les maladies associées (Seki et al. 2012). Le

modèle bien connu des souris yellow agouti a permis de démontrer que les modifications épigénétiques pouvaient être transmises à la génération suivante d'une manière plus ou moins exprimée mais également que le régime alimentaire de la mère influence le niveau de méthylation de l'ADN de la progéniture (Waterland and Jirtle 2004). Il existe donc une réversibilité de ce phénomène. Ainsi, il apparaît important de développer les études de l'impact de l'épigénétique sur l'obésité chez l'Homme.

2.4. Des facteurs environnementaux

Le Bisphénol A (BPA) est l'un des produits chimiques les plus utilisés dans l'industrie agro-alimentaire pour fabriquer, entre autres, des emballages alimentaires souples ou bien encore les résines de revêtement des boîtes de conserve. Cette molécule est un contaminant alimentaire, c'est-à-dire qu'elle migre de l'emballage jusqu'au produit qu'elle contient. De nombreuses études ont été réalisées pour déterminer si le BPA, qu'on retrouve dans le sang et les urines des consommateurs, était une molécule dangereuse ou non (Schneyer 2011). En effet, ce sujet est très débattu à travers le monde et quelques pays ont déjà interdit ou très fortement déconseillé son utilisation, comme en France par exemple. Une étude chinoise très récente (Wei et al. 2011) montre que l'exposition de manière périnatale de rats Wistar à de faibles doses de BPA favorise la prise de poids, l'insulinorésistance et détériore la tolérance au glucose. Ces effets sont exacerbés si les rats sont en régime hyperlipidique. Le BPA fait partie d'une liste importante de perturbateurs endocriniens dont les rôles obésogènes sont peu à peu décryptés (Grün and Blumberg 2009). De plus, une étude épidémiologique réalisée en 2012 indique qu'il existe une corrélation positive entre la quantité de BPA recueillie dans l'urine d'adolescents et leur IMC (Wang et al. 2012).

La flore intestinale semble également jouer un rôle dans l'apparition de l'obésité. En effet, une étude concernant l'écologie de la flore intestinale chez la souris a permis de montrer qu'une souris "germ-free" à qui l'on inocule une flore intestinale normale voit sa masse adipeuse augmenter de 60% et ceci malgré une diminution de la consommation alimentaire. Par des mécanismes complexes, la flore intestinale inoculée aux souris favorise la production hépatique de triglycérides (TG), dont le stockage est facilité par une absence d'inhibition de la lipoprotéine lipase (LPL). Les auteurs proposent que le régime alimentaire

actuel des pays développés, le « Western-diet », pourrait favoriser le développement de souches particulières au niveau de la flore intestinale, prédisposant ainsi les individus à des risques accrus de développer une obésité (Bäckhed et al. 2004). Des analyses de la flore intestinale de souris de la lignée *ob* indiquent que les animaux obèses (*ob/ob*) présentent une augmentation de la population bactérienne de la souche *Firmicutes*, associée à une diminution des *Bacteroidetes*, en comparaison des souris de type sauvage (Ley et al. 2005). Ainsi, l'obésité chez la souris pourrait affecter la diversité de la flore intestinale. Des modifications de la composition de cette flore intestinale pourraient être envisagées afin de réguler l'équilibre énergétique chez les personnes obèses.

2.5. L'économie, cause de l'obésité

L'étude Obépi de 2012 s'est également attachée à mesurer la prévalence de l'obésité en fonction des catégories socio-professionnelles de la population étudiée. La principale conclusion est que la prévalence de l'obésité est deux fois plus importante chez les catégories professionnelles les moins favorisées (16.2% chez les employés, 16.7% pour les ouvriers) que pour les plus favorisées (8.7% chez les cadres supérieurs). Le revenu est un facteur important permettant d'expliquer ces observations. En effet, le poste alimentation d'une famille à bas revenu peut atteindre jusqu'à 50% du budget du ménage, contre 15% en moyenne nationale. Ainsi, dans un souci d'économie, les familles les plus pauvres adaptent leurs achats alimentaires et favorisent les produits les moins chers, souvent plus gras et à forte densité énergétique (= facteur de risque pour la santé), au détriment des fruits et des légumes souvent plus chers et à moindre rendement calorique, mais à haute densité nutritionnelle (= facteur protecteur pour la santé). En conclusion, les contraintes budgétaires liées aux plus faibles revenus des catégories socio-professionnelles moins favorisées entraînent des achats de denrées alimentaires avec de faibles valeurs nutritionnelles et des forts rendements énergétiques, expliquant en partie l'augmentation de la prévalence de l'obésité, notamment chez ces personnes-là.

3. Les conséquences de l'obésité

3.1. Les conséquences sur la santé

L'obésité est à l'origine de nombreuses maladies métaboliques associées, telles que des dyslipidémies, l'hypertension artérielle, certains cancers ou bien encore une hyperglycémie à jeun, prédisposant l'individu atteint au développement d'un diabète de type 2 ou à des complications cardio-vasculaires (**Figure 7**).

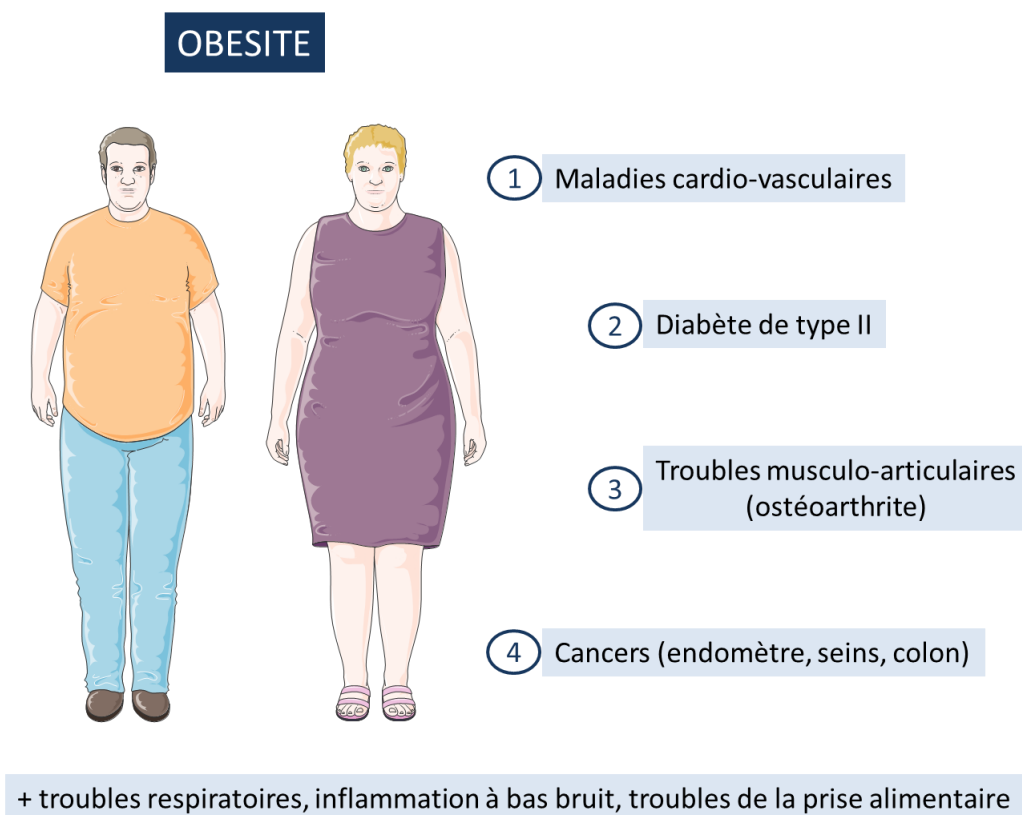


Figure 7 : Complications pour la santé liées à l'obésité.

La principale origine de ces pathologies est une production perturbée d'adipokines. Ainsi, par exemple une surproduction de leptine associée à une diminution de sécrétion d'adiponectine sont responsables de l'apparition d'un diabète de type 2, l'augmentation de la production d'angiotensinogène est responsable de la survenue d'une hypertension et une augmentation de la concentration en œstrogène pourrait être à l'origine de certains cancers.

Le syndrome métabolique est le cas le plus extrême d'association de symptômes liés à l'obésité. Plusieurs définitions du syndrome métabolique ont été proposées au cours du temps depuis la première donnée par l'OMS en 1998. Le **Tableau 2** présente une synthèse des définitions les plus couramment admises de nos jours par les spécialistes (Alberti et al. 2009). Il apparaît que l'augmentation du tour de taille (marqueur d'une augmentation des graisses abdominales) est un facteur de risque de maladie métabolique plus important que l'excès de masse grasse en générale, et par conséquent de l'augmentation de l'IMC. Pour le National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III (NCEP-ATP III, 2001), un patient qui remplit 3 critères sur les 5 décrits peut être diagnostiqué comme atteint du syndrome métabolique. Une révision a été apportée par L'international Diabetes Federation (IDF) en 2005 et s'applique essentiellement à la population européenne puisque les seuils de tour de taille ont été adaptés à cette population. Le tour de taille élevé (supérieur à 94 cm pour les hommes et à 80 cm pour les femmes) devient un critère indispensable auquel 2 des 4 autres critères décrits doivent être remplis pour diagnostiquer un syndrome métabolique.

L'épidémie actuelle d'obésité est responsable d'une augmentation constante des cas diagnostiqués de syndrome métabolique, qui devient une priorité des organismes de santé à travers le monde. En France, les résultats de l'étude MONICA menée par l'OMS à Lille, Strasbourg et Toulouse font état d'une prévalence du syndrome métabolique chez 17.9% des femmes et 23.5% des hommes âgés de 35 à 65 ans.

Organismes (année) Critères	NCEP-ATP III (2001)	AACE (2003)	AHA/NHLBI (2005)	IDF (2005)
Insulino-résistance		Intolérance au glucose ou glycémie post-prandiale anormalement élevée		
Tour de taille	H ≥ 102cm F ≥ 88cm	IMC ≥ 25kg.m ⁻²	H ≥ 102cm F ≥ 88cm	Pour les européens : H ≥ 94cm F ≥ 80cm
Bilan lipidique	TG ≥ 1,5g.L ⁻¹ HDL-C : H < 0,4, F < 0,5g.L ⁻¹		TG ≥ 1,5g.L ⁻¹ ou traitement en cours HDL-C : H < 0,4, F < 0,5g.L ⁻¹	
Glycémie	Glycémie ≥ 1,1g.L ⁻¹ (DT2 inclus)	Intolérance au glucose ou glycémie post-prandiale anormalement élevée (pas de DT2)	Glycémie ≥ 1g.L ⁻¹ ou traitement en cours	Glycémie ≥ 1g.L ⁻¹ (DT2 inclus)
Pression artérielle	PAS ≥ 130mmHg PAD ≥ 85mmHg		PAS ≥ 130mmHg PAD ≥ 85mmHg ou traitement en cours	
Diagnostique	3 critères minimum	Intolérance au glucose ou glycémie post-prandiale anormalement élevée + 1 autre critère minimum	3 critères minimum	Tour de taille élevé + 2 critères minimum

Tableau 2 : Les définitions les plus courantes du syndrome métabolique.

NCEP-ATP III : National Cholesterol Education Program – Adult Treatment Panel III ; AACE : American Association of Clinical Endocrinologists ; AHA/NHLBI : American Heart Association / National Heart, Lung and Blood Institute ; IDF : International Diabetes Federation ; H : Homme ; F : Femme ; IMC : Indice de Masse Corporelle ; TG : Triglycéridémie ; HDL-C : Taux de HDL-Cholestérol ; DT2 : Diabète de type 2 ; PAS : Pression Artérielle Systolique ; PAD : Pression Artérielle Diastolique. (Adapté de : (Alberti et al. 2009)

3.2. Les conséquences sur l'économie

En plus des conséquences physiopathologiques dramatiques qu'elle engendre, l'obésité présente également des conséquences économiques et sociales non négligeables. En premier lieu, l'obésité est une maladie stigmatisée, notamment au sein des pays industrialisés, ce qui entraîne une discrimination des personnes obèses et plus particulièrement des enfants. Sous la pression sociale, ces personnes se mettent des barrières à ne pas dépasser, limitant ainsi leur accès aux études supérieures et aux emplois à haut revenu. Ainsi selon l'étude Obépi de 2012, la prévalence de l'obésité est inversement

corrélée au niveau d'instruction, et ce depuis 1997. Dans un second temps, l'épidémie actuelle d'obésité a un coût énorme pour les agences de santé internationales. Une étude réalisée aux Etats-Unis évalue les coûts induits par le développement de la surcharge pondérale à 147 milliards de dollars en 2008, contre 78.5 milliards de dollars en 1998 (Finkelstein et al. 2009). En France, le nombre d'études portant sur ce sujet est faible et il s'agit d'études anciennes. Néanmoins, le coût annuel de prise en charge de l'obésité par l'assurance maladie serait de 4 milliards d'euros et de 10 milliards si l'on s'intéresse au surpoids en général (Source : Rapport d'Information de l'Assemblée Nationale, Valérie Boyer, sept 2008). Ainsi, les coûts relatifs à cette épidémie sont considérables pour les Etats et il devient indispensable de mieux connaître les causes de cette maladie pour mieux la traiter.

En conclusion, l'obésité est une maladie qui présente un coût social et humain très important. Même si l'origine de cette pathologie est multifactorielle, il apparaît que les aspects nutritionnels, notamment ceux liés aux lipides alimentaires, sont prépondérants et sont un moyen d'agir contre l'explosion de l'épidémie d'obésité.

II. Les lipides alimentaires

Les lipides alimentaires sont au cœur de la recherche contre l'obésité. Afin de mieux appréhender la suite de cette introduction bibliographique, ce chapitre sera consacré aux lipides alimentaires et à leurs différents rôles au sein de l'organisme.

Les lipides alimentaires ont souvent mauvaise réputation car ils sont associés dans l'esprit collectif au surpoids, à l'obésité et aux maladies cardio-vasculaires. Cependant leur consommation, en accord avec les Apports Nutritionnels Conseillés, est essentielle au maintien d'un bon état de santé. En effet, les lipides sont des molécules essentielles au métabolisme cellulaire, ils représentent une source importante d'énergie et ils servent également de véhicules pour les vitamines liposolubles. Les lipides représentent en moyenne 40% de l'énergie apportée par notre alimentation. Environ 95% des lipides ingérés sont des triglycérides (TG) (Guesnet et al. 2005), 4.5% des phospholipides (PL) et les 0.5% restant sont

les stérols, essentiellement du cholestérol retrouvé sous forme d'ester. On peut également retrouver dans les aliments des traces d'acides gras libres (AGL).

1. Structure des lipides alimentaires

Principaux représentant des lipides alimentaires, les triglycérides sont des esters de 3 acides gras (AG) et d'un glycérol. Ils forment la classe des glycérides avec les mono et diglycérides (qui sont des esters de glycérol et de 1 ou 2 AG respectivement). Ils sont les principaux constituants des huiles végétales ou des graisses animales. Une caractéristique de ces TG est leur stabilité : il s'agit de lipides neutres. On retrouve principalement ces TG stockés au niveau du tissu adipeux qui constitue la principale forme de réserve d'énergie dans l'organisme. En cas de nécessité, les TG sont hydrolysables, libérant ainsi des AG qui sont les molécules hautement énergétiques. Il est à noter que les AG peuvent être retrouvés sous forme libre dans l'alimentation mais de façon minoritaire.

Les phospholipides, dont les principaux représentants sont les phosphoglycérides, sont des molécules amphipatiques constituées d'une tête polaire et de deux queues aliphatiques. Ils sont constitués le plus souvent d'un résidu glycérol-3-phosphate estérifié avec un alcool azoté et deux acides gras. On retrouve notamment des phosphatidylcholines ou des phosphatidyléthanolamines. De par leurs caractéristiques d'hydrophobicité, les PL s'organisent en micelles, en liposomes ou en double couches de telle sorte que seule la partie hydrophile soit en contact avec des molécules d'eau. Ainsi, les PL représentent les principaux constituants des membranes cellulaires.

Les stérols sont des lipides contenant un noyau de stérane dont le carbone 3 est porteur d'un groupe hydroxyle. On retrouve à la fois le cholestérol, d'origine animale, et les phytostérols, d'origine végétale, sous forme d'esters d'AG. Ces stérols sont retrouvés en faible quantité dans certains légumes mais surtout dans les abats, les œufs et le beurre. Le représentant principal de cette classe est le cholestérol. Il s'agit d'un constituant des membranes biologiques et d'un précurseur de multiples molécules telles que des vitamines, des hormones stéroïdes ou bien encore les sels biliaires.

Il est important de noter que ces différents lipides apportés par l'alimentation ne sont pas en mesure de traverser les membranes biologiques. Ainsi, pour pénétrer la barrière

intestinale, les TG, PL et esters de cholestérol sont hydrolysés afin d'obtenir notamment des AG libres qui pourront être absorbés ensuite par les entérocytes. En effet, ces cellules intestinales possèdent à leur surface apicale un micro-environnement particulier, la couche d'eau non-agitée, qui consiste en un environnement aqueux contenant un gradient de pH généré par des pompes à protons favorisant la protonisation des AGLC et ainsi leur traversée par voie passive de la membrane plasmique des entérocytes. Une fois dans la cellule, ces AG sont pris en charge par des protéines spécifiques et sont à nouveau estérifiés en TG ou PL, puis inclus dans de plus grosses structures telles que les chylomicrons qui vont permettre leur transport dans la lymphe puis dans le sang.

Ainsi, les acides gras d'origine alimentaire constituent l'unité de structure la plus importante au niveau de l'organisme. Ils constituent un ensemble hétérogène de molécules, classées selon plusieurs critères (**Figure 8**). Il s'agit d'acides carboxyliques dont le nombre de carbones sur la chaîne carbonée est variable. Ainsi, le nombre de carbones constitue le premier critère de classement. Les acides gras à chaîne courte (AGCC) contiennent moins de 8 carbones, les acides gras à chaîne moyenne (AGCM) contiennent de 8 à 14 carbones et enfin pour des chaînes carbonées de 16 carbones et plus on parle d'acides gras à longue chaîne (AGLC). Le second critère est le nombre d'insaturations que contient l'acide gras. Soit il n'en contient aucune, on parle d'acides gras saturé (AGS), soit il en contient une seule, on parle d'acides gras mono-insaturés (AGMI), ou soit il en contient plusieurs et dans ce cas on parle d'acides gras polyinsaturés (AGPI). Au sein de cette dernière catégorie, on peut distinguer deux types d'AGPI. En fonction de la distance de la première insaturation avec le groupement méthyl de la chaîne carbonée, on distingue les acides gras n-3 (ou oméga 3) et les acides gras n-6 (ou oméga 6). Les représentants principaux de ces deux types d'AGPI sont l'acide α -linoléique (ALA) pour les oméga 3 (C18:2 n-3) et l'acide linoléique (LA) pour les oméga 6 (C18:2 n-6). On parle d'acides gras indispensables car ils ne peuvent pas être synthétisés par l'organisme. En effet, les animaux et les plantes ne possèdent pas les mêmes enzymes responsables de la désaturation des AG et seules les plantes possèdent les Δ 12 et Δ 15 désaturases à l'origine de la formation des acides gras de la famille des oméga 3 et oméga 6 à partir de l'acide oléique (C18:1 n-9). C'est pourquoi ces acides gras indispensables doivent être obligatoirement apportés par l'alimentation. On les retrouve essentiellement dans des graines et leurs huiles, telles que le tournesol, le maïs ou encore le colza. Ces deux

acides gras indispensables sont des précurseurs d'AG dérivés appelés « conditionnellement indispensables » car ils sont rigoureusement requis si les précurseurs sont absents. Il s'agit majoritairement de l'acide eicosapentaénoïque (EPA, C20:5 n-3), de l'acide docosahexaénoïque (DHA, C22:6 n-3) et de l'acide arachidonique (AA, C20:4 n-6). L'ensemble de ces acides gras sont dits « AG essentiels ».

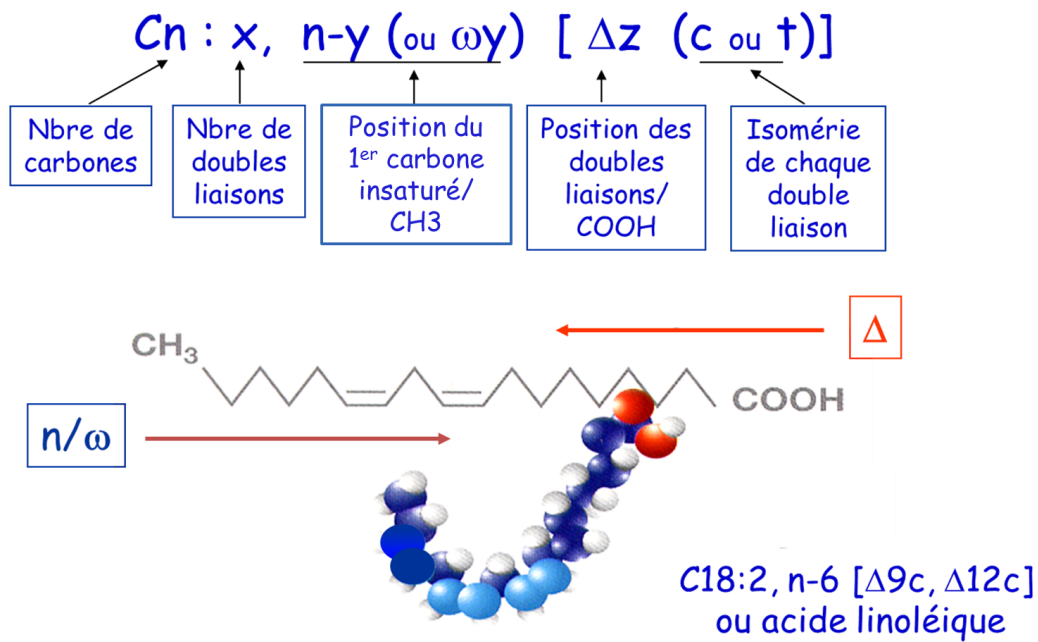


Figure 8 : La nomenclature des acides gras.
(Source : P. Besnard)

Enfin, un dernier critère permet de classer les acides gras insaturés : il s'agit de leur isomérisation. L'isomérisation géométrique est définie par la position de la chaîne carbonée de part et d'autre de l'insaturation. On parle d'isomère *cis* quand les deux parties de la chaîne carbonée séparées par la double liaison se trouvent dans un même plan horizontal. C'est cet isomère qui est très majoritaire dans l'alimentation. L'isomère *trans* quant à lui peut être trouvé dans la nature, comme par exemple l'acide ruménique (C₁₈:2(Δ_{cis}-9, Δ_{trans}-11) produit dans le rumen de la vache, mais le plus souvent il s'agit d'isomérisation industrielle provoquée par des procédés tels que l'hydrogénation des huiles végétales.

2. Fonctions cellulaires des lipides alimentaires

Les lipides alimentaires sont des molécules qui ont de multiples rôles au sein de l'organisme. On leur reconnaît notamment des rôles structuraux mais également de régulation et énergétique (**Figure 9**).

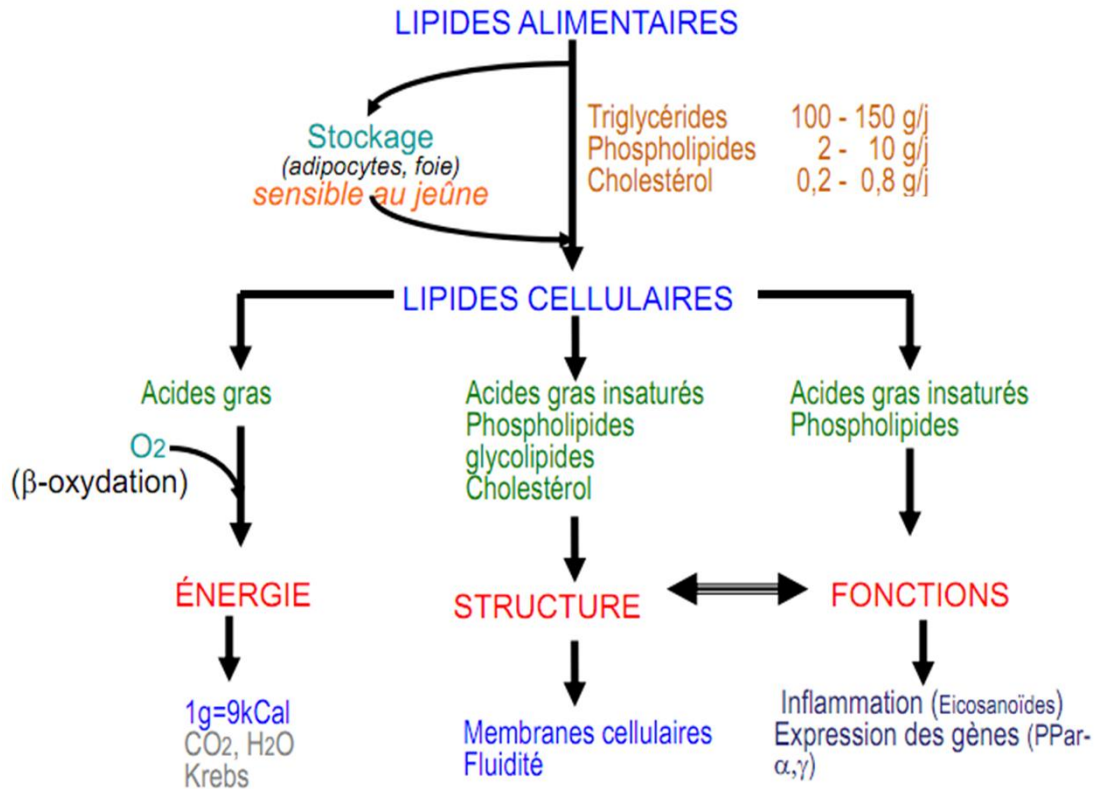


Figure 9 : Les lipides alimentaires : apports alimentaires et rôles cellulaires.

(Source : Isabelle HININGER-FAVIER, Université Joseph Fourier, Grenoble. Année universitaire 2010/2011)

2.1. Rôle structural

Les lipides sont les molécules principales des membranes biologiques (avec les protéines). En effet, les membranes cellulaires de toute cellule vivante sont constituées d'une double couche de PL dont les AG fondamentaux qu'ils contiennent sont les AGPI essentiels LA (C18:2 n-6), AA (C20:4 n-6), DHA (C22:6 n-3) ainsi que l'acide oléique (OLA), un AGMI (C18:1 n-9). Parmi ces PL, on trouve également une proportion non négligeable de cholestérol et de sphingolipides, formant les radeaux lipidiques de la membrane. Ces structures sont nécessaires à certaines activités enzymatiques mais également aux transporteurs et récepteurs présents au niveau membranaire. Les membranes sont

représentées par un modèle de mosaïque fluide, un système dynamique en mouvement permanent influencé par sa composition. Une augmentation de la proportion en AGS dans la composition en PL entraîne une rigidité accrue de la membrane. En effet, la diminution de l'encombrement stérique entraîne une augmentation d'interaction entre les PL et donc une diminution de la fluidité membranaire. De même, l'augmentation de la proportion de cholestérol peut réduire sa fluidité. Cette variation de fluidité influence l'activité de différentes protéines membranaires telles que des récepteurs aux hormones comme celui de l'insuline (Bruneau et al. 1987). Il est à noter que la composition en AG des PL membranaires est le reflet de la qualité des lipides alimentaires consommés (Otten et al. 1993; Otten, Iazzo, and Eichinger 1997). Ainsi, une perturbation dans les apports alimentaires en AG chez un individu peut entraîner une modification des propriétés de fluidité des membranes cellulaires de cet individu et ainsi des perturbations au niveau de l'activité des récepteurs membranaires par exemple.

2.2. Rôle régulateur

Les lipides sont des précurseurs de molécules bioactives. Les médiateurs lipidiques jouent un rôle dans tous les tissus de l'organisme. Ces molécules oxygénées régulent des fonctions aussi diverses que la reproduction, la physiologie cardiaque, la coagulation sanguine, l'hémostase, l'inflammation, le fonctionnement des glandes endocrines et exocrines (Guesnet et al. 2005). Les AGPI sont les précurseurs de ces molécules appelées eicosanoïdes. Les eicosanoïdes sont des dérivés oxydés d'AG insaturés à 20 carbones, l'AA étant un des principaux précurseurs. Leur biosynthèse nécessite tout d'abord la libération d'AG des PL par l'action de la phospholipase A2 suite à l'activation d'un récepteur membranaire. Ensuite, ces AG libérés sont transformés en produits actifs par des oxygénases. Il existe deux voies de synthèses possibles : la voie des cycloxygénases (ou voie des prostanoides) donnant naissance aux prostaglandines, prostacyclines et thromboxanes et la voie des lipoxygénases donnant naissance aux leucotriènes. Au niveau cytosolique, ces eicosanoïdes agissent généralement *via* des récepteurs couplés aux protéines G puis l'adénosine monophosphate cyclique (AMPC), les cascades de la protéine kinase A et enfin la mobilisation des réserves de calcium.

Les AGLC peuvent également agir sur la fonction cellulaire de manière directe. En effet, les acides gras, et plus particulièrement les AGPI, sont impliqués dans beaucoup d'étapes de la transduction du message intracellulaire. On peut notamment citer l'action des AG libérés des PL membranaires sous l'action des phospholipases, et en particulier l'AA, qui peut agir en tant que second messenger (Naor 1991) et activer la protéine kinase C, impliquée dans la transduction d'un signal et dans la régulation cellulaire (Nishizuka 1988). Il a également été montré que les AGLC modulent l'action des phospholipases ou encore contrôlent l'ouverture de canaux ioniques potassiques, calciques et chlorures (Sumida, Graber, and Nunez 1993).

Un autre lipide alimentaire est précurseur de molécules biologiques actives. Il s'agit du cholestérol qui est le précurseur de la vitamine D₃ ou des sels biliaires par exemple mais également d'hormones telles que le cortisol, la cortisone, l'aldostérone, la progestérone et les œstrogènes.

De plus, il est maintenant très bien connu que les AGLC peuvent réguler l'expression génique (Kliwer et al. 1997). En effet, les AGLC et plus particulièrement les AGPI peuvent activer ou réprimer des facteurs de transcription impliqués dans la régulation de l'expression de nombreux gènes impliqués dans le métabolisme des lipides. Les AGPI peuvent, par exemple, activer les facteurs de transcription PPAR (*Peroxisomal Proliferator Activated Receptor*) et permettre ainsi la régulation de gènes impliqués dans le métabolisme des lipides et la β -oxydation au niveau hépatique. Les AGPI peuvent également agir indirectement sur LXR (*Liver X Receptor*) en tant que compétiteur avec le ligand naturel (oxysterols) et réguler ainsi la lipogenèse *via* SREBP1c (*Sterol Regulatory Element-Binding Protein*). De plus, le cholestérol permet, *via* les protéines SREBP, de réguler l'expression de gènes impliqués dans la synthèse endogène de cholestérol mais aussi dans le captage et la bio-synthèse des AG. Enfin, les acides biliaires sont les ligands naturels des récepteurs nucléaires FXR (*Farnesoid X receptor*) qui modulent l'activité de gènes impliqués dans le métabolisme des acides biliaires et également des lipides.

2.3. Rôle énergétique

Les AGLC constituent une source très importante d'énergie pour l'organisme. En effet, en produisant 9 kcal/g, les lipides sont les nutriments présentant la plus grande

densité énergétique. La principale voie de dégradation des AGLC alimentaires est la β -oxydation (ou oxydation mitochondriale), un processus hautement efficace qui génère une grande quantité d'énergie.

3. Fonctions physiologiques des lipides alimentaires : régulation de la prise alimentaire

Physiologiquement, le comportement alimentaire résulte de l'intégration de signaux multiples (nerveux, hormonaux, métaboliques) convergeant vers des zones spécifiques du système nerveux central pour y être intégrés. Ces informations d'origine nutritionnelle conditionnent à la fois le choix des aliments à consommer (préférence ou aversion) et les déterminants de la prise alimentaire : initiation (faim), durée (rassasiement) et intervalle entre les repas (satiété). Les régulations homéostatiques mises en jeu sont donc essentielles pour adapter les apports caloriques aux besoins énergétiques de l'organisme. En fait, la composition chimique des aliments est perçue par l'intermédiaire d'informations précoces d'origine somesthésique, olfactive et gustative déclenchées dès la mise en bouche de l'aliment et de signaux neuroendocrines et métaboliques plus tardifs d'origine post-ingestive puis post-absorptive. Pour les lipides alimentaires, dont l'implication dans le contrôle du comportement alimentaire fait l'objet d'une recherche soutenue, certains mécanismes impliqués ont été mis en évidence mais il reste encore beaucoup de points à éclaircir. Dans ce chapitre seront développés les mécanismes mis en jeu dans le contrôle de la prise alimentaire par les lipides.

3.1. L'effet gratifiant des lipides

Les lipides présentent un effet gratifiant très important qui conditionne l'organisme très rapidement à une préférence pour les aliments riches en lipides. En effet, les trois composantes que sont le « liking », correspondant au plaisir qu'on obtient en mangeant un aliment, le « wanting » qui contribue à la décision d'initier une prise alimentaire et le « learning » qui permet l'apprentissage et la reconnaissance des aliments sont des paramètres renforcés positivement et d'une manière très importante par les lipides. Les mécanismes moléculaires impliqués dans ces phénomènes commencent à être décryptés

chez le rongeur de laboratoire. Deux systèmes ont été identifiés : il s'agit des systèmes opioïdérique et dopaminergique. Le système opioïdérique au niveau des noyaux arqués et paraventriculaires de l'hypothalamus a été étudié. Chez des rats conditionnés à consommer une émulsion d'huile de maïs quotidiennement à heure fixe (Mizushige et al. 2006) ou bien lors d'un régime hyperlipidique (Chang et al. 2007), une augmentation de l'expression de la pro-opiomélanocortine (POMC), de l'orexine, de la β -endorphine ou bien encore de la dynorphine et de la β -encéphaline a été mesurée. Ces peptides opiacés sont de puissants régulateurs de la prise alimentaire qui favorisent une augmentation de la consommation d'aliments énergétiques et en particulier d'aliments riches en lipides, entraînant la formation d'une boucle de régulation positive. Le système dopaminergique au niveau du noyau *accumbens*, une structure neurale majeure impliquée dans le système de la récompense, semble également avoir un rôle. En effet, une injection systémique d'antagoniste des récepteurs D1 et D2 à la dopamine diminue la consommation d'une émulsion d'huile de maïs chez le rongeur de laboratoire (Weatherford et al. 1990; Weatherford, Smith, and Melville 1988).

Ainsi, l'attraction pour les lipides, pouvant conduire dans des cas extrêmes à une addiction (Imaizumi, Takeda, and Fushiki 2000), est un phénomène complexe qui résulte de l'intégration de signaux de natures variées au sein de plusieurs structures cérébrales, telles que l'hypothalamus ou bien encore le noyau *accumbens*. Cependant, malgré la dimension gratifiante des lipides, leurs effets satiétogènes est une autre composante très importante pour la régulation de la prise alimentaire par les lipides.

3.2. Les effets satiétogènes des lipides

Une fois ingérés, les lipides atteignent le système gastro-intestinal où ils déclenchent des cascades d'évènements visant notamment à réguler la prise alimentaire. On peut différencier deux phases distinctes dans ces phénomènes tardifs : les effets post-ingestifs et les effets post-absorptifs.

3.4.1 Les effets post-ingestifs

La cholécystokinine (CCK) joue un rôle essentiel dans cette régulation. Cette hormone, produite par les cellules entéro-endocrines de type I essentiellement localisées au niveau du grêle proximal, est rapidement sécrétée suite à l'ingestion de lipides chez la

plupart des mammifères dont l'Homme. Chez le rongeur, l'injection systémique de CCK s'accompagne d'un arrêt de la prise alimentaire. Cette régulation est la conséquence d'un contrôle paracrine d'afférences vagues intestinales exprimant le récepteur CCK1-R (Raybould 2007). De ce fait, la vagotomie abolit l'effet satiétogène de la CCK. Cette régulation est cependant modulable puisque la consommation chronique d'un régime riche en lipides s'accompagne chez le rongeur d'une réduction de la réponse du nerf vague à l'injection de CCK (Malendowicz et al. 2003). Il a été récemment montré que cette désensibilisation est la conséquence d'une régulation dynamique du récepteur à CCK1-R dont le nombre, au niveau des afférences vagues intestinales, diminuerait rapidement consécutivement à une consommation de lipides (Raybould 2007). Le nerf vague exprime aussi les récepteurs d'autres agents satiétogènes comme le *glucagon-like peptide-1* (GLP-1) et le peptide YY (PYY) qui sont sécrétés par l'iléon en réponse à une charge en lipides. Comme pour le CCK1-R, ces récepteurs vagues voient leur nombre diminué lors d'une consommation chronique de lipides (Raybould 2007). Ce mécanisme limitant l'impact de ces hormones inhibitrices pourrait, en partie, expliquer pourquoi les lipides sont moins satiétogènes que les glucides ou les protéines. De plus, la CCK et le GLP-1 affectent les fonctions digestives, notamment en inhibant la vidange gastrique (Debas, Farooq, and Grossman 1975; Baggio and Drucker 2007). La CCK permet également la sécrétion de bile et d'enzymes pancréatiques dans la lumière intestinale (Moran and Kinzig 2004) tandis que le GLP-1 diminue les sécrétions acides de l'estomac (Baggio and Drucker 2007). De plus, il a été montré un effet anorexigène de l'oleoylethanolamine (OEA), une molécule informative de la famille des endocannabinoïdes, lors de la présence de lipides alimentaires dans la lumière intestinale (Serrano et al. 2011). L'administration orale et parentérale d'OEA conduit à une inhibition de la prise alimentaire de manière dose et temps-dépendantes. Seulement, l'OEA semble être un signal local puisque une ablation des afférences vagues au niveau intestinal abolit son effet régulateur sur la prise alimentaire. De plus, une administration centrale n'a aucun effet (Rodríguez de Fonseca et al. 2001).

Ainsi, l'arrivée de lipides dans la lumière intestinale provoque des signaux neuroendocrines responsables de l'inhibition de la prise alimentaire.

3.4.2 Les effets post-absorptifs

Parallèlement à ces régulations neuroendocrines post-ingestives, des signaux satiétogènes sont produits consécutivement à l'absorption des lipides alimentaires. C'est le cas notamment de l'apolipoprotéine AIV (ApoAIV) qui est sécrétée par les entérocytes lors de la synthèse post-prandiale des chylomicrons. Contrairement aux régulateurs post-ingestifs qui limitent la taille du repas (rassasiement), l'ApoAIV affecte l'intervalle entre deux repas consécutifs (satiété). De ce fait, l'injection systémique ou cérébroventriculaire d'ApoAIV diminue de façon dose-dépendante la prise alimentaire chez le rat (Tso and Liu 2004). Une fois encore, l'action satiétogène de l'Apo AIV décroît lors de régimes chroniquement riches en lipides. Le mécanisme à l'origine de cette désensibilisation n'est pas encore établi. Il a été proposé que la leptine, une hormone gastro-intestinale produite par le tissu adipeux, soit en partie responsable de ce phénomène. En effet, l'expression de l'Apo AIV en réponse à une charge lipidique est plus faible chez des rats traités par la leptine (Doi et al. 2001). Il est important de rappeler que la sécrétion de leptine est corrélée de manière positive à la masse grasse. Ainsi, la leptinémie est particulièrement élevée au cours de l'obésité et une inhibition leptine-dépendante de la sécrétion de l'Apo AIV pourrait en partie expliquer la surconsommation alimentaire souvent observée chez les sujets et les animaux obèses (Tso and Liu 2004). De plus, la leptine semble également jouer un rôle direct sur la prise alimentaire. En effet, la leptine, dont la concentration plasmatique est corrélée à la masse du tissu adipeux (Considine et al. 1996), et l'insuline, dont le taux circulant est également proportionnel à la masse grasse (Benoit et al. 2004), peuvent agir au niveau hypothalamique pour inhiber directement la prise alimentaire (Friedman and Halaas 1998; Benoit et al. 2004).

En conclusion, que ce soit de manière directe ou indirecte, les lipides sont à l'origine de la régulation de la prise alimentaire. Tous ces phénomènes sont observés après une détection tardive des lipides par l'organisme. Seulement, avant d'atteindre le système digestif où ils seront absorbés, les lipides alimentaires sont détectés de manière précoce, au niveau oro-sensoriel. Quels sont les mécanismes de détection existant dans la sphère oro-sensorielle ?

III. La détection oro-sensorielle des lipides alimentaires

Lors de la consommation d'aliments riches en lipides, la première étape est leur mise en bouche. Cette étape pourrait paraître anecdotique de prime abord mais elle est cruciale pour identifier les aliments en question. Différentes méthodes sont employées pour mesurer la détection oro-sensorielle des lipides chez la souris. Le **Tableau 3** regroupe les principales méthodes qui sont utilisées par la suite dans cette revue bibliographique pour étudier le comportement alimentaire chez les animaux de laboratoire.




			Avantages	Inconvénients
Licking test	Mesure de l'avidité pour une solution		Exclusion post-ingestif Mesure performante (électronique)	Restriction hydrique + mise à jeun Apprentissage Stress
		Court-terme : lickomètre, 1 biberon		
Test à double choix	Mesure de la préférence pour une solution par rapport à une autre		Exclusion post-ingestif Mesure performante (électronique)	Restriction hydrique + mise à jeun Apprentissage Stress
		Court-terme : lickomètre, 2 biberons		
			Facile et rapide à mettre en place Limitation du stress	Réponse globale (détectations précoce et tardive) Précision de la mesure moins sensible Nécessité apport hydrique pendant les tests (utilisation de la gomme de xanthane, texturant moyennement efficace)
		Long-terme : cage conventionnelle, 2 biberons		

Tableau 3 : Tests de comportement les plus couramment utilisés pour les mesures de détection oro-sensorielle des lipides chez la souris.

La première composante impliquée dans la reconnaissance des aliments en bouche est leur texture.

1.1. La texture

La texture est une composante importante des aliments et notamment des aliments riches en lipides du fait de l'onctuosité et de la viscosité de ces derniers. La texture est essentiellement perçue par les papilles filiformes, qui sont des papilles tactiles et l'information est relayée vers le cerveau par le nerf trijumeau (nerf crânien V), contribuant ainsi à la palatabilité des aliments lipidiques. Chez l'Homme, la texture influence énormément la perception du contenu en graisses de produits laitiers. En effet, l'ajout d'un agent texturant à une matrice pauvre en lipides favorise l'augmentation de la perception du contenu en lipides par les sujets (Mela 1988). Cependant, lorsque la texture des lipides est modifiée par chauffage, la perception du contenu en graisses ne l'est pas (Mela, Langley, and Martin 1994b). De plus, pour une viscosité constante, la perception du contenu en lipides est dépendante de la taille des particules contenues dans une émulsion (Mela, Langley, and Martin 1994a). Ces résultats suggèrent que la texture des aliments riches en lipides, bien que très importante, n'est pas le seul signal impliqué dans la détection des lipides alimentaires au niveau oral. Ces études ont été confirmées par des expériences chez le rongeur de laboratoire à qui on a présenté simultanément de l'huile de maïs (nutritive) et une huile minérale de texture identique, l'huile de maïs étant consommée préférentiellement (Ackroff, Vigorito, and Scalfani 1990). De même, des tests de double choix chez le rats ont montré une préférence pour une solution aqueuse texturée avec de la gomme de xanthane et additionnée d'un AGLC comparée à la solution aqueuse texturée seule (Tsuruta et al. 1999), renforçant l'idée que, outre la texture, la détection orale des lipides alimentaires fait intervenir d'autres paramètres.

1.2. L'olfaction

Le système olfactif permet de détecter des molécules odorantes volatiles dans notre environnement. Les signaux olfactifs ainsi émis transitent *via* le nerf olfactif (nerf crânien I) vers le cerveau où l'information sera intégrée. Il existe deux voies de détection des molécules odorantes alimentaires. Tout d'abord, les odeurs peuvent être perçues alors même que l'aliment n'est pas en bouche, on parle de la voie ortho-nasale. De plus, une fois l'aliment en bouche, la mastication favorise la libération d'autres molécules odorantes qui peuvent circuler dans la cavité bucco-nasale et rejoindre l'épithélium olfactif par un conduit situé à l'arrière du palais. Dans ce second cas, on parle de la voie rétro-nasale. Des

expériences chez le rongeur ont permis de mettre en évidence le fait que la composante olfactive n'était pas indispensable dans le phénomène de préférence des lipides alimentaires. En effet, une section bilatérale du nerf olfactif chez la souris n'altère que très peu la préférence spontanée pour un régime enrichi en huile de maïs comparé à un régime contrôle qui en est dépourvu (Kinney and Antill 1996). De plus, l'instillation nasale de sulfate de zinc chez la souris, qui permet de rendre les animaux anosmiques de manière transitoire, conduit à une perte de la préférence pour des solutions contenant de faibles (1 à 3%) concentrations d'huile de maïs tandis que la préférence est maintenue pour des concentrations plus importantes (Takeda et al. 2001). Ces données indiquent que l'olfaction joue un rôle dans la détection orale des lipides alimentaires mais qu'encore d'autres paramètres semblent impliqués.

Ainsi, comme résumé sur la **Figure 10**, la détection des lipides alimentaires est un phénomène complexe qui résulte de l'intégration de plusieurs composantes telles que la texture, l'olfaction et les effets post-oraux. Les signaux émis rejoignent, *via* des nerfs crâniens spécifiques, des zones précises du cerveau impliquées dans la régulation de la prise alimentaire.

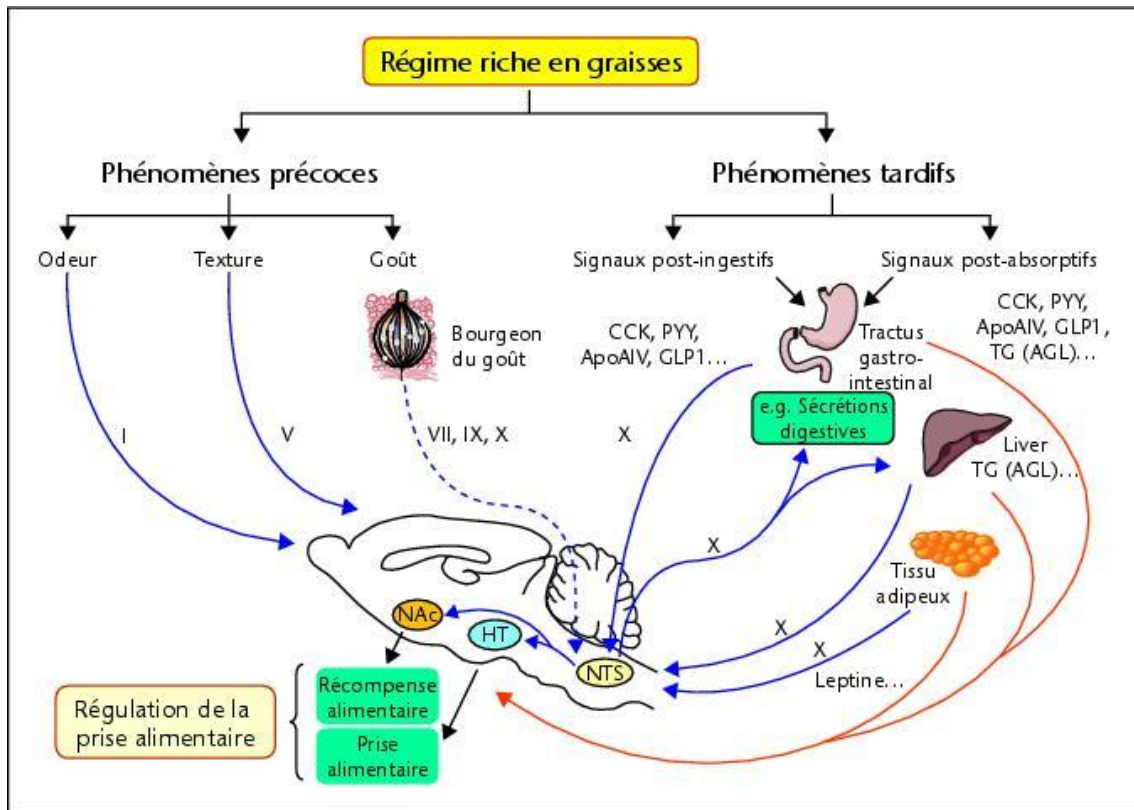


Figure 10 : La régulation de la prise alimentaire par les lipides.

I, V, VII, IX, X : nerfs crâniens ; CCK : Cholécystokinine ; PYY : Peptide YY ; ApoAIV : Apolipoprotéine AIV ; GLP-1 : Glucagon-Like Peptide 1 ; TG : Triglycérides ; AGL : Acides Gras Libres ; NTS : Noyau du Tractus Solitaire ; HT : Hypothalamus ; NAc : Noyau *Accumbens*. (Source : Gaillard et al., 2008, *OCL*)

Malgré cela, si l'on confronte un rat anosmique (afin d'éliminer les informations olfactives) à un choix entre deux solutions texturées (pour minimiser l'effet texture) contenant ou non des AGLC pendant un test d'une durée réduite (afin de négliger les effets post-oraux) on s'aperçoit qu'ils présentent toujours une préférence pour les lipides (Fukuwatari et al. 2003). Ainsi, la gustation semble jouer un rôle prépondérant dans la détection orale des lipides.

Ces éléments apportent la preuve d'une dimension gustative des lipides alimentaires. Où ces lipides sont-ils détectés ? La suite de l'exposé s'intéresse aux papilles gustatives, des structures primordiales dans la détection des saveurs.

IV. La détection des saveurs par les papilles gustatives

Les saveurs sont détectées par des papilles gustatives que l'on retrouve dans la cavité orale à la fois sur la langue mais également sur le palais et la partie supérieure de l'œsophage. Au niveau lingual, on peut distinguer 3 types de papilles gustatives, il s'agit des papilles fongiformes, foliées et caliciformes. Les papilles fongiformes sont nombreuses mais ne contiennent qu'un petit nombre de bourgeons du goût. Elles sont situées dans les deux tiers antérieurs de la langue. Les papilles foliées sont situées dans la partie latéro-postérieure de la langue et enfin les papilles caliciformes (CV), qui consistent en une dépression circulaire (ou sillon) contenant des centaines de bourgeons du goût sont retrouvées dans la partie centro-postérieure de la langue (**Figure 11**). Ces dernières, au nombre de dix chez l'Homme forment le « V » lingual. On n'en retrouve en revanche qu'une seule en position centrale chez le rongeur (rat, souris) et deux chez le porc.

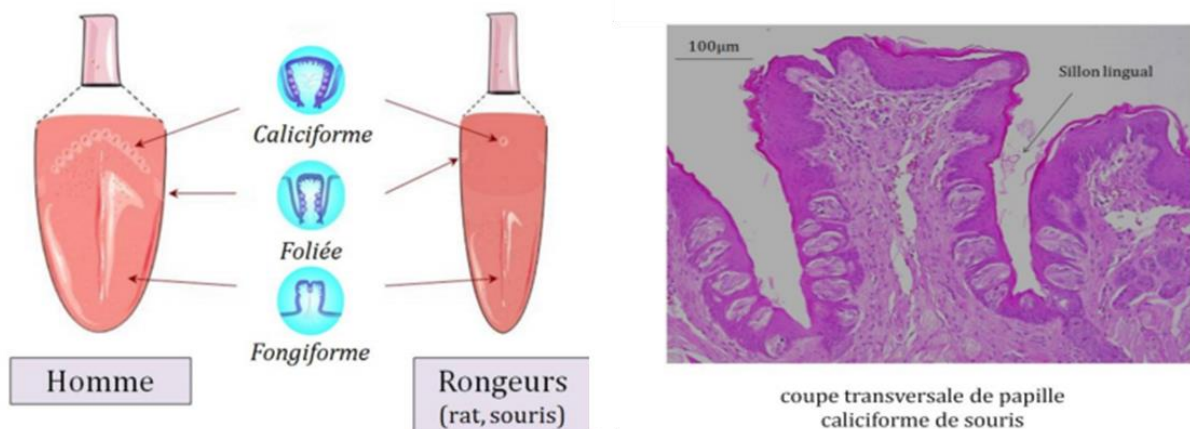


Figure 11 : Les papilles gustatives chez l'Homme et la souris.

Localisation des différentes papilles gustatives dans l'épithélium lingual chez l'Homme et la souris (en haut). Structure histologique de la papille caliciforme de souris par coloration à l'hémalum/érythrosine (en bas). (Source : Martin et al., données non publiées)

1. Les bourgeons du goût

Les bourgeons du goût sont les unités cellulaires spécifiques de la détection des saveurs. Elles ont une forme de bulbe d'oignon d'environ 50µm de diamètre. Le pôle apical

des bourgeons du goût est constitué d'un pore gustatif qui débouche dans le sillon de la papille (**Figure 12**), en contact avec les molécules issues de l'alimentation. C'est le lieu de communication avec le milieu extérieur où l'on retrouve les microvillosités des cellules sensorielles. Les bourgeons du goût sont constitués de 50 à 150 cellules fusiformes classées en 4 catégories (type I à type IV).

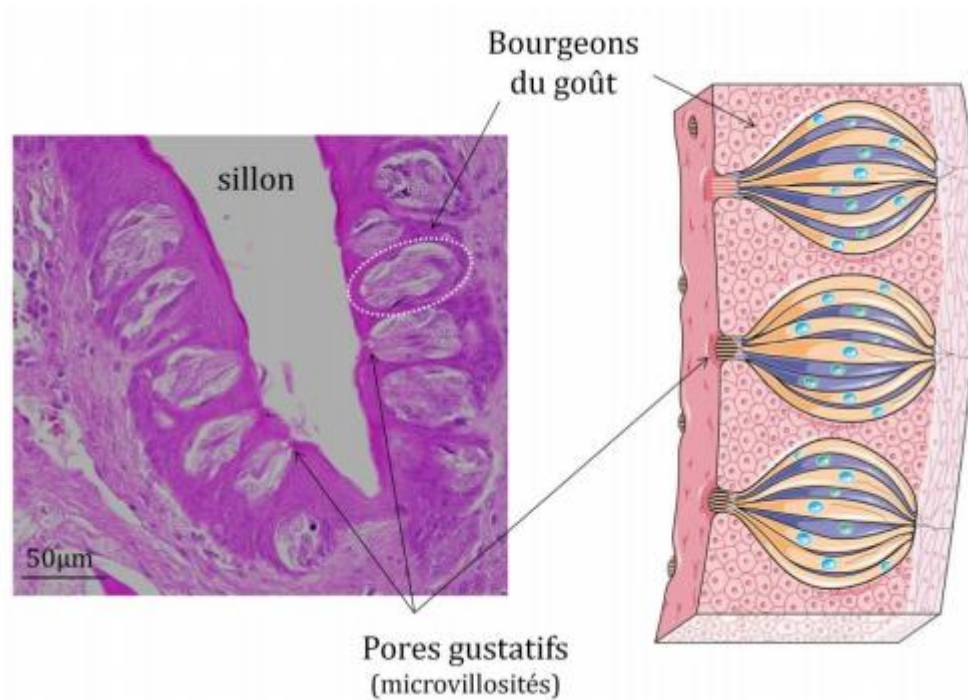


Figure 12 : Les bourgeons du goût dans la papille caliciforme de souris.

Structure histologique de la papille caliciforme de souris par coloration à l'hémalun/érythrosine. (Source : Martin et al., données non publiées)

2. Les différents types cellulaires des bourgeons du goût

Il existe deux grands types de cellules dans les bourgeons du goût : les cellules gustatives et les cellules souches.

2.1. Les cellules sensorielles ou gustatives

Les cellules gustatives sont très différentes d'un point de vue morphologique et leurs caractéristiques ultrastructurales permettent de les regrouper en trois types : type I, II et III (**Figure 13**).

Les cellules de type I, les plus nombreuses dans les bourgeons du goût, sont localisées à la périphérie de ces derniers. Elles possèdent de longues microvillosités à leur pôle apical. On les identifie comme étant des cellules sombres car leur cytoplasme contient des granules denses caractéristiques. Elles présentent également un noyau dense et irrégulier. Les cellules de type I présentent les caractéristiques de membrane de cellules gliales (A Bigiani 2001) et pourraient servir de cellules de maintien (Lawton et al. 2000). De par leurs propriétés, les cellules de type I sont ainsi qualifiées de “*glial-like cells*”. De nombreux marqueurs moléculaires justifient cette fonction (**Figure 14**). En effet, on retrouve au sein de cette population cellulaire des marqueurs tels que le *glutamate-aspartate transporter* (GLAST) (Lawton et al. 2000) suggérant qu’elles pourraient être impliquées dans le transport du glutamate dans les bourgeons du goût mais également l’ecto-ATPase de type D2 (NTPDase2) (Bartel et al. 2006) qui hydrolyse l’ATP extracellulaire. L’ATP et le glutamate (Finger et al. 2005; Vandenbeuch et al. 2010) étant considérés comme des neurotransmetteurs candidats dans les bourgeons du goût, on peut penser que les cellules de type I jouent un rôle d’éboueur au sein de la fente synaptique, favorisant la clairance des neurotransmetteurs. De plus, la présence d’un canal potassique, le *renal outer medullary K* (ROMK) (Dvoryanchikov et al. 2009) exprimé sur la membrane, suggère que ces cellules pourraient servir à éliminer le potassium qui s’accumule dans l’espace intercellulaire des bourgeons du goût et ainsi diminuer l’excitabilité des cellules de types II et III. Des résultats récents suggèrent que les cellules de type I pourraient être impliquées dans le transduction de la saveur salée (Vandenbeuch, Clapp, and Kinnamon 2008).

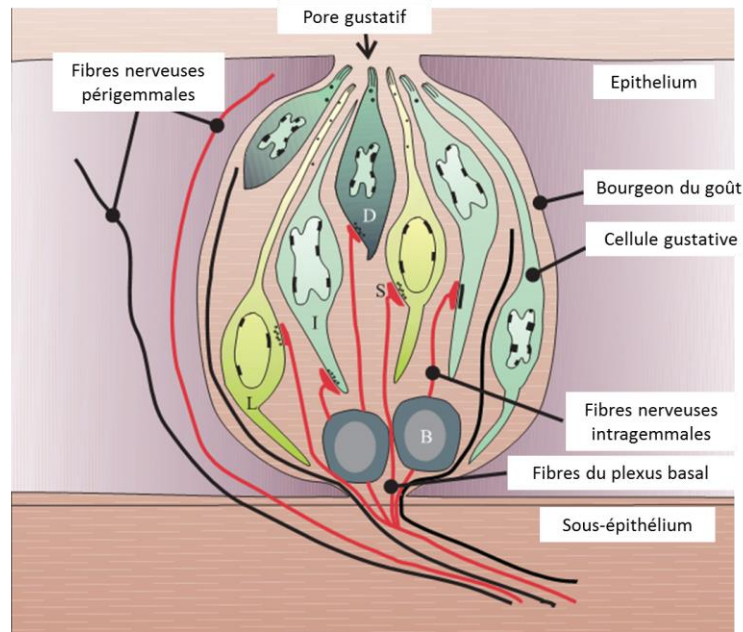


Figure 13 : Représentation schématique de l'organisation d'un bourgeon du goût.

B : cellules basales ; D : cellules sombres (type I) ; L : cellules claires (type II) ; I : cellules intermédiaires (type III) ; S : synapses. (Adapté de (G. M. Nelson 1998)

Les cellules de type II, dites claires car elles ne présentent pas de granules denses cytoplasmiques, possèdent un large noyau arrondi et clair. Elles sont majoritairement localisées au centre des bourgeons du goût et possèdent de courtes microvillosités. Les cellules de type II sont les principales cellules impliquées dans la transduction des saveurs, notamment pour le sucré, l'amer et l'*umami* (**Figure 14**). En effet, elles expriment les éléments impliqués dans leur transduction tels que les familles de récepteur *Taste receptor 1* (T1R) (Montmayeur et al. 2001; Kim et al. 2003) et *Taste receptor 2* (T2R) (Adler et al. 2000; Matsunami, Montmayeur, and Buck 2000) mais aussi les protéines de transduction du message intracellulaire que je développerai plus tard telles que la protéine G α -gustducine (Boughter et al. 1997; Yang, Tabata, et al. 2000), la phospholipase C $\beta 2$ (PLC $\beta 2$), le récepteur à l'inositol-triphosphate de type 3 (IP3R3) (T R Clapp et al. 2001) et le canal *melastatin-related transient receptor potential cation channel type 5* (TRPM5) (Pérez et al. 2002). Ces cellules établissent des connexions non conventionnelles avec les fibres nerveuses. En effet, on peut observer à l'affleurement de la membrane de ces cellules, des citernes issues du réticulum endoplasmique lisse qui pourraient être à l'origine de la transmission du signal aux afférences nerveuses gustatives (Tod R Clapp et al. 2004). Le fait que les cellules de types II expriment des canaux sodiques et potassiques voltage-dépendants, ainsi que les canaux

Pannexin-1 (Panx1) qui jouent un rôle dans la sécrétion d'ATP (Y.-J. Huang et al. 2007) et qui sont impliqués dans la formation de potentiels d'actions, renforce la possibilité d'une signalisation directe émise par ces cellules gustatives de type II.

Enfin, les cellules de type III sont pourvues d'une seule microvillosité et possèdent à leur pôle basal des vésicules sombres et claires comparables à des vésicules synaptiques. Ces cellules possèdent de nombreuses caractéristiques d'éléments présynaptiques (**Figure 14**). En effet, elles expriment des protéines associées aux synapses et forment des jonctions synaptiques avec les nerfs (Tod R Clapp et al. 2004). On peut également trouver dans ces cellules une protéine impliquée dans les processus vésiculaires présynaptiques, la *synaptic membrane protein 25* (SNAP25) (Yang, Crowley, et al. 2000), mais aussi la *neural cell adhesion molecule* (NCAM) (G. M. Nelson and Finger 1993), marqueur d'adhérence cellulaire neuronale. Ces cellules possèdent également la machinerie pour synthétiser des neurotransmetteurs comme la sérotonine ou l'acide γ -aminobutyrique (GABA), associés à la présence de canaux calciques voltage-dépendants impliqués dans la sécrétion de neurotransmetteurs par exocytose (DeFazio et al. 2006; Dvoryanchikov, Tomchik, and Chaudhari 2007). On retrouve également dans ces cellules, comme dans celles de type II des canaux sodiques et potassiques voltage-dépendant à l'origine de potentiels d'actions (Gao et al. 2009; Medler, Margolskee, and Kinnamon 2003). Ces cellules de type III présentent la caractéristique de pouvoir intégrer les signaux envoyés par les cellules de type II et de transmettre l'information aux nerfs gustatifs, répondant donc aux saveurs sucré, amer et *umami* de manière indirecte. De plus, les cellules de type III répondent directement à la saveur acide puisqu'elles présentent à leur pôle apical le ionophore *polycystic-kidney-disease-like ion channel* (PKD2L1/PKD2L3) impliqué dans la détection de l'acide (Y. A. Huang et al. 2008).




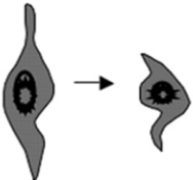
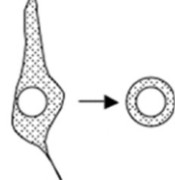
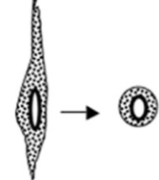
	Type I Cellule sombre	Type II Cellule claire	Type III
Structure Apicale	Grandes microvillosités 	Petites microvillosités 	Grande villosité unique 
Morphologie Cellulaire Coupe longitudinale ou transversale			
Marqueurs	GLAST NTPDase2 ROMK	T1R, T2R α -gustducine PLC β 2, IP3R3 TRPM5 Panx1	SNAP25, NCAM PKD2L1/PKD2L3 GABA Sérotonine
Fonctions	Clairance de neurotransmetteurs Homéostasie des ions K ⁺ Transduction du salé ?	Transduction du sucré, amer et <i>umami</i> Sécrétion d'ATP	Synapses avec les nerfs gustatifs Sécrétion de neurotransmetteurs Transduction de l'acide

Figure 14 : Caractéristiques morphologiques et fonctionnelles principales des cellules sensorielles des bourgeons du goût.

GLAST : *glutamate-aspartate transporter* ; NTPDase2 : ecto-ATPase de type D2 ;
ROMK : *renal outer medullary K* ; T1R/T2R : *Taste receptor 1/2* ; PLC β 2 :
phospholipase C β 2 ; IP3R3 : récepteur à l'inositol-triphosphate de type 3 ; TRPM5 :
melastatin-related transient receptor potential cation channel type 5 ; Panx1 :
Pannexin-1 ; SNAP25 : *synaptic membrane protein 25* ; NCAM : *neural cell adhesion molecule* ; PKD2L1/PKD2L3 : *polycystic-kidney-disease-like ion channel* ; GABA :
acide γ -aminobutyrique. (Adapté de (Finger 2005))

Il a été montré récemment que les cellules gustatives sont capables de sécréter de nombreuses hormones peptidiques retrouvées habituellement au niveau gastro-intestinal. Ainsi, on retrouve la CCK, le neuropeptide Y (NPY) (Herness and Zhao 2009), le glucagon (Shin et al. 2008) et le *vasoactive intestinal peptide* (VIP) (Shen et al. 2005) au niveau des cellules de type II. Le GLP-1 est retrouvé au niveau des cellules de type II et III (Shin et al. 2008) et la ghréline est retrouvée de façon ubiquitaire (Shin et al. 2010). De manière intéressante, les récepteurs à ces hormones sont également retrouvés dans les cellules gustatives des bourgeons du goût ou au niveau des fibres nerveuses gustatives afférentes. Ces données suggèrent fortement une action autocrine ou paracrine de ces hormones. Des expériences chez des animaux dont les gènes codant pour les hormones ou leurs récepteurs ont été invalidés ont permis de montrer que cette sécrétion d'hormones gastro-intestinales

au niveau lingual permet une modulation des différentes modalités gustatives. De fait, le GLP-1 (Shin et al. 2008) et le glucagon (Elson et al. 2010) semblent diminuer la sensibilité à la saveur sucrée et la ghréline (Shin et al. 2010) aux saveurs sucrée et acide. Pour le VIP, les résultats d'une étude démontrent un rôle dans l'augmentation de la sensibilité aux saveurs sucrée et amère et la diminution de la sensibilité à l'acide (B. Martin et al. 2010). Pour CCK et NPY, aucune action de modulation du goût n'a été décrite à ce jour mais des modifications de l'excitabilité des cellules ont été rapportées, suggérant tout de même une implication de CCK et NPY dans la détection des saveurs (Herness and Zhao 2009). Les cellules gustatives sont également sensibles aux hormones circulantes. Ainsi, le récepteur à la leptine est exprimé par certaines de ces cellules (Shigemura et al. 2003). Des expériences chez les souris ob/ob et db/db ont mis en évidence une diminution de la perception de la saveur sucrée médiée par la leptine (Shigemura et al. 2004). Ces résultats suggèrent que, en plus des régulations locales, des paramètres physiologiques tels que l'adiposité seraient capables de moduler la sensibilité gustative au niveau des bourgeons du goût.

2.2. Les cellules souches ou basales

Les cellules basales (ou cellules de type IV) sont des cellules non-polarisées situées au niveau basolatéral des bourgeons du goût. Elles présentent une forme plutôt arrondie ou ovoïde et possèdent un noyau volumineux (**Figure 13**). Ces cellules semblent être indifférenciées et sont les seules cellules des bourgeons du goût à exprimer la protéine *Sonic hedgehog*, impliquée dans la croissance et la différenciation cellulaire (H Miura et al. 2001), le facteur de transcription *mouse achaete-scute homolog* (MASH1) (Hirohito Miura, Kusakabe, and Harada 2006), responsable de la différenciation neuronale mais aussi *prospero-related homeobox gene 1* (Prox1), jouant un rôle dans le développement du pancréas (Nakayama et al. 2008). Tous ces éléments amènent à la conclusion que ces cellules seraient à l'origine de la différenciation et du renouvellement des autres types cellulaires des bourgeons du goût (Hirohito Miura, Kusakabe, and Harada 2006). La durée de renouvellement des cellules des bourgeons du goût est estimée à 7-10 jours (Beidler and Smallman 1965).

2.3. Les communications intercellulaires au sein des bourgeons du goût

La stimulation des cellules gustatives par des molécules sapides aboutit à une sécrétion de neurotransmetteurs tels que l'ATP ou la sérotonine. Deux schémas de transduction du signal suite à l'activation des cellules gustatives par un stimulus gustatifs sont proposés à l'heure actuelle (**Figure 15**). D'une part, les cellules de type II seraient capables d'initier un message nerveux par l'action directe de l'ATP sécrété (Finger et al. 2005) sur un récepteur de type P2X présent au niveau des fibres nerveuses efférentes (Bo et al. 1999). En effet, l'inactivation de l'hétérodimère P2X2/P2X3 chez la souris conduit à des réponses électrophysiologiques et comportementales diminuées pour certains saveurs comme le sucré ou encore l'amer, dont les récepteurs se situent sur ce type cellulaire spécifiquement (Finger et al. 2005). Par voie autocrine, l'ATP peut également favoriser une augmentation de sécrétion d'ATP par l'intermédiaire d'un récepteur P2Y, amplifiant la transduction du signal (Chaudhari and Roper 2010). D'autre part, les cellules de type II peuvent activer les cellules de type III de manière paracrine par l'intermédiaire de l'ATP et des récepteurs de type P2Y présents sur les cellules de type III. Cette activation conduit à la sécrétion de neurotransmetteurs tels que la sérotonine et/ou de la noradrénaline. Ces dernières peuvent exercer un rétrocontrôle négatif sur les cellules de type II (Kaya et al. 2004), limitant ainsi le signal gustatif mais surtout activer les fibres nerveuses efférentes dont le signal sera transmis au cerveau.

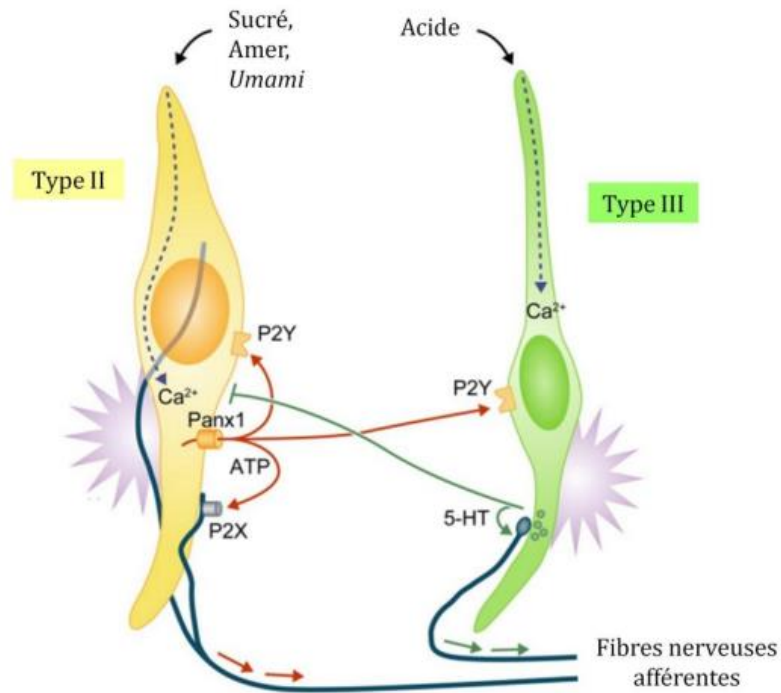


Figure 15 : Modèle de transmission du signal gustatif dans les bourgeons du goût chez la souris.

5-HT : sérotonine ; ATP : adénosine triphosphate ; Panx1 : *pannexin 1* ; P2X : récepteur purinergique de type 2X ; P2Y : récepteur purinergique de type 2Y. (Source : thèse de C. Martin 2011, adapté de (Chaudhari and Roper 2010))

Ainsi, les cellules gustatives possèdent des caractéristiques fonctionnelles leur permettant de répondre aux 5 saveurs de base et d'envoyer un message nerveux. Cette réponse semble pouvoir être modulée par des hormones sécrétées au niveau local ou par des facteurs issus de la périphérie. De plus, il a été montré que, pour répondre aux molécules sapides, les cellules sont dotées de protéines membranaires appelées « récepteurs gustatifs » qui permettent de détecter les saveurs. Afin de réussir à mettre en évidence plus facilement des récepteurs candidats aux AGLC, les différents types de récepteurs aux saveurs existants sont détaillés dans le chapitre suivant.

3. Les différents types de récepteurs

Les mécanismes de transduction des différents stimuli gustatifs perçus permettent de mettre en évidence trois types de protéines membranaires spécifiques impliquées dans la détection des molécules sapides (**Figure 16**). Les mécanismes d'actions peuvent être directs

via des canaux ioniques qui laissent les ions pénétrer directement dans la cellule. On retrouve également des mécanismes d'actions indirects *via* des récepteurs métabotropiques, qui sont essentiellement des protéines de la famille des GPCR (*G-protein-coupled receptor*) liant les molécules sapides et qui sont couplés du côté intracellulaire avec des protéines de signalisation. Enfin, ils peuvent également intervenir *via* des récepteurs ionotropiques qui lient les molécules sapides et permettent l'ouverture d'un canal favorisant l'entrée des ions dans le milieu intracellulaire. Les principaux mécanismes de détection des saveurs primaires ont été mis à jour mais il ne faut pas exclure d'en découvrir de nouveaux dans le futur.

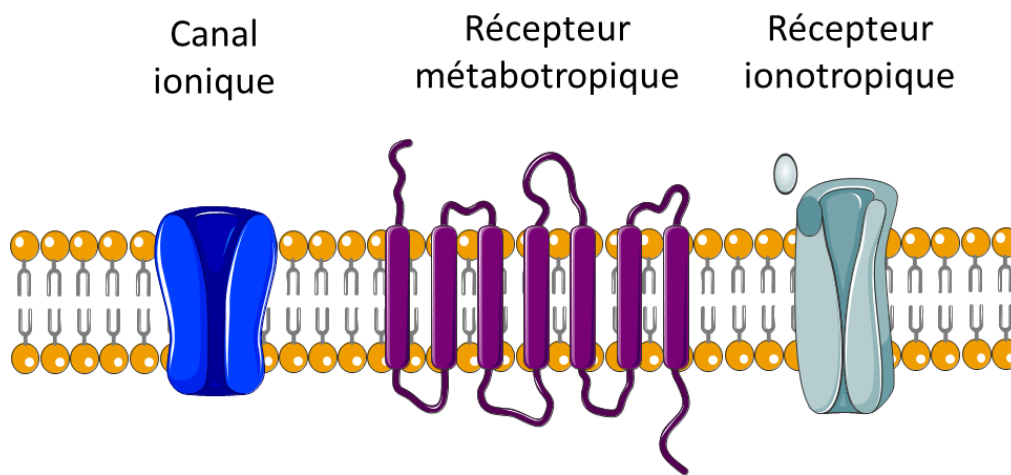


Figure 16 : Les différents types de récepteurs aux molécules sapides.

Les saveurs sucrée et *umami* sont détectées par des récepteurs T1R à sept domaines transmembranaires appartenant à la famille des GPCR. Ainsi, l'hétérodimère T1R2/T1R3 est responsable de la détection de la saveur sucrée, aussi bien chez le rongeur (Zhao et al. 2003) que chez l'Homme (Jiang et al. 2005) et l'hétérodimère T1R1/T1R3 est responsable de celle de l'*umami* chez la souris et chez l'Homme (G. Nelson et al. 2002). Cependant, il existe une autre voie de détection de ces saveurs. En effet, un récepteur ionotrope, forme tronquée d'un récepteur métabotrope au glutamate (mGLUR4), peut lier certains édulcorants de synthèse ainsi que le L-glutamate et ainsi permettre l'entrée dans la cellule de Na^+ et Ca^{2+} qui entraînent une dépolarisation cellulaire (Chaudhari, Landin, and Roper 2000).

La détection de l'amer est également médiée par une famille de récepteurs à sept domaines transmembranaires. Cette famille des T2R contient de nombreux représentants

codés par une trentaine de gènes (J Chandrashekar et al. 2000). En ce qui concerne l'acide (H^+) et le salé (Na^+), il est couramment admis que leur détection passe par des canaux ioniques (Albertino Bigiani, Ghiaroni, and Fieni 2003; DeSimone and Lyall 2006). Plusieurs candidats ont été proposés et les dernières études suggèrent que PKD1L3 et PKD2L3 participent à la détection de l'acide (A. L. Huang et al. 2006; Ishimaru et al. 2006) et les canaux ENaC à la détection du salé (Boughter and Gilbertson 1999; Jayaram Chandrashekar et al. 2010).

Il est important de noter qu'il existe un seul type de récepteur par cellule gustative (Jayaram Chandrashekar et al. 2006) mais que, quel que soit le récepteur considéré, il existe une cascade d'évènements intracellulaires à l'origine d'une dépolarisation cellulaire, aboutissant à la sécrétion de neurotransmetteurs (Timothy A Gilbertson and Boughter 2003).

Ces données indiquent que la nature des récepteurs aux saveurs est variée. Il sera donc justifié de s'intéresser à de nombreuses familles de récepteurs, et notamment les récepteurs à sept domaines transmembranaires, en tant que lipido-récepteurs candidats. Cependant, avant de s'intéresser aux récepteurs putatifs impliqués dans la détection orale des lipides alimentaires, il apparaît intéressant de s'attacher à la définition d'une saveur primaire.

V. Les lipides alimentaires sont-ils à l'origine d'une sixième saveur ?

Il existe à l'heure actuelle 5 saveurs primaires reconnues mais la définition d'une saveur primaire est toujours source de débat au sein de la communauté scientifique. C'est pourquoi Richard D. Mattes, de l'Université de Purdue aux Etats-Unis, a proposé de définir comme saveur primaire toute saveur répondant à 6 critères (Richard D Mattes 2011a), à savoir :

1/ Avoir un stimulus/une classe de stimuli unique à l'origine d'une détection orale de la saveur considérée. A titre d'exemple, le saccharose ou bien encore l'aspartame (des

molécules naturelles et de synthèse) constitue une classe de molécules d'intérêt dites « sapides » intervenant dans la détection orale de la saveur sucrée.

2/ Posséder un/des récepteurs spécifiques capables de lier les molécules sapides au niveau membranaire et pouvant être à l'origine d'une signalisation cellulaire unique.

3/ Avoir un système de transduction du signal intracellulaire unique consécutif à l'activation d'un récepteur par une molécule sapide qui est ensuite relayé par voie nerveuse vers les zones gustatives au niveau central.

4/ Provoquer au moins une réponse physiologique.

5/ Apporter un avantage évolutif.

6/ Etre ressentie et décrite comme une sensation unique.

A l'heure actuelle, l'étendue des connaissances chez l'Homme permet de répondre plus ou moins à chacun de ces 6 points pour les cinq modalités gustatives décrites actuellement. Malgré tout, les preuves apportées pour chacune d'elle ne sont pas absolues et donc la définition proposée reste perfectible. Ainsi, remplir l'ensemble de ces critères pour définir une saveur primaire n'est ni nécessaire, ni suffisant selon R. Mattes. Effectivement, dans le **Tableau 4**, qui résume les connaissances actuelles, on peut observer qu'aucune des saveurs primaires admises ne remplit entièrement tous les critères de manière irrévocable et que quelques points restent incertains.

Critères	Modalités gustatives				
	Sucré	Salé	Acide	Amer	<i>Umami</i>
Classe unique de stimuli	?	✓	✓	?	✓
Mécanisme de transduction unique	✓	?	?	✓	✓
Signal relayé par voie nerveuse	✓	✓	✓	✓	✓
Provoque une réponse physiologique	?	✓	✓	?	?
Apporte un avantage évolutif	✓	✓	✓	✓	✓
Est perçu comme une sensation unique	✓	✓	✓	✓	?

Tableau 4 : La définition des différentes modalités gustatives.

(Adapté de : (Richard D Mattes 2011a)

Au regard de nos propres données, nous proposons de d'ajouter une septième condition à savoir :

7/ Avoir un système de détection réglable.

En s'appuyant sur les travaux réalisés au Laboratoire ces dernières années portant sur la détection orale de lipides alimentaires chez le rongeur et sur la littérature croissante dans ce domaine, aussi bien chez le rongeur que chez l'Homme, nous allons dans la suite de cette revue bibliographique étudier si les lipides, en tant que modalité gustative, répondent aux 7 conditions évoquées, aussi bien chez le rongeur que chez l'Homme.

1. Condition 1 : un stimulus unique. Quelle est la nature des lipides détectés : TG ou AGLC ?

Bien que minoritaire dans l'alimentation, il apparaît que ce sont les AGLC qui seraient responsables de l'attirance spontanée des rongeurs pour les lipides. En effet, quand des rats ont un libre accès à deux sources de lipides, ils consomment majoritairement celle enrichie en AGLC plutôt que celle contenant des AGMC ou bien encore des TG (Tsuruta et al. 1999; Fukuwatari et al. 2003). De plus, cette préférence semble être extrêmement sélective puisque les dérivés méthylés des AGLC ne sont pas reconnus (Tsuruta et al. 1999). Des études encore plus fines d'aversion conditionnée aux AGLC ont été réalisées chez le rat et la souris. Il s'agit pour cela d'associer la consommation des AGLC avec un malaise gastrique provoqué par une injection de chlorure de lithium. Il s'avère très facile de rendre un rat (McCormack, Clyburn, and Pittman 2006) ou une souris (Gaillard et al. 2008) aversif vis-à-vis d'un AGLC donné et ceci avec un seuil de rejet très faible, c'est-à-dire avec des concentrations en AGLC de l'ordre du nanomolaire (McCormack, Clyburn, and Pittman 2006).

Ainsi les AGLC sont impliqués préférentiellement dans la détection orale des lipides alimentaires par rapport aux AGMC et aux TG.

La lipase linguale semble jouer un rôle central dans ce système. Effectivement, on la trouve en forte concentration dans la salive de souris, permettant une hydrolyse efficace des TG et aboutissant à une libération conséquente d'AGLC. La lipase linguale est produite et sécrétée dans les papilles caliciformes et foliées chez le rongeur par les glandes de Von

Ebner. Le canal sécréteur de ces glandes débouche au fond du sillon gustatif, favorisant la création d'un micro-environnement riche en AGLC à proximité des cellules gustatives (**Figure 17**). Une inhibition pharmacologique de la lipase linguale chez le rongeur est responsable d'une diminution drastique de la préférence pour les TG (Kawai and Fushiki 2003). Ceci explique pourquoi l'huile végétale (hydrolysable) est préférée à l'huile de paraffine (non-hydrolysable) lors d'un test de double choix (Yoneda et al. 2007).

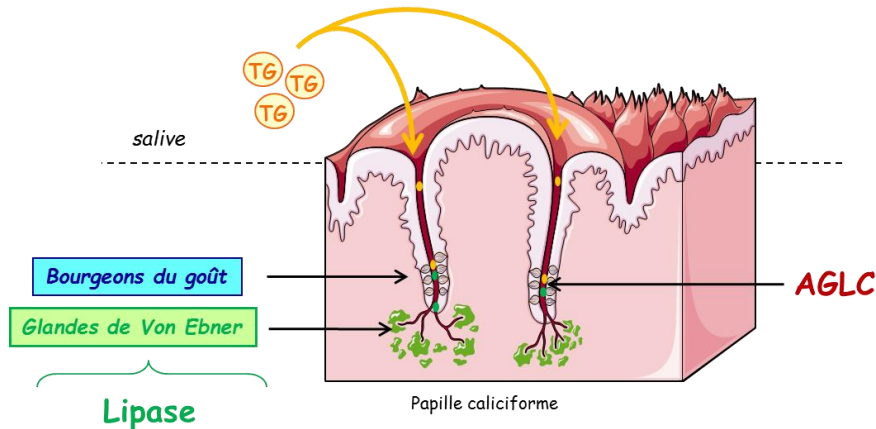


Figure 17 : Représentation schématique de la création d'un microenvironnement favorable à la détection des AGLC dans la papille caliciforme.

TG : triglycérides ; AGLC : acides gras à longue chaîne. (Source : P. Besnard)

La présence d'une lipase linguale chez l'Homme était jusqu'il y a très peu de temps un sujet de débat entre les scientifiques qui, d'un côté ont mesuré une activité lipolytique dans les glandes de Von Ebner des papilles caliciformes humaines (Hamosh and Burns 1977), ou de l'autre ont trouvé de très faibles concentrations voire une absence de lipase linguale humaine (Spielman et al. 1993). Cependant des études récentes tendent à montrer l'existence d'une lipase linguale active chez l'Homme. Tout d'abord, une étude sur la composition de la salive a montré que l'activité lipasique salivaire était responsable d'une modification de la perception et de la préférence pour les lipides chez l'Homme (Neyraud et al. 2012). De plus, des travaux réalisés sur une cohorte américaine indiquent que l'inhibition spécifique de la lipase linguale par l'Orlistat conduit à une augmentation du seuil de détection d'un TG précis (la trioléine) sans modifier celui de l'acide oléique. Ces travaux suggèrent très fortement la présence d'une lipase linguale active chez l'Homme, impliquée dans la détection des lipides au niveau oral (Pepino et al. 2012). Les conclusions de ces expériences permettent également d'affirmer que ce sont les AGLC, et non pas les TG, qui

sont détectés au niveau oral chez l'Homme (Pepino et al. 2012), conformément à ce qu'il a été montré précédemment chez la souris. De plus, des études réalisées chez l'Homme, de la même manière que celles menées chez la souris, en s'affranchissant des composantes texturales, olfactives et post-orales, ont mises en évidence que les AG, qu'ils soient à courtes, moyennes ou longues chaînes, saturés ou insaturés, sont détectés (Chalé-Rush, Burgess, and Mattes 2007; Richard D Mattes 2009a). Certes, les seuils de sensibilité varient d'un AG à l'autre, mais il semble que ce soit tous ces AG qui peuvent être détectés de manière très sensible chez l'Homme. Il est notable que même sans une activité lipasique efficace, la quantité minimale d'AGLC présente dans l'alimentation pourrait être suffisante pour être détectée par les cellules gustatives humaines (Jessica E Stewart, Feinle-Bisset, and Keast 2011). En effet, il a été montré que des concentrations de 1 à 20 μM d'AGLC suffisent à les activer (T A Gilbertson, Yu, and Shah 2010).

En conclusion, aussi bien chez la souris que chez l'Homme, les travaux réalisés jusqu'à présent montrent que la perception oro-sensorielle des lipides alimentaires est dépendante des AGLC. Ainsi, les AGLC peuvent être considérés comme des molécules sapides. Cependant comment sont-ils détectés ? Existe-t-il des protéines membranaires spécifiques de la détection des AGLC au niveau des cellules gustatives ?

2. Condition 2 : des récepteurs spécifiques. Quels sont les lipido-récepteurs candidats ?

Comme exposé précédemment, les AGLC sont des molécules extrêmement importantes au sein de l'organisme, notamment au niveau du métabolisme énergétique, et de nombreux lipido-récepteurs ont déjà été mis en évidence. Au niveau lingual, les connaissances sur les récepteurs aux lipides sont plus limitées. Les principaux récepteurs aux AGLC connus de nos jours au niveau des cellules gustatives sont les canaux DRK (*Delayed-rectifying potassium channels*), mais également GPR40 et GPR120, deux récepteurs de la famille des GPCR, et finalement CD36.

2.1. Les DRK

Les DRK sont des récepteurs ionotropiques décrits initialement au niveau cardiaque et qui sont retrouvés également au niveau des cellules gustatives (T A Gilbertson et al. 1997).

Ces canaux sont spécifiques des ions potassium et permettent la repolarisation de la cellule par efflux d'ions K^+ . Des études électrophysiologiques par *patch clamp* (technique qui permet de mesurer des variations de courant électrique extrêmement faibles générées par les flux ioniques existant de part et d'autre de la membrane cellulaire) ont permis de montrer chez le rat que les AGPI et les AGMI sont détectés au niveau des papilles gustatives (T A Gilbertson et al. 1997) et peuvent inhiber l'action des DRK. Ces effets ne sont pas retrouvés avec les dérivés ou les isomères *trans* de ces AG. Cette inhibition des canaux DRK a pour conséquence une dépolarisation transitoire de certaines cellules gustatives en raison de l'accumulation de charges positives (due à l'inhibition de l'efflux des ions K^+ de la cellule) dans le milieu intracellulaire (T A Gilbertson et al. 1997) (**Figure 18**). Ces données *ex-vivo* laissent à penser que les AG pourraient modifier le fonctionnement cellulaire dans les papilles de rat par l'intermédiaire d'un canal DRK.

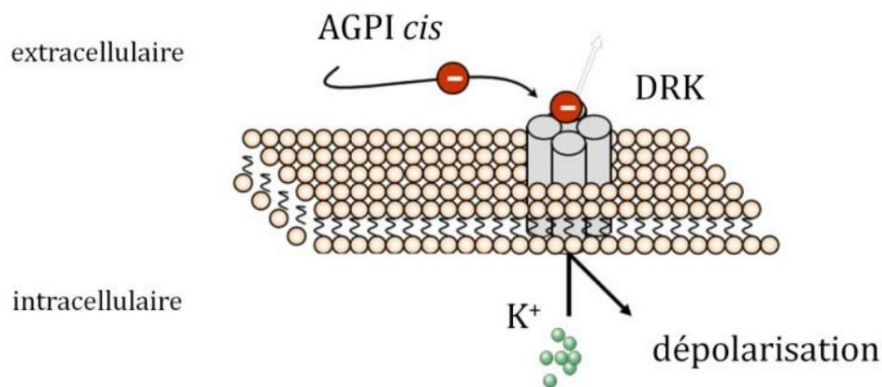


Figure 18 : Modélisation du mode d'action de Kv1.5.

AGPI : acide gras poly-insaturé ; DRK : *Delayed-rectifying potassium channels*. (Adapté de TA Gilbertson)

Parmi les différents membres de cette famille, le canal Kv1.5, dont l'expression est forte dans les cellules gustatives des papilles fongiformes, a été proposé comme la structure impliquée pour la détection des AGLC au niveau lingual (L. Liu et al. 2005). Seulement, l'inhibition des canaux DRK par les AG en condition basale ne permet pas une dépolarisation cellulaire. En effet, il faudrait pour cela qu'il y ait, à l'état basal, un nombre suffisant de canaux ouverts afin de permettre, lorsqu'ils seront dépolarisés par les AG, une dépolarisation cellulaire. Or, il a été démontré qu'à l'état basal, seulement 5% des canaux DRK sont ouverts (L. Liu et al. 2005). Cette faible quantité de canaux DRK « disponible » n'est pas suffisante pour envisager une dépolarisation de la membrane par les AG. De plus, aucune expérience de préférence pour les AGLC n'a été menée chez des animaux invalidés

pour les gènes codant pour les canaux DRK. Ainsi, il n'existe pas de preuves directes de l'implication des canaux DRK dans la préférence spontanée des lipides alimentaires chez la souris. L'existence d'autres récepteurs aux lipides semble donc nécessaire pour détecter les AGLC alimentaires au niveau lingual. Dans ce nouveau schéma, le canal Kv1.5 permettrait de potentialiser, en aval, le message produit par un « récepteur primaire » (T A Gilbertson, Yu, and Shah 2010).

2.2. Les GPCR

Cette famille très diversifiée de récepteurs présente de nombreux membres capables de lier des AGLC (Hirasawa et al. 2008; Wellendorph, Johansen, and Bräuner-Osborne 2010). Cependant, certains récepteurs tels que le GPR41 ou le GPR43 reconnaissent spécifiquement des AGCC et des AGMC. Ces récepteurs sont donc très peu concernés par la lipido-réception des AG alimentaires qui sont principalement des AGLC. De ce fait, deux autres membres présentent beaucoup plus d'intérêt, il s'agit du GPR40 et du GPR120.

GPR40 est principalement trouvé au niveau pancréatique où il joue un rôle dans la sécrétion d'insuline suite à l'ajout d'acides gras (Itoh et al. 2003). En effet, GPR40 a été identifié comme un récepteur aux acides gras à moyennes et longues chaînes, qu'ils soient saturés ou insaturés (Briscoe et al. 2003; Schnell, Schaefer, and Schöfl 2007). On retrouve également GPR40 au niveau intestinal où il contrôle la sécrétion d'hormones gastro-intestinales intervenants dans le contrôle de la prise alimentaire suite à un repas telles que la CCK (Liou et al. 2011) ou le GLP-1 (Edfalk, Steneberg, and Edlund 2008). Sa présence au niveau lingual est actuellement source de polémique. En effet, certains retrouvent son expression en ARNm (T A Gilbertson, Yu, and Shah 2010) ou encore en protéine (Cartoni et al. 2010) au niveau des papilles caliciformes et foliées chez la souris, colocalisée avec GLAST, marqueur des cellules de type I des bourgeons du goût. Pour l'équipe suisse de S. Damak, l'invalidation de GPR40 chez la souris induirait une chute de la préférence pour les AGLC alors que la perception des autres saveurs ne serait pas modifiée, suggérant fortement l'implication de GPR40 dans la détection orale des lipides alimentaires (Cartoni et al. 2010). Cependant, trois équipes différentes n'ont pas pu détecter l'ARNm codant pour GPR40 dans les papilles gustatives de rat (Matsumura et al. 2007), de souris (Montmayeur et al. 2011), et chez l'Homme (Galindo et al. 2012). De plus, des données obtenues au Laboratoire font état

de l'absence de l'ARNm de GPR40 dans la papille caliciforme de souris. Compte tenu des divergences, d'origine inconnue, qui existent pour GPR40, ce récepteur aux lipides n'est pas favori pour jouer un tel rôle au niveau gustatif.

Concernant GPR120, il a été identifié en 2005 au niveau intestinal, et présente à son extrémité terminale intracellulaire une interaction avec une protéine G de la famille Gαq (Hirasawa et al. 2005; Hirasawa et al. 2008), permettant l'initiation d'une signalisation cellulaire (**Figure 19**). GPR120 lie les AG saturés (de C14 à C18) et les AG insaturés (de C16 à C22) (Hirasawa et al. 2005), en particulier les acides gras oméga 3, qu'il semble lier de manière préférentielle (Oh et al. 2010). Son affinité pour les AG est de l'ordre du micromolaire (Hirasawa et al. 2005). En revanche le site de fixation exact des AG sur la protéine n'est pas connu, de même que sa stœchiométrie. Au niveau intestinal, GPR120 est retrouvé principalement dans les cellules entéroendocrines de type L de l'iléon et du colon chez la souris et chez l'Homme (Hirasawa et al. 2005) où il est à l'origine de sécrétion de GLP-1 et CCK lipide-dépendante. On le retrouve aussi dans les cellules entéroendocrines de type K, à l'origine d'une sécrétion de *glucose-dependent insulinotropic polypeptide* (GIP) chez la souris (Parker et al. 2009). On le retrouve également dans le tissu adipeux et les poumons (Miyachi et al. 2009). En ce qui concerne son expression au niveau lingual, GPR120 a été identifié dans certaines cellules gustatives des papilles foliées, fongiformes et caliciformes des rongeurs (Cartoni et al. 2010; Matsumura et al. 2007; Matsumura et al. 2009), colocalisé avec des marqueurs des cellules de type II tels que TRPM5 (Cartoni et al. 2010), PLCβ2 (Matsumura et al. 2009) ou encore IP3R3 (Montmayeur et al. 2011). L'équipe de S. Damak a également réalisé des tests de double choix chez les souris dont le gène codant pour GPR120 a été invalidé, montrant une préférence pour les AGLC diminuée en comparaison à des souris sauvages (Cartoni et al. 2010). En revanche, la détection des autres saveurs reste intacte. Des enregistrements électrophysiologiques des nerfs gustatifs (la corde du tympan et le nerf glossopharyngien) ont permis de montrer une diminution de l'activité électrique des nerfs suite à une stimulation avec un AGLC chez les souris GPR120^{-/-}, suggérant fortement l'implication de GPR120 dans la détection des lipides alimentaires chez la souris.

GPR120 a également été mis en évidence chez l'Homme, seulement il est retrouvé à la fois dans le tissu lingual gustatif et dans l'épithélium environnant non-gustatif (Galindo et

al. 2012). Cependant, ces auteurs n'excluent pas un rôle de GPR120 dans la détection orale des lipides alimentaires chez l'Homme, bien que cela reste à démontrer.

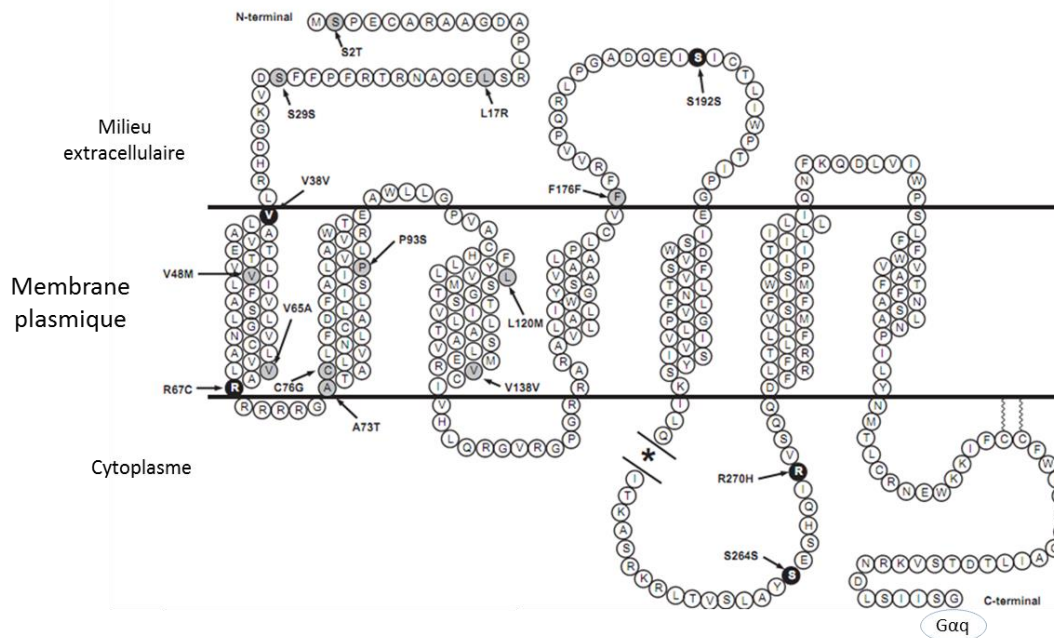


Figure 19 : Structure prédictive du GPR120 chez la souris.
Les flèches indiquent les polymorphismes. (Source : (Mo et al. 2013))

2.3. CD36

Le CD36 est une glycoprotéine membranaire multifonctionnelle appartenant à la famille des récepteurs *scavengers*. Elle est exprimée dans de nombreux tissus tels que les macrophages (Savill et al. 1992), les plaquettes (Febbraio, Hajjar, and Silverstein 2001), les adipocytes (Harmon and Abumrad 1993), les myocytes (Van Nieuwenhoven et al. 1995) ou encore les entérocytes (H Poirier et al. 1996). L'analyse de la séquence de CD36 prédit deux sites de liaison permettant de lier la thrombospondine mais également le *Plasmodium falciparum* (impliqué dans le paludisme), les lipoprotéines de basse densité oxydées ou encore les produits de glycation avancés (pour revue voir Martin et al., 2011) (**Figure 20**). De plus, CD36 peut également lier les AGLC, qu'ils soient saturés ou insaturés, avec une affinité de l'ordre du nanomolaire et une stœchiométrie de 3 moles d'AGLC pour 1 mole de CD36 (Baillie, Coburn, and Abumrad 1996). Au niveau membranaire, CD36 se retrouve principalement dans des radeaux lipidiques. En effet, lorsque ce récepteur est acétylé, il est recruté dans ces radeaux lipidiques et les interactions protéines/protéines sont facilitées.

Ainsi, au sein de ces structures membranaires, l'extrémité C-terminale de CD36 qui se situe du côté cytoplasmique de la membrane peut interagir avec les protéines de la famille des Src-protéine tyrosine kinases (Src-PTK), connues pour être impliquées dans la signalisation intracellulaire (M. M. Huang et al. 1991).

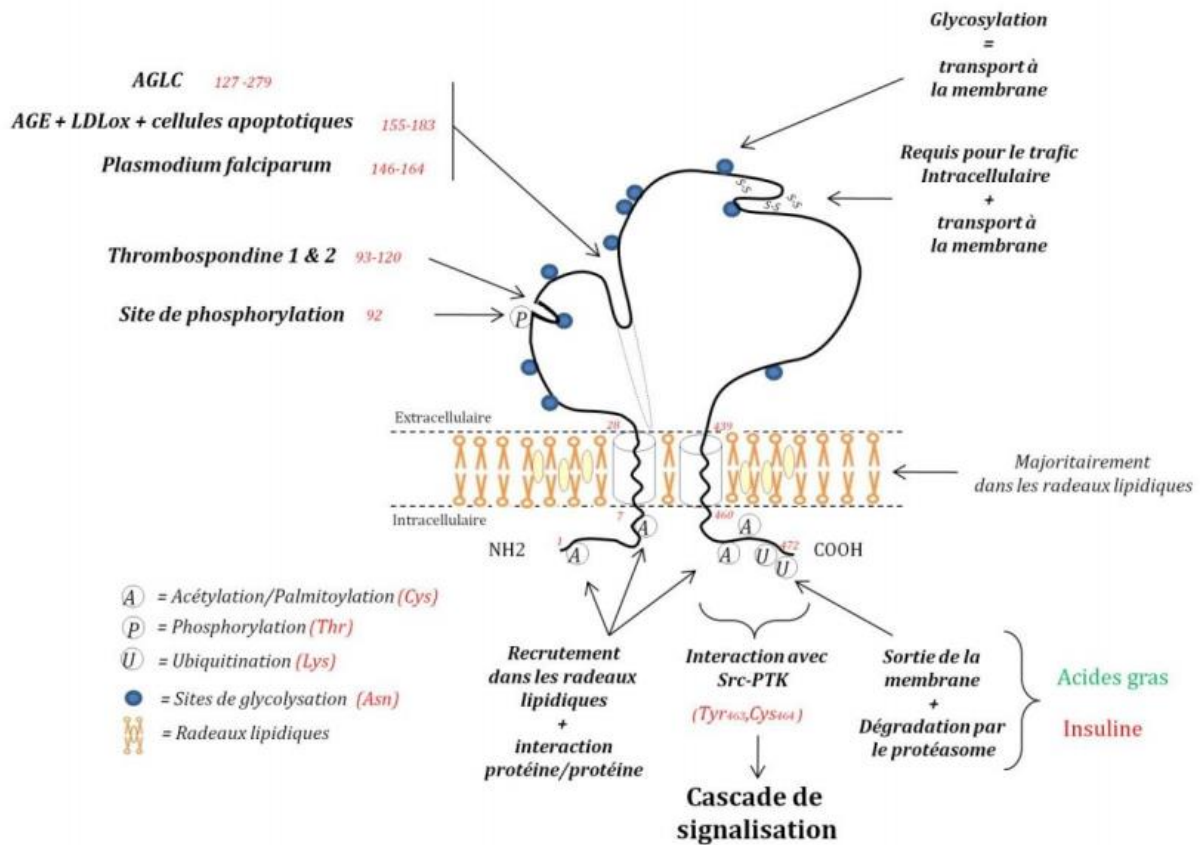


Figure 20 : Structure prédictive du CD36 chez l'Homme.

AGE : produits de glycation avancés ; AGLC : acides gras à longue chaîne ; LDLox : lipoprotéines de basse densité oxydées ; Src-PTK : Src-protéine tyrosine kinases.

(Adapté de (Céline Martin, Chevrot, et al. 2011)

D'une manière intéressante, le Laboratoire a mis en évidence la présence de CD36 au niveau de l'épithélium lingual gustatif chez la souris (Laugerette et al. 2005). Il a été montré que CD36 est exprimé de manière préférentielle dans la papille caliciforme, les papilles foliées et beaucoup moins dans les papilles fongiformes. Sa localisation est apicale au niveau de certaines cellules sensorielles bordant le pore gustatif des bourgeons du goût (Laugerette et al. 2005). On le trouve colocalisé dans certaines cellules exprimant l' α -gustducine, laissant penser que la protéine CD36 est notamment exprimée dans les cellules de type II (Laugerette et al. 2005; Gaillard et al. 2008) (**Figure 21**). En test à double choix, l'inactivation de CD36 chez la souris conduit à une perte de la préférence de la souris pour une solution

contenant 2% de LA comparée à une solution aqueuse texturée, démontrant que le CD36 lingual est nécessaire à la détection orale des lipides alimentaires chez cet animal (Laugerette et al. 2005).

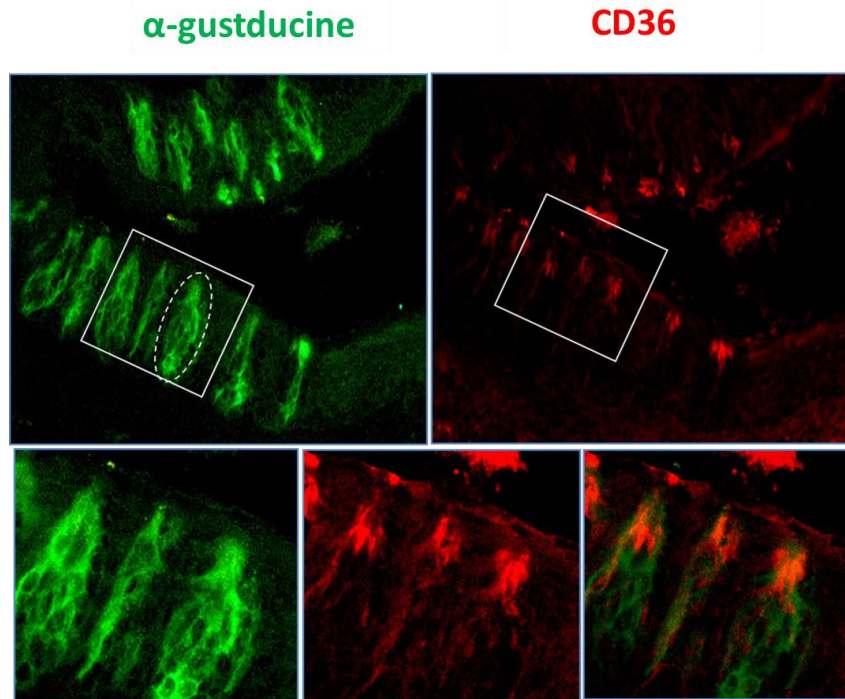


Figure 21 : Etude de colocalisation par immunohistochimie de α -gustducine et CD36 dans les papilles caliciformes de souris.
(Adapté de (Laugerette et al. 2005))

Des études récentes menées par immunohistochimie ont montré que CD36 était exprimé du côté apical des cellules gustatives dans les bourgeons du goût des papilles caliciformes et fongiformes chez l'Homme (Simons et al. 2011) (**Figure 22**).

Papille caliciforme

Papille foliée

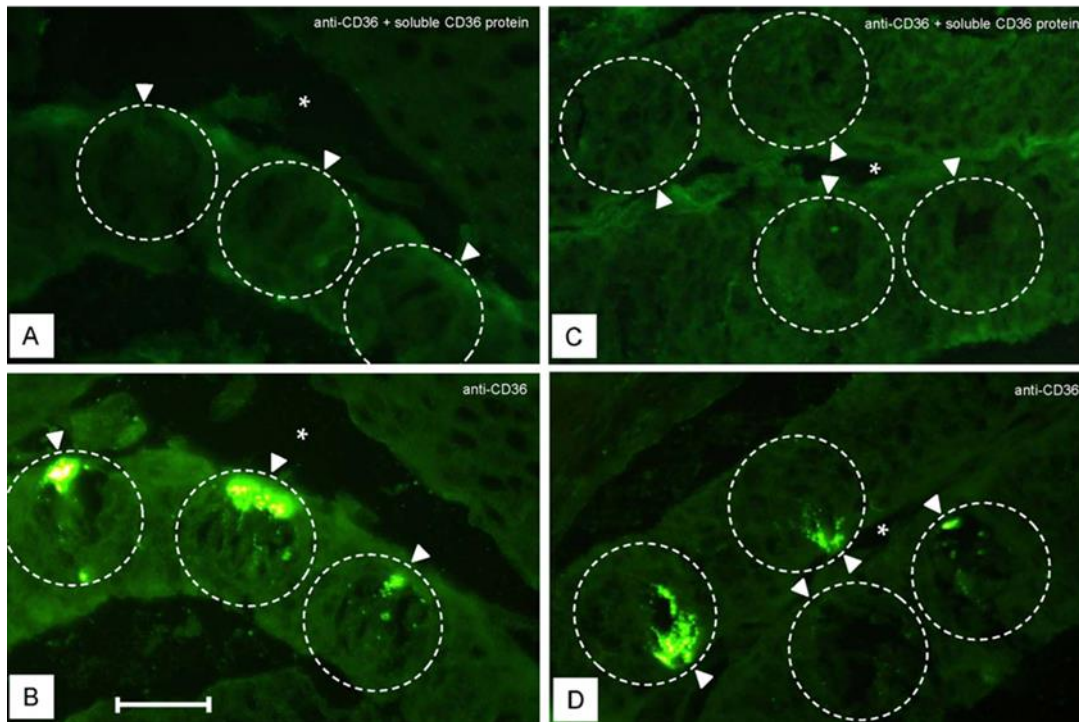


Figure 22 : Localisation par immunohistochimie de CD36 dans l'épithélium gustatif chez l'Homme.

A : Conditions contrôles dans la papille caliciforme ; B : Conditions expérimentales dans la papille caliciforme ; C : conditions contrôles dans la papille foliée ; D Conditions expérimentales dans la papille foliée. (Adapté de (Simons et al. 2011)

En résumé, parmi les différents lipido-récepteurs candidats identifiés au niveau lingual, seuls deux d'entre eux présentent des caractéristiques sérieuses permettant de les qualifier de récepteurs aux AGLC chez la souris. En effet, GPR120 et CD36 sont fortement exprimés dans les cellules gustatives des bourgeons du goût. Ils peuvent lier les AGLC avec une forte affinité et leur invalidation chez la souris aboutit à une diminution ou une perte de la préférence spontanée pour les AGLC. De manière intéressante, ces récepteurs sont également exprimés au niveau lingual chez l'Homme. Le rôle de GPR120 dans la préférence aux AGLC chez l'Homme n'est pas encore connu. En revanche, une étude récente sur un variant de CD36 chez une cohorte de sujets obèses a mis en évidence qu'il existait une dimension gustative dans la détection orale des lipides alimentaires impliquant la glycoprotéine membranaire CD36 (Pepino et al. 2012).

L'existence d'une signalisation vers les centres gustatifs du système nerveux central est requise dans la définition d'une saveur primaire. Existe-t-il une telle signalisation unique pour les AGLC ? Quels sont les mécanismes impliqués ?

3. Condition 3 : un système de transduction unique du signal. Quelles sont les signalisations cellulaires et les voies nerveuses impliquées dans la détection orale des AGLC ?

Les deux récepteurs CD36 et GPR120, identifiés dans les bourgeons du goût, interagissent avec des protéines de signalisation dans le milieu intracellulaire. Des plus, des études dans différents tissus ont montré qu'ils étaient capables de déclencher une cascade de signalisation cellulaire (Silverstein and Febbraio 2009). Le chapitre suivant détaille les éléments de signalisation connus à l'heure actuelle dans la papille gustative mais également les voies nerveuses impliquées dans le transport de l'information gustative jusqu'au cerveau.

3.1. La signalisation dans les bourgeons du goût

CD36 est une protéine multifonctionnelle exprimée dans de nombreux tissus où elle est connue pour initier une cascade de signalisation cellulaire. Cette cascade est différente en fonction du tissu considéré (Silverstein and Febbraio 2009). Au niveau lingual, les travaux menés au Laboratoire ont permis de montrer que les signaux déclenchés par CD36 suite à sa liaison avec un AGLC permettent le recrutement et l'activation des Src-PTK qui induisent une augmentation de la concentration de calcium intracellulaire ($[Ca^{2+}]_i$) (El-Yassimi et al. 2008). Ces expériences ont été menées sur des cellules CD36-positives issues des CV de souris dissociation cellulaire puis triage par immunomagnétisme (Gaillard et al. 2008). Puisque l'augmentation de $[Ca^{2+}]_i$ n'est pas retrouvée dans la population de cellules CD36 négatives, on peut dire que cette modification est strictement CD36 dépendante. De plus, si l'on utilise un inhibiteur pharmacologique de la liaison des AGLC sur le CD36, le *sulfo-N-succinimidyl oleic acid* (SSO) (Harmon et al. 1991), l'effet des AGLC sur la $[Ca^{2+}]_i$ est aboli. D'autres travaux menés au Laboratoire ces dernières années ont permis de décrypter plus en détail les mécanismes impliqués dans l'augmentation de $[Ca^{2+}]_i$ suite à l'activation de CD36 par un AGLC (**Figure 23**). En effet, il a été montré que la phosphorylation des Src-PTK conduit à la

production d'IP₃, qui agit sur son récepteur IP₃R3 au niveau de la membrane du réticulum endoplasmique, favorisant ainsi la sortie du Ca²⁺ stocké dans cette citerne vers le cytoplasme (El-Yassimi et al. 2008). La déplétion de calcium au niveau du réticulum est détectée par le senseur calcique *stromal interaction molecule 1* (STIM1), ce qui favorise alors la production du *Ca²⁺ influx factor* ou facteur CIF entraînant le recrutement d'une phospholipase A2 particulière : la iPLA2, dont l'activation est indépendante de [Ca²⁺]_i. Cette phospholipase va hydrolyser des phosphatidylcholines (PC) de la membrane plasmique pour libérer de l'acide arachidonique (AA) et du lyso-PC. Ces deux molécules vont aller stimuler des canaux SOC (*store-operated Ca²⁺* : Orai1 et Orai1/3) qui facilitent l'entrée du Ca²⁺ du milieu extracellulaire vers le cytoplasme. Cette nouvelle augmentation de [Ca²⁺]_i va favoriser l'activation d'autres PLA2 (calcium-dépendantes) qui vont renforcer l'hydrolyse des PC de la membrane plasmique et, de ce fait renforcer l'entrée du Ca²⁺ dans la cellule par les canaux SOC (Dramane et al. 2012). Cette rapide augmentation de [Ca²⁺]_i va produire une dépolarisation de la membrane et une sécrétion de neurotransmetteurs, tels que la sérotonine (El-Yassimi et al. 2008).

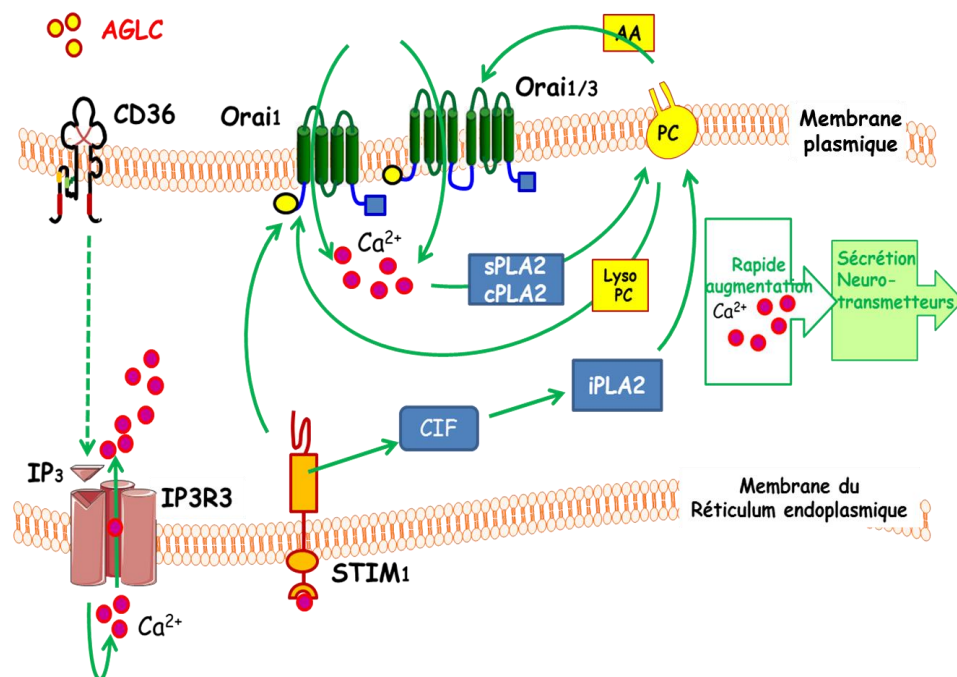


Figure 23 : La signalisation CD36-dépendante suite à une stimulation par un acide gras à longue chaîne dans les bourgeons du goût chez la souris.

AGLC : acides gras à longue chaîne ; IP₃ : inositol-triphosphate ; IP₃R3 : récepteur à l'inositol-triphosphate de type 3 ; Ca²⁺ : ion calcium ; STIM1 : *stromal interaction molecule 1* ; CIF : *Ca²⁺ influx factor* ; i/s/cPLA2 : Phospholipase A2 inducible/soluble/cytoplasmique ; PC : phosphatidylcholines ; Lyso-PC : lyso-phosphatidylcholines ; AA : acide arachidonique ; Orai1/3 : *Calcium release-activated calcium channel protein 1-3*. (Adapté de (Dramane et al. 2012)

Ce mécanisme, bien que très détaillé, n'est certainement pas encore complet. En effet, une étude récente suggère que le canal sodo-potassique TRPM5 pourrait être impliqué dans cette signalisation. En effet, l'augmentation de la concentration en calcium intracellulaire et la dépolarisation cellulaire obtenues sur des cellules gustatives isolées de la CV de souris, suite à son activation par le LA, sont fortement diminuées lorsqu'on utilise un inhibiteur de TRPM5 ou bien encore des souris TRPM5^{-/-} (P. Liu et al. 2011). De plus, un test à double choix long terme réalisé chez les souris TRPM5^{-/-} indique une perte de préférence pour les lipides chez ces souris (Sclafani et al. 2007). Des résultats récents montrent également que les souris invalidées pour TRPM5 perdent la préférence pour les AGLC lors d'un *licking test* à court terme (P. Liu et al. 2011).

Cependant, l'implication de TRPM5 pourrait être consécutive à l'activation de GPR120 par les AGLC, plutôt que par celle de CD36. En effet, même si à l'heure actuelle, rien n'est connu concernant la signalisation *via* GPR120 dans les cellules gustatives, des études réalisées *in-vitro* sur des lignées de cellules STC-1, de type entéroendocrine, indiquent que l'activation de GPR120 par des AGLC conduit à une augmentation de $[Ca^{2+}]_i$ (Hirasawa et al. 2005). De façon intéressante, TRPM5 semble être activé en aval de GPR120 (Shah et al. 2012). De plus, des études dans le tissu lingual de souris de laboratoire montrent que l'activation de TRPM5, responsable d'une dépolarisation des cellules gustatives, est dépendante de l'activation d'une voie protéine G/PLC (P. Liu et al. 2011), confirmant l'implication d'une GPCR et, par analogie avec les résultats sur les cellules intestinales, de GPR120. De plus, des travaux menés au Laboratoire ont montré que GPR120 pourrait être responsable d'une sécrétion de GLP-1 au niveau de la papille gustative chez la souris (Celine Martin et al. 2012) (**Figure 24**). En effet, lorsque l'on stimule des explants de papilles gustatives en culture avec un acide gras connu pour être très affin pour GPR120 (l'acide α -linoléique) ou bien un agoniste spécifique de GPR120, on obtient une sécrétion de GLP-1 dans le milieu de culture supérieure au niveau basal de la condition contrôle.

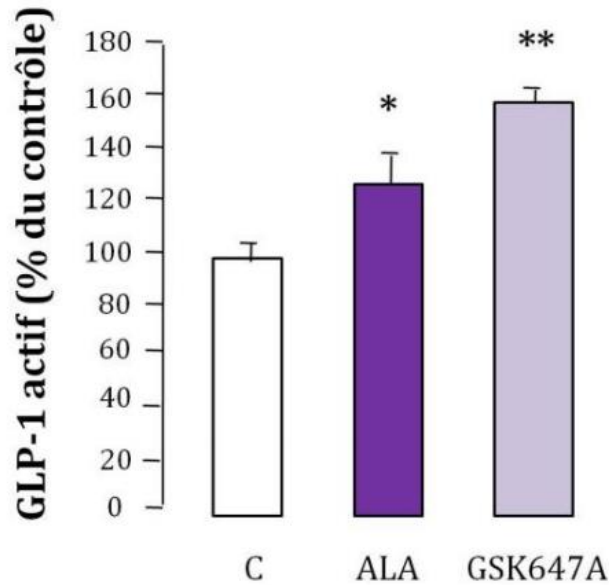


Figure 24 : Mesure de la sécrétion de GLP-1 dans des explants de papilles en culture en conditions témoins, stimulés par l'acide α -linoléinique ou un agoniste spécifique de GPR120.

C : conditions contrôles de culture ; ALA : acide α -linoléinique ; GSK647A : agoniste spécifique de GPR120 (fourni par la société GSK) (Adapté de (Celine Martin et al. 2012))

Ainsi, une signalisation cellulaire suite à une stimulation linguale avec un AGLC existe dans les bourgeons du goût chez la souris. Une signalisation unique par l'intermédiaire de CD36 et GPR120 peut être envisagée. En effet, ces deux lipido-récepteurs sont retrouvés en partie colocalisés (Celine Martin et al. 2012) au niveau des cellules gustatives de type II chez la souris et leur activation est à l'origine à la fois d'une augmentation de la concentration calcique intracellulaire et d'une dépolarisation cellulaire. Cette hypothèse est confortée par une possible collaboration entre ces deux récepteurs. En effet, il a été montré chez la drosophile qu'un homologue de structure de CD36, le SNMP (*Sensory neuron membrane protein*) pouvait lier une phéromone (le cis-vaccenyl acetate, dérivé d'un acide gras) et former un complexe fonctionnel avec le dimère Or67d/Or83b (*Olfactory receptor*) qui va récupérer cette phéromone et initier une réponse au niveau du comportement sexuel chez cet insecte (Benton, Vannice, and Vosshall 2007). Chez la souris, CD36 pourrait également lier l'acide lipotéichoïque, issu de bactéries, et le transférer au dimère TLR2/TLR6 (*Toll-like receptor*) impliqué dans l'immunité innée (Hoebe et al. 2005). Cependant, CD36 est responsable de la sécrétion de neurotransmetteurs suite à son activation par les AGLC alors que GPR120 est à l'origine de la sécrétion de GLP-1. Aucune donnée n'est disponible à

l'heure actuelle concernant une sécrétion de neurotransmetteurs suite à l'activation de GPR120. Comment le signal est-il transmis jusqu'au cerveau ? Quelles sont les structures cérébrales impliquées ?

3.2. La transmission du signal jusqu'au cerveau

Le signal nerveux ainsi créé transite en premier lieu par les nerfs gustatifs pour ensuite aller rejoindre le cerveau.

3.4.3 Anatomie du système nerveux gustatif

Les nerfs gustatifs appartiennent à la famille des nerfs crâniens, qui comptent douze paires de nerfs numérotés selon leur ordre d'émergence du cerveau. Ainsi, les bourgeons du goût sont innervés par des afférences de trois de ces nerfs (**Figure 25**) selon un profil bien défini : la corde du tympan (branche linguale du nerf VII) établit des contacts avec les papilles fongiformes et la partie antérieure des papilles foliées, le glossopharyngien (branche du nerf IX) innerve la partie postérieure des papilles foliées ainsi que la papille caliciforme et enfin le nerf vague (branche supérieure laryngée du nerf X) est connecté aux quelques papilles gustatives présentes sur la partie supérieure de l'œsophage. Ces afférences gustatives conduisent l'information issue des cellules gustatives jusqu'au premier relais central gustatif, le noyau du tractus solitaire (NTS) qui se situe dans le tronc cérébral.

Le NTS est une structure en forme de « V » localisée au niveau du bulbe rachidien. Anatomiquement, le NTS possède trois parties distinctes. La partie rostrale du NTS (rNTS) est le lieu où les afférences de la corde du tympan arrivent préférentiellement tandis que les branches du nerf glossopharyngien projettent principalement dans la partie intermédiaire du NTS (iNTS). C'est dans la partie caudale du NTS (cNTS) que sont intégrés les signaux majoritairement issus du système gastro-intestinal reçus *via* le nerf vague. Le NTS est également la cible des signaux somesthésiques (*i.e.* chaud, piquant, irritant) en provenance de la sphère orale par voie trigéminale (nerf crânien V). Il est à noter qu'une modulation de l'information gustative par les afférences trigéminales pourrait être envisagée au niveau du NTS (Boucher et al. 2003).

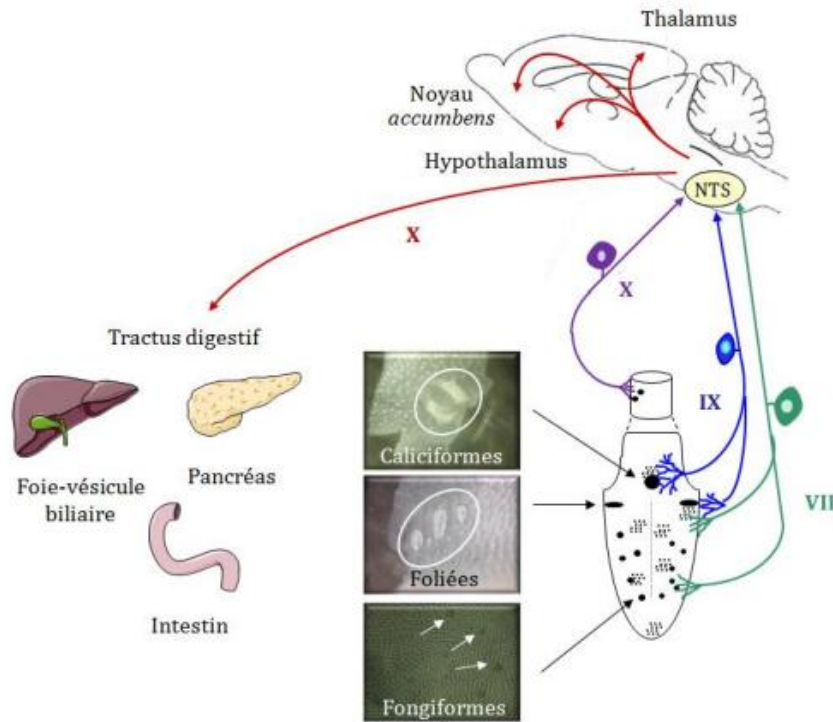


Figure 25 : Voies nerveuses impliquées dans la transmission du signal gustatif vers le cerveau.

NTS : noyau du tractus solitaire ; VII, IX, X : nerfs crâniens. (Adapté de (C Martin et al. 2010)

Une fois les informations gustatives intégrées, le NTS renvoie des informations à l'organisme et notamment vers le tractus gastro-intestinal *via* des fibres nerveuses vagues efférentes. Ces signaux sont à l'origine d'une boucle réflexe appelée phase céphalique de la digestion qui consiste en une sécrétion digestive anticipatoire, préparant l'organisme à l'arrivée d'aliments. Le NTS projette également dans d'autres régions cérébrales impliquées notamment dans la régulation de la prise alimentaire (hypothalamus) ou encore la mémorisation (hippocampe/amygdale) et le circuit de la récompense (noyau *accumbens*). Ainsi, les informations gustatives transitent par le noyau parabrachial puis par le thalamus, avant de rejoindre le cortex gustatif primaire (Katz, Nicolelis, and Simon 2002), aboutissant à une intégration à la fois sensorielle mais également hédonique de l'information gustative. Le système gustatif tient donc toute sa place dans la régulation de la prise alimentaire, bien avant même que les signaux du tractus gastro-intestinal n'arrivent au cerveau. Quels sont les effets des AGLC sur ces signaux centraux ?

3.4.4 Activation du système nerveux gustatif par les AGLC

Des données concernant l'activation du système nerveux gustatif sont disponibles aussi bien pour CD36 que pour GPR120. En ce qui concerne l'activation CD36-dépendante, des travaux réalisés au Laboratoire ont permis de déterminer que les nerfs gustatifs VII et IX étaient indispensables pour entraîner une réponse gustative aux AGLC. En effet, la section bilatérale de la corde du tympan et du nerf glossopharyngien chez la souris est responsable d'une perte de la préférence pour une solution enrichie en lipides par rapport à une solution témoin (Gaillard et al. 2008). De plus, le dépôt lingual d'un AGLC est à l'origine d'une activation spécifique au niveau de certaines régions du NTS. Cette activation du NTS semble CD36-dépendante puisque un dépôt lingual d'AGLC chez une souris CD36^{-/-} n'entraîne plus d'activation spécifique au niveau du NTS (Gaillard et al. 2008).

Des enregistrements électrophysiologiques des nerfs gustatifs ont été réalisés chez des animaux de type sauvage et GPR120^{-/-}. Il semble que, chez les souris invalidées pour GPR120, le nerf glossopharyngien ne réponde pas aux AGLC qui lient ce récepteur et que la réponse pour les mêmes AGLC est fortement diminuée au niveau de la corde du tympan (Cartoni et al. 2010). Cependant aucune étude à l'heure actuelle ne rapporte d'activation cérébrale GPR120-dépendante par les AGLC.

De nombreuses études réalisées chez le rat font également état de la nécessité de nerfs gustatifs (la corde du tympan et le nerf glossopharyngien) intacts dans la détection et la préférence pour les lipides (Stratford, Curtis, and Contreras 2006; Pittman et al. 2007; Treesukosol et al. 2010).

En revanche, les données chez l'Homme sont très rares. Une étude réalisée par IRM rapporte que la stimulation orale par de l'huile chez l'Homme permettrait l'activation de régions cérébrales spécifiques, telles que certaines régions du cortex insulaire et du cortex cingulaire mais également l'hypothalamus, indépendamment de la texture (De Araujo and Rolls 2004), renforçant l'idée d'une dimension gustative des lipides chez l'Homme (**Figure 26**).

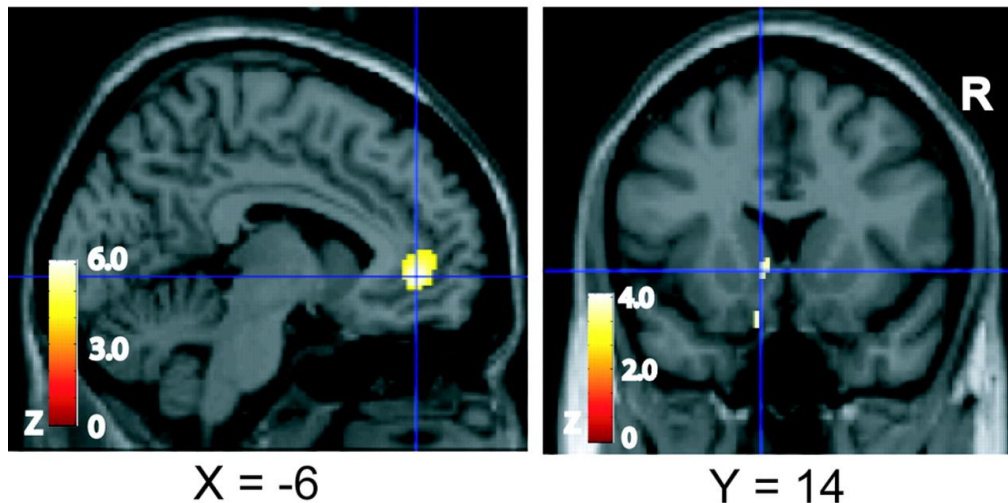


Figure 26 : Activation cérébrale suite à une stimulation orale avec une solution lipidique.

X, Y, Z : repère dans l'espace ; R : Right. (Source : (De Araujo and Rolls 2004)

Ainsi, une stimulation orale avec des AGLC est à l'origine d'une signalisation cellulaire puis d'une libération de neurotransmetteurs à l'origine d'un signal nerveux qui rejoint le NTS au niveau central. Toutes ces données ont été obtenues pour l'activation du récepteur CD36, en revanche, beaucoup moins d'informations sont disponibles à l'heure actuelle pour GPR120.

Pour être définie comme une saveur, la détection orale d'une molécule sapide doit être à l'origine de conséquences physiologiques. Quelles sont les conséquences physiologiques de l'activation des cellules gustatives des bourgeons du goût par des AGLC ?

4. Condition 4 : provoquer une réponse physiologique.

Quelles sont les réponses physiologiques de la détection orale des AGLC ?

Toute une série de travaux réalisés chez le rongeur de laboratoire et chez l'Homme ont permis de mettre en évidence que la détection orale des AGLC est à l'origine d'une anticipation digestive. Ce phénomène va faciliter la digestion et l'absorption des lipides alimentaires par l'organisme. Le message nerveux à l'origine de ce phénomène est issu du NTS et est relayé aux organes cibles par des efférences vagues. Des travaux réalisés chez le rat indiquent qu'un dépôt lingual d'AGLC s'accompagne d'une modification rapide des sécrétions pancréato-biliaires (Hiraoka et al. 2003). Des expériences similaires ont été

conduites au Laboratoire chez la souris et une augmentation des sécrétions pancréato-biliaires et de leur contenu protéique (essentiellement des enzymes digestives) a également été montrée (Laugerette et al. 2005). De manière intéressante, ces mêmes expériences reproduites chez des animaux CD36^{-/-} ont montré une diminution des sécrétions pancréato-biliaires anticipatoires, permettant d'impliquer le CD36 dans ce phénomène chez la souris (Laugerette et al. 2005). Enfin chez le rat, une exposition orale à de l'huile de maïs est à l'origine d'une augmentation de la teneur plasmatique en TG (Ramirez 1985).

Chez l'Homme, les résultats obtenus reposent principalement sur deux techniques. Tout d'abord le « sham feeding » ou repas fictif. Il s'agit d'une simulation de repas où le sujet mastique l'aliment mais ne l'avale pas et le recrache. On peut également considérer la technique du « sham feeding » modifié qui consiste à mastiquer l'aliment puis l'ingérer mais un drain gastrique permet de détourner l'aliment du système digestif. Cette technique est plus complète puisqu'elle mime parfaitement l'ingestion d'un aliment mais elle est également beaucoup plus contraignante à mettre en place. Tout d'abord, différentes études ont permis de mettre en évidence des changements au niveau de l'estomac. En effet, une stimulation orale avec des aliments riches en lipides est à l'origine d'une augmentation de la sécrétion de la lipase gastrique mais pas de la CCK (Wøjdemann et al. 1997). Ces mêmes auteurs ont utilisé de l'atropine, un antagoniste cholinergique, qui aboutit à une abolition de l'augmentation de la lipase gastrique observée précédemment. Cette donnée confirme l'implication de voies nerveuses parasympathiques dans le processus d'anticipation digestive. D'autres études de « sham feeding » d'aliments riches en lipides ont également permis de mettre en évidence une augmentation rapide de la sécrétion de ghréline, suivie par une clairance plasmatique plus rapide (Heath et al. 2004) ou bien encore une accélération de la vidange gastrique (Heath et al. 2004). Ces données suggèrent que la simple détection au niveau oral de lipides alimentaires pourrait être non seulement à l'origine d'une préparation de l'estomac à l'arrivée des lipides mais également à l'origine d'un contrôle précoce de la prise alimentaire, notamment par la diminution rapide de la ghréline dans le plasma, inhibant ainsi la sensation de faim. Cependant, le rôle joué par les lipides dans ces différents processus n'est pas vraiment identifié puisque aucun test n'a été réalisé avec des lipides seuls.

De plus, l'ajout de lipides dans un repas fictif provoque une sécrétion plus importante du polypeptide pancréatique (PP) que celle obtenue avec un repas fictif témoin alipidique mais riche en glucides (Crystal and Teff 2006).

De nombreuses études chez l'Homme, réalisées principalement par l'équipe de R. Mattes, de l'Université de Purdue aux USA, montrent que la présence de lipides en bouche est suffisante pour modifier la triglycéridémie post-prandiale. Des volontaires sains, à jeun depuis la veille, ayant ingéré 50g de lipides encapsulés dans des gélules (afin d'éviter le contact oral), voient leur taux de TG plasmatiques augmenter plus fortement suite à un repas fictif (car non ingéré) contenant des lipides que les sujets dont le repas en est dépourvu (R D Mattes 1996; Richard D Mattes 2009b). Ces changements semblent être indépendants de la texture de la matrice utilisée pour apporter les lipides (R D Mattes 2001a) ainsi que de la perception olfactive des lipides (R D Mattes 2001b). Ces résultats suggèrent l'implication de la perception gustative des lipides dans un arc réflexe chez l'Homme (Richard D Mattes 2005). Pour déclencher ce phénomène, une exposition courte (10s) (Richard D Mattes 2009b) et une faible quantité de lipides encapsulés disponible par la suite au niveau intestinal (de 10 à 30g) (Richard D Mattes 2009c) sont suffisantes. Cette augmentation des TG observée est biphasique, avec un pic précoce apparaissant dans les minutes qui suivent la stimulation orale avec les lipides, suivi d'un pic plus tardif mais de plus grande ampleur intervenant dans les 2-3h. L'augmentation du taux plasmatique de TG post-prandiaux pourrait résulter à la fois d'une mobilisation des lipides stockés dans les entérocytes (Chavez-Jauregui, Mattes, and Parks 2010) mais également d'une diminution de la clairance plasmatique (Richard D Mattes 2009c). Une étude récente réalisée à l'aide d'isotopes stables a permis de montrer qu'environ la moitié des TG sécrétés lors du pic tardif de sécrétion était issue du dernier repas ingéré, même lorsque celui-ci a eu lieu la veille (Chavez-Jauregui, Mattes, and Parks 2010). En ce qui concerne le premier pic, l'origine intestinale ne semble pas favorisée et il s'agirait essentiellement de VLDL issus du foie. Tous ces résultats concernent la détection orale des lipides alimentaires au sens large mais ne décrivent pas la part des AGLC dans ce phénomène. Une seule étude fait état d'un rôle limité de l'acide linoléique dans ce phénomène tandis que l'acide oléique ne semble pas jouer de rôle (Smeets and Westerterp-Plantenga 2006). Dans tous les cas, les acides gras insaturés semblent être plus efficaces que les acides gras saturés (Tittelbach and Mattes 2001).

Ainsi, les lipides alimentaires et, dans une moindre mesure chez l'Homme les AGLC, sont responsables d'une anticipation digestive lorsqu'ils sont détectés au niveau orale. La simple présence de lipides en bouche permet à l'organisme de se préparer à recevoir des lipides et à mieux les digérer et les absorber, voire à initier un contrôle négatif sur la prise alimentaire. Cependant, le rôle physiologique de la sécrétion de TG suite à une stimulation orale n'est toujours pas connu à l'heure actuelle. D'une manière intéressante, il semble y avoir une corrélation positive entre le niveau de sécrétion de TG dans le plasma et l'IMC des sujets (Richard D Mattes 2011b). Ainsi, un désordre métabolique pourrait être à l'origine de bouleversements au niveau de la détection orale des lipides alimentaires et des conséquences physiologiques qui en découlent.

5. Condition 5 : apporter un avantage évolutif. La détection orale des lipides apporte-t-elle un avantage évolutif ?

Il est connu que le goût joue un rôle important dans la sélection alimentaire. Ainsi, les saveurs sucré, salé et *umami* favorisent le choix d'aliments possédant une grande valeur hédonique tandis que les saveurs acide et amère permettent d'éviter la consommation d'aliments potentiellement à risque. Cependant, l'Homme peut aller à l'encontre des informations négatives apportées par les saveurs, concernant notamment certains aliments amers (certains légumes ou le café par exemple) ou bien encore certains aliments acides (tous les jus riches en vitamine C par exemple). Une détection très fine des AGLC peut présenter, tout comme les autres saveurs, un avantage certain du point de vue de l'évolution. En effet, la détection gustative des AGLC pourrait permettre à l'organisme de sélectionner des aliments à très haute densité énergétique, favorisant le stockage d'énergie. Cette détection est un avantage qui trouve tout son sens en période de disette alimentaire notamment. Cependant, les AGLC et notamment les AGPI, sont sensibles à l'oxydation et les composés issus de l'oxydation des AG sont à l'origine de signaux négatifs, informant l'organisme que les aliments sont rances. Encore une fois, l'apprentissage chez l'Homme permet d'aller à l'encontre de ces signaux et favorise ainsi la consommation de certains aliments, tels que quelques fromages par exemple, riches en produits issus de l'oxydation des AGLC. Ainsi, la détection orale des lipides alimentaires, en favorisant la consommation

d'aliments riches en énergie, apporte un avantage évolutif certain dans la détermination des choix alimentaires.

6. Condition 6 : être décrit comme une sensation unique. La détection orale des lipides peut-elle décrite comme une sensation unique ?

Il n'est pas possible à l'heure actuelle d'affirmer que la détection des AGLC est une perception unique. En effet, deux principaux points vont à l'encontre de cette hypothèse. Tout d'abord, la détection orosensorielle des aliments riches en lipides est en réalité la résultante d'une combinaison de plusieurs facteurs, tels que l'olfaction, la rétro-olfaction ou bien encore la texture ou les propriétés thermiques des aliments. Isoler la part gustative parmi tous ces signaux est très compliqué. Lors des tests de mesure de seuils gustatifs pour les lipides chez l'Homme, où les différentes composantes (texture, olfaction, etc...) sont minimisées, il existe tout de même une détection des lipides par les sujets, suggérant très fortement l'existence d'une part gustative. Cependant, on ne peut pas conclure de manière catégorique à ce propos car l'adéquation de la solution contrôle et de la solution expérimentale n'a pas encore pu être établie (Richard D Mattes 2011a).

De plus, il n'existe pas à l'heure actuelle de champ lexical adapté à la gustation des lipides, alors que cela existe pour les saveurs sucrée et salée par exemple. Ceci tient peut-être au fait que, lorsqu'on interroge les sujets en test de mesure de seuil sur les sensations perçues lors des tests, ils n'arrivent pas à verbaliser leur ressenti, comme si la détection gustative des lipides était un phénomène inconscient. En effet, les descriptions qui ressortent lors des tests tiennent plus à la différence de texture résiduelle entre la solution contrôle et celle qui contient en plus l'AGLC. Ainsi, les termes de crémeux ou d'onctueux sont généralement retrouvés. De plus, les AGLC, de par leur structure chimique, peuvent également apporter une sensation d'irritation. Enfin, les AG libres sont des molécules très sensibles à l'oxydation et l'apparition de dérivés oxydés, susceptibles d'apporter de l'amertume dans la solution est inévitable même si tout est fait pour que l'oxydation soit réduite au maximum.

Ainsi, même si les AGLC sont détectés au niveau oral chez la souris et chez l'Homme de manière gustative, et pourraient être à l'origine d'un avantage évolutif important, il n'existe pas à l'heure actuelle de preuve d'une sensation unique apportée par les AGLC.

La majorité des récepteurs membranaires voient leur expression régulée afin de limiter la réponse biologique qui découle de leur activation. La lipido-réception au niveau des cellules gustatives des bourgeons du goût est-elle modulable ?

7. Condition 7 : avoir un système de détection régulable.

Régulation de la lipido-réception gustative : cas des CD36 et GPR120

Dans un système physiologique, le rétrocontrôle des récepteurs permet une désensibilisation, évitant ainsi leur activation en continu. En tant que récepteurs membranaires, CD36 et GPR120 ne doivent pas échapper à la règle. En fait, contrairement à GPR120, seul le récepteur CD36 semble être régulé. En effet, des travaux récents menés au Laboratoire montrent que l'expression du récepteur CD36 au niveau lingual est dépendant de la prise alimentaire. Ainsi, une étude visant à déterminer le cycle nyctéméral du CD36 lingual chez la souris a démontré une diminution de son expression en ARNm pendant la phase de nuit, où la souris consomme la majorité de sa prise alimentaire quotidienne (**Figure 27**). D'une manière étonnante, l'expression en ARNm de GPR120 reste plus ou moins stable chez la souris quelle que soit la période de la journée considérée (Céline Martin, Passilly-Degrace, et al. 2011).

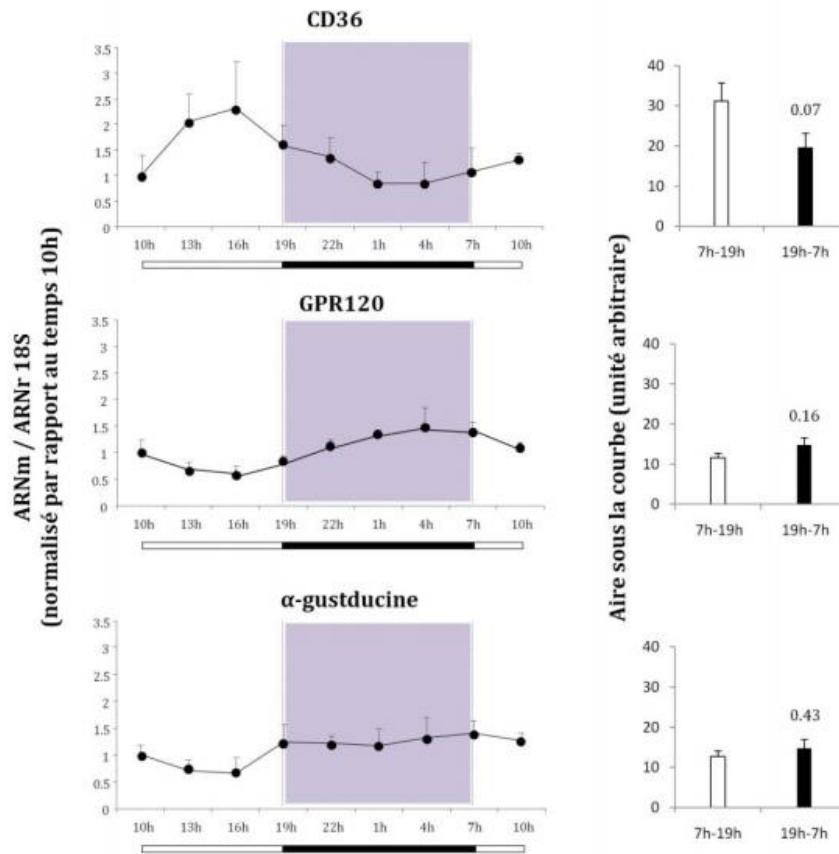


Figure 27 : Expression génique de CD36, GPR120 et α -gustducine au cours du nyctémère chez la souris.

(Adapté de (Céline Martin, Passilly-Degrace, et al. 2011))

Les mécanismes mis en jeu dans cette régulation du CD36 lingual chez la souris ont également été étudiés. D'une manière intéressante, il a été montré que la chute de l'expression en ARNm de CD36 est strictement dépendante de la prise alimentaire chez la souris mais surtout de la présence de lipides dans l'alimentation. En effet, la régulation observée chez des souris à jeun qui ont été renourries 1h avec un régime riche en lipides n'est plus retrouvée pour une alimentation alipidique. Ainsi, l'expression en ARNm de CD36 est similaire à la condition témoin à jeun quand on renourrit les souris avec un régime alipidique tandis qu'on observe une chute de 60% de son expression quand le régime alimentaire est riche en lipides. Cette régulation semble être très fine puisque la présence d'une très faible quantité de lipides (0.5%, m/m) dans le régime suffit à provoquer la diminution de l'expression de l'ARNm de CD36 (Céline Martin, Passilly-Degrace, et al. 2011). Une régulation de l'expression protéique a également été mise en évidence. Une cinétique de reprise alimentaire, après un jeûne de 16h, a permis de déterminer que la teneur protéique de CD36 est diminuée de 60% dans la CV chez la souris, après 1h de renourriture

avec une alimentation contenant des lipides (**Figure 28**). Elle remonte ensuite progressivement à partir de 4h pour atteindre à nouveau le niveau de base à 11h. A nouveau, aucune régulation de GPR120 par la prise alimentaire n'est constatée.

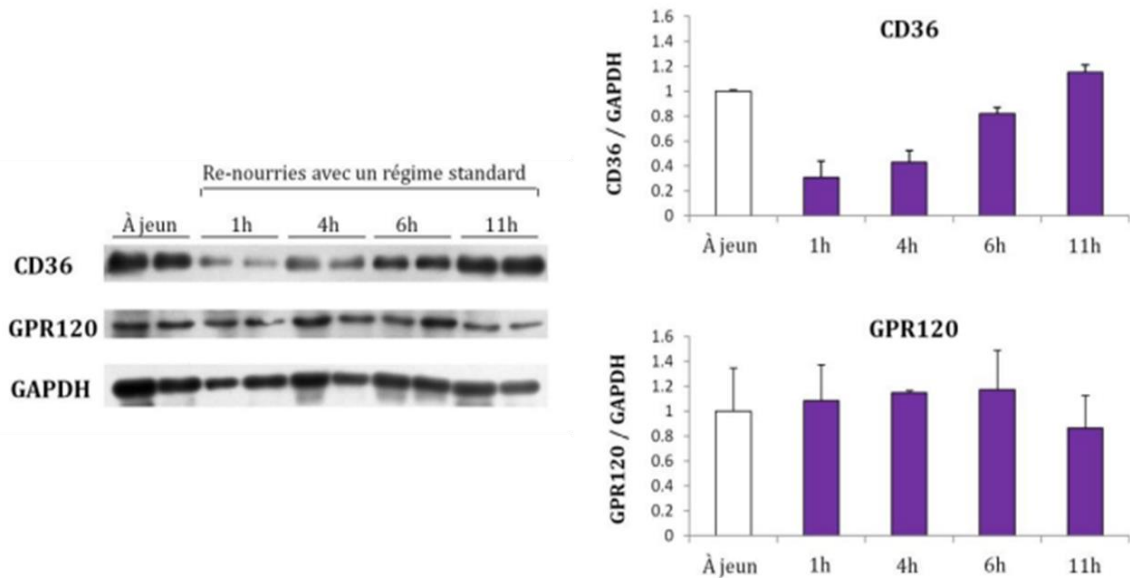


Figure 28 : Cinétique de l'expression de CD36 et GPR120 par Western-blot lors d'une renourriture avec un régime standard chez la souris
(Adapté de (Céline Martin, Passilly-Degrace, et al. 2011))

Afin d'étudier l'impact de cette diminution d'expression de CD36 sur le comportement alimentaire chez la souris, des tests de double-choix en lickomètres ont été réalisés chez les animaux de la lignée $CD36^{-/-}$ (**Figure 29**). Ainsi, la préférence pour une solution d'huile de paraffine additionnée de 0.5% de LA a été mesurée chez des animaux $CD36^{+/+}$, $CD36^{+/-}$ et $CD36^{-/-}$. Comme observé précédemment (Laugerette et al. 2005), les animaux dont le gène codant pour CD36 a été invalidé perdent la préférence pour les lipides en court-terme (5 minutes) par rapport aux animaux témoins sauvages. D'une manière intéressante, les animaux hétérozygotes, dont le niveau d'expression de CD36 est diminué de moitié dans la CV, perdent également cette préférence. Ainsi, par analogie, la chute de CD36 de 60% observée chez les animaux qui ont été renourris pendant une heure avec un régime alimentaire contenant des lipides pourrait être responsable d'une perte de préférence pour les lipides, favorisant ainsi de manière rapide l'arrêt de la consommation lipidique des animaux (Céline Martin, Passilly-Degrace, et al. 2011). Ce mécanisme pourrait expliquer le phénomène de rassasiement sensoriel spécifique (Cabanac 1971). Ce

phénomène correspond à la diminution provisoire du plaisir éprouvé lors de la consommation d'un aliment donné comparé à un autre aliment non encore consommé et qui possède des propriétés sensorielles différentes.

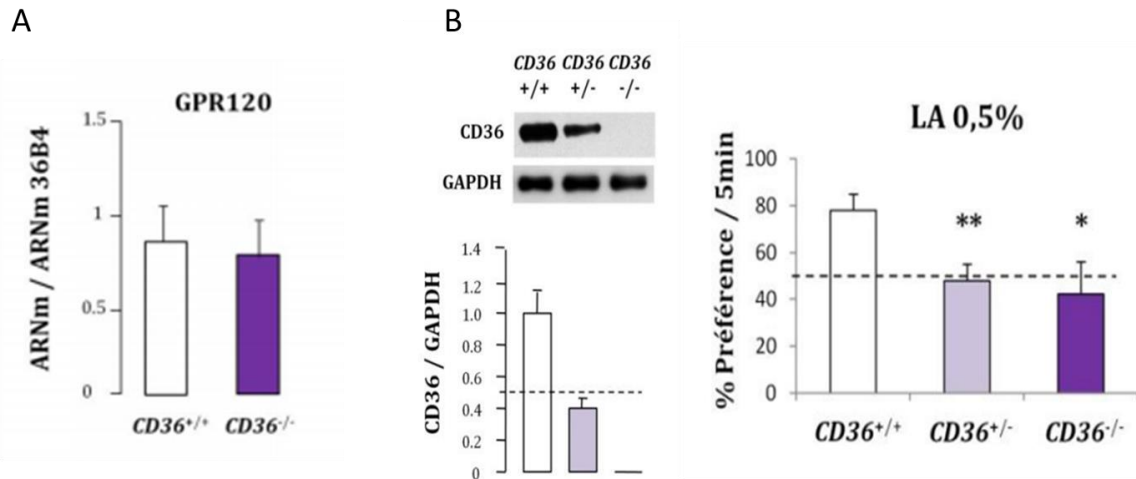


Figure 29 : Niveaux d'expression de GPR120 (A) et CD36 (B) par western-blot et préférence à court terme pour l'acide linoléique chez des souris CD36^{+/+}, CD36^{+/-} et CD36^{-/-} (B).

(Adapté de (Céline Martin, Passilly-Degrace, et al. 2011)

Seulement dans ce schéma, GPR120 ne semble pas impliqué puisque son niveau d'ARNm ne diffère pas entre les différents génotypes. Ainsi, comment expliquer que l'inactivation de l'un, CD36 (Laugerette et al. 2005) ou de l'autre, GPR120 (Cartoni et al. 2010) de manière indépendante conduise à une perte ou une diminution de la préférence spontanée pour les lipides chez la souris, sans compensation d'une voie par rapport à l'autre ?

Les travaux du Laboratoire ont montré une sécrétion de GLP-1 dépendante de GPR120 dans des explants de papilles caliciformes de souris. De manière intéressante, le GLP-1 agit de manière paracrine comme un modulateur dans la détection des glucides chez la souris (Shin et al. 2008). Mais bien plus encore GLP-1 serait capable de potentialiser la détection des AGLC détectés *via* CD36. En effet, des tests de préférence à long-terme chez des souris dont le gène codant pour le récepteur à GLP-1 a été invalidé indiquent qu'elles ne parviennent plus à détecter les faibles concentrations d'huile de colza. En revanche, il n'y a pas de différences de la préférence à court terme pour les AGLC. Ces données suggèrent que le GLP-1 sécrété dans les papilles gustatives par GRP120 suite à une stimulation avec un

AGLC permettrait d'augmenter la sensibilité gustative aux AGLC *via* CD36, sans impacter la préférence des animaux pour ces AGLC. Ainsi, il y aurait une collaboration entre les deux cascades de signalisation des lipido-récepteurs CD36 et GPR120 au niveau des cellules gustatives, aboutissant à une signalisation intracellulaire unique, qui pourrait expliquer la forte palatabilité des éléments riches en lipides et glucides d'une part mais également l'absence ou la diminution de préférence observée pour les lipides quand l'une ou l'autre des voies de signalisation est altérée (Celine Martin et al. 2012).

En conclusion, on constate que l'épidémie actuelle d'obésité ne cesse de progresser de manière inquiétante. Cette maladie est une pathologie multifactorielle avec comme cause principale une augmentation de la consommation énergétique, notamment sous forme de lipides. Ainsi, une meilleure compréhension des mécanismes de détection des lipides s'avère nécessaire afin de lutter efficacement contre cette maladie. La détection des lipides au niveau de l'organisme a lieu à la fois au niveau intestinal, au niveau central mais également au niveau oral. Cette revue bibliographique indique qu'il existe une attraction spontanée pour les lipides, aussi bien chez le rongeur que chez l'Homme. Les travaux menés chez la souris ont permis de décrire une dimension gustative de la détection orale des lipides alimentaires, en plus de la texture et de l'olfaction. Cette détection orale des lipides alimentaires peut être définie comme la sixième modalité gustative chez la souris. En effet, des lipido-récepteurs, CD36 et GPR120, ont été identifiés au niveau lingual. De plus, lorsqu'ils sont stimulés par un AGLC, ils sont capables d'initier une signalisation cellulaire à l'origine d'un message nerveux qui transite par les nerfs gustatifs. Ensuite, cette information gustative rejoint le système nerveux central au niveau du premier relais gustatif central : le noyau du tractus solitaire. Par projection dans le cortex d'une part, le message gustatif pourrait être à l'origine d'une préférence pour les lipides et d'autre part, son retour vagal en périphérie provoque des sécrétions digestives anticipatoires. Ainsi, ces éléments permettent de remplir en partie, chez le rongeur de laboratoire, les critères proposés par R. Mattes pour définir une saveur. Des études complémentaires du Laboratoire ont montré que contrairement à GPR120, CD36 est un récepteur lipidique régulé par la prise alimentaire et plus particulièrement par les lipides contenus dans les aliments. La chute de l'expression de CD36 dans la papille caliciforme de souris suite à une renourriture serait dépendante du

GLP-1 sécrété localement suite à l'activation de GPR120 par les AGLC. L'hypothèse avancée serait que cette régulation de CD36 au cours d'un repas pourrait être à l'origine de l'initiation de la fin d'un repas par le processus de rassasiement sensoriel spécifique.

L'état des connaissances chez l'Homme est moins avancé. Il est connu à l'heure actuelle qu'il existe une détection gustative des AGLC. Cette détection serait à l'origine d'activation de régions cérébrales spécifiques ainsi que de phénomènes d'anticipation digestive. Des études réalisées chez des sujets mutés pour le gène codant pour CD36 chez l'Homme montrent une implication de cette protéine dans la détection orale des AGLC.

Des travaux récents chez l'Homme ont également montré l'existence d'un lien entre la sensibilité aux AGLC, la consommation de lipides et l'IMC chez des sujets de poids normal (Jessica E Stewart et al. 2010). Au regard de l'épidémie actuelle d'obésité, il apparaît donc nécessaire de se demander si l'obésité peut être liée à la perception des lipides alimentaires, et quels pourraient être les mécanismes impliqués.

Problématique

Il existe un système de détection oro-sensorielle des lipides alimentaires à la fois chez la souris et chez l'Homme, leur conférant la possibilité de détecter la présence de lipides dans l'alimentation et ainsi de choisir des aliments riches en énergie. Ce « sensing » lipidique d'origine gustative peut constituer un avantage évolutif dans un contexte de précarité alimentaire chronique. En revanche, il peut constituer un facteur aggravant le risque d'obésité en cas de pléthore permanente. Cependant, nous avons vu que la détection orale des lipides est soumise à régulation de telle sorte qu'on peut imaginer que l'obésité elle-même pourrait l'affecter.

L'objet de cette thèse concerne le lien entre l'obésité et la détection orale des lipides alimentaires. En effet, l'obésité pourrait être à l'origine de défauts dans la perception des lipides alimentaires mais l'inverse est également possible (**Figure 30**).

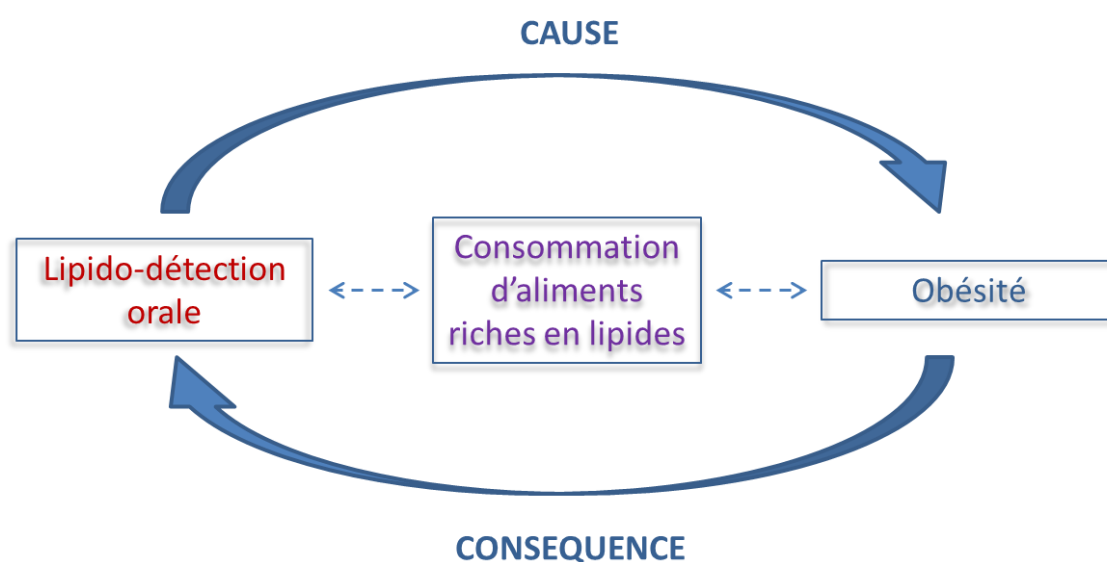


Figure 30 : Hypothèse de travail.

Pour tenter d'éclaircir ce point, les expériences présentées dans la première partie de cette thèse visent à répondre à la question suivante : Quels est l'impact de l'obésité sur la détection orale des lipides chez l'Homme ? Une combinaison d'approches psychophysique (mesure de seuils de détection), physiologique (profils plasmatiques) et diététique (carnets de relevés alimentaires) ont été réalisés chez des sujets minces et obèses.

La deuxième partie de la thèse avait pour but d'éclaircir les mécanismes mis en jeu. Pour ce faire, l'impact d'une obésité induite par le régime alimentaire sur la détection oro-

sensorielle des AGLC a été déterminée dans un premier temps, chez la souris. Puis les mécanismes cellulaires impliqués ont été explorés.

L'obésité peut, en partie, être expliquée par une consommation alimentaire excessive pouvant résulter de dérégulations du comportement alimentaire. L'hypothalamus étant une structure cérébrale clé de la régulation du comportement alimentaire, la troisième partie de cette thèse présente nos travaux sur l'impact du « sensing » hypothalamique des lipides sur le comportement alimentaire chez la souris.

Résultats

I. Quel est l'impact de l'obésité sur la détection orale des lipides chez l'Homme ?

Des travaux récents suggèrent l'existence d'une corrélation entre le seuil de détection oro-sensorielle des AGLC et l'IMC chez l'Homme (Jessica E Stewart et al. 2010). Bien que cette idée soit largement reprise depuis dans la littérature, elle se base sur une étude réalisée avec un nombre limité de sujets ayant un IMC moyen de 21.1 ± 0.5 . Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons donc entrepris une étude comparative entre des sujets minces ($19 < \text{IMC} < 25$) et des sujets obèses ($\text{IMC} > 30$). Puisque l'insuline est susceptible de modifier le devenir membranaire du CD36 lingual (J. Smith et al. 2008), nous avons choisi de sélectionner des sujets obèses non-diabétiques.

Dans le cadre de ce projet, une étude clinique en collaboration avec deux autres équipes dijonnaises (l'équipe de physiopathologie des dyslipidémies, UMR U866 INSERM/uB/AgroSup Dijon dirigée par B. Vergès et une équipe du Centre des Sciences du Goût et de l'Alimentation UMR CNRS6265/INRA1324/uB dirigée par S. Issanchou) a été mise en place. Sur chacun des sujets recrutés, une mesure du seuil de détection de l'acide linoléique a été réalisée, puis deux cinétiques de prélèvements sanguins ont été faites suite à une stimulation orale avec une solution contenant ou non 1% de LA. Ces expériences ont été menées afin de répondre aux questions suivantes :

- Existe-t-il une détection orale de l'acide linoléique chez l'Homme ?
- La détection orale du LA est-elle à l'origine de conséquences physiologiques ?
- Ces paramètres sont-ils modifiés en cas d'obésité chez l'Homme ?
- Existe-t-il un lien entre obésité, perception oro-sensorielle des lipides et consommation préférentielle d'aliments gras ?
- Quels sont les mécanismes cellulaires impliqués ?

Une partie des résultats obtenus fait actuellement l'objet de la rédaction d'un article qui vous est présenté ci-après.

Matériels et méthodes

Le détail des expériences mises en place dans ce projet est présenté ci-dessous :

- Recrutement des sujets

Pour cette étude clinique, deux cohortes de 30 sujets ont été recrutées : des sujets minces et des sujets obèses non-diabétiques. Les critères de recrutement définis pour chacun des groupes ainsi que les critères d'exclusion communs aux deux groupes sont présentés dans le **Tableau 5**. Chaque patient a reçu les informations détaillées concernant l'étude et a donné son consentement éclairé à la fin de la visite d'inclusion. Tous les participants ont reçu une compensation financière.

<ul style="list-style-type: none"> • Sujets minces : Hommes > 18 ans $19 < \text{IMC} < 25 \text{ kg.m}^{-2}$ Triglycéridémie < 1.50 g.l^{-1} Glycémie à jeun < 1.10 g.l^{-1} Pas de prise régulière d'un traitement médicamenteux 	<ul style="list-style-type: none"> • Sujets obèses : Hommes > 18 ans $\text{IMC} \geq 30 \text{ kg.m}^{-2}$ Glycémie à jeun < 1.10 g.l^{-1} HbA1c < 6.0 % Absence de traitement par agent hypoglycémiant, de traitement médicamenteux et de traitement par la chirurgie
<ul style="list-style-type: none"> • Critères majeurs d'exclusion : <ul style="list-style-type: none"> - Fumeurs ou anciens fumeurs de moins de 3 mois - Personnes avec TCA - Pathologies digestives sévères 	

Tableau 5 : Critères de recrutement pour le protocole clinique.

IMC : Indice de Masse Corporel ; HbA1c : Hémoglobine glyquée

- Préparation des solutions

Toutes les solutions sont des émulsions à base d'acide linoléique (LA C18:2 ; cis-9, cis-12, Sigma Aldrich, USA) préparées dans des contenants en polypropylène. Pour les mesures du seuil de détection du LA, une gamme s'étendant de 0.00028% à 5% (m/v) de LA avec un pas de 0.25 log a été utilisée (soit 18 concentration au total). Les tests de stimulation orale ont

été menés avec une solution à 1% de LA (m/v). Ces émulsions sont préparées dans une solution contenant 5% de gomme d'acacia (m/m, Fluka, USA), 5% d'huile de paraffine (m/m, Cooper, France) et 0.01% d'ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) (m/m, VWR, USA) dilués dans de l'eau minéral d'Evian®. La gomme d'acacia et l'huile de paraffine sont utilisées pour limiter les différences de texture entre les solutions (viscosité, etc...) et l'EDTA permet de limiter l'oxydation de l'acide linoléique. Les émulsions ont été obtenues par agitation magnétique puis homogénéisées à l'aide d'un sonicateur (Misonix modèle S-4000, QSonica, LLC, Newton, USA) réglé à son amplitude de sonication maximale. La durée de sonication a été adaptée en fonction de la concentration en LA avec une durée de 1min45 pour les solutions avec de fortes concentrations en LA et un durée de 3min30 pour les solutions avec de faibles concentrations de LA ou pour la solution contrôle. Dans tous les cas, les sonications ont été réalisées par lapses de 30s séparés par des pauses de 1min. La sonication a été réalisée dans une chambre hermétique saturée en azote et en présence d'un bain de glace afin de limiter la formation de composés oxydés pendant la préparation. Toutes les solutions sont préparées la veille des tests et conservées dans des bouteilles en polypropylène, à l'abri de la lumière, fermées sous azote et à 4°C.

L'homogénéité des échantillons a été vérifiée par analyse de taille de particules (Mastersizer 2000, Malvern Instrument, UK) qui a révélé que la distribution des gouttelettes lipidiques ne différait pas au sein de la gamme de concentration de LA. De plus, une analyse par chromatographie a montré qu'il n'y avait pas de différence de teneur en composés oxydés entre le LA pur à la sortie du flacon de conditionnement et une solution de 5% LA après sonication. Finalement, des analyses microbiologiques ont permis de valider notre protocole auprès des autorités françaises compétentes.

- Mesure des seuils de détection du LA

Les séances de mesure des seuils de détection du LA ont été réalisées au sein du Centre des Sciences du Goût et de l'Alimentation dans des salles d'évaluation sensorielle climatisées (21°C ± 1°C) possédant des box individuels. Les sujets ont reçu comme consignes de limiter leur consommation alimentaire et hydrique ainsi que l'usage de produit de soins buccaux deux heures avant le début de la session. Les seuils de détection sont déterminés en utilisant la technique du 3-Alternative Forced Choice (3-AFC) qui consiste en une succession de tests

triangulaires. Lors d'un test triangulaire, 3 échantillons, contenus dans des gobelets, sont présentés au sujet. Deux de ces gobelets contiennent la solution contrôle et le troisième la solution expérimentale. L'objectif du sujet lors du test triangulaire est de déterminer, parmi les trois gobelets qui lui sont présentés, lequel contient la solution expérimentale. Les séries de tests triangulaires sont présentées de manière ascendante, ce qui signifie que les sujets iront de la concentration la plus faible en LA jusqu'à celle la plus forte. Lorsque le sujet ne parvient pas à déterminer le gobelet qui contient la solution expérimentale, il échoue alors au test et doit recommencer avec la solution expérimentale dont la teneur en LA est juste supérieure dans la gamme de concentration définie. Quand le sujet réussit le test, une seconde série avec la même concentration de LA pour la solution expérimentale est réalisée. La mesure s'arrête lorsque le sujet a identifié trois fois consécutives le gobelet qui contenait la solution expérimentale. La concentration en LA de cette solution représente le seuil de détection du LA pour ce sujet.

Un aliquot de 5mL de chaque solution était présenté aux sujets, servi à température ambiante. Les sujets avaient pour consigne de garder la totalité de ces 5mL en bouche pendant 7sec puis de recracher, attendre 20sec et goûter le deuxième gobelet puis le troisième en suivant le même protocole. A la fin de la série, le sujet devait répondre à la question : « Quelle est l'échantillon différent parmi les trois proposés ? ». L'intervalle entre deux séries était de 60 à 120sec environ, pendant lesquelles les sujets devaient se rincer la bouche avec de l'eau à 50°C. Le test a été réalisé en lumière rouge afin de gommer les différences visuelles et les sujets devaient porter des pince-nez pour éviter les influences olfactives.

- Cinétiques de prélèvements sanguins

Les cinétiques de prélèvements sanguins ont eu lieu pour chaque patient pendant 2 séances, distantes d'au moins deux semaines, au sein du service d'Endocrinologie du CHU de Dijon. Pendant ces séances, les patients se sont vu posés un cathéter dans une veine du bras et devait porter un pince-nez pour éviter les influences olfactives. Pour commencer, deux prélèvements préliminaires ont été réalisés. Ensuite, lors de la stimulation orale, les patients devaient faire tourner en bouche puis recracher cinq fois à la suite des solutions contenant ou non 1% de LA (selon le schéma suivant : 15sec en bouche, 45sec de pause, 15sec en

bouche, ...). Enfin, 7 prélèvements sanguins ont été réalisés pendant 35 minutes. Les prélèvements ont été réalisés avec des tubes sous vide contenant de l'EDTA. Tous les échantillons prélevés ont été placés sur glace puis centrifugés afin de récupérer le plasma qui a été stocké à -20°C. La moitié des patients a eu une stimulation orale avec la solution expérimentale lors de la première visite puis avec la solution témoin pour la seconde visite et vice versa. A la fin de l'étude nous pouvons donc considérer chaque patient comme étant son propre témoin.

- *Analyses biochimiques des échantillons plasmatiques*

La glycémie et la triglycéridémie plasmatique ont été mesurées à l'aide de kits spécifiques (Biomérieux, France). Les taux de CCK et de leptine circulant ont été déterminés à l'aide de kits EIA (Phoenix Pharmaceuticals, Allemagne).

- *Mesure de la consommation alimentaire*

Avant chacune des deux visites de cinétiques de prélèvements sanguins, chaque patient devait remplir un carnet de relevé alimentaire sur 48h. Pendant ces 4 jours de relevés, il était demandé aux sujets de garder un régime alimentaire conforme à leurs habitudes et de ne pas consommer en excès nourriture ou alcool. Les consignes données aux participants étaient de noter tous les aliments et boissons consommés en précisant bien pour chaque aliment le type d'aliments, l'assaisonnement et les ajouts éventuels, le type de cuisson et surtout la quantité consommée de ces aliments, boissons ou assaisonnements. Les carnets de relevés alimentaires ont été analysés par une diététicienne à l'aide des tables CIQUAL 2012 publiées par l'ANSES. Les quantités ingérées ont été converties en gramme à l'aide du manuel de référence SUVIMAX. Les apports en nutriments ont été analysés à l'aide du logiciel d'analyse SAS System (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA).

- *Etudes complémentaires chez la souris*

Ces expériences ont consistées à reproduire chez la souris la cinétique de prélèvement sanguin décrite précédemment. Pour commencer, des expériences dans des conditions drastiques (eau, n=4, vs LA pur, n=11) ont été mises en œuvre chez des souris sauvages à jeun depuis la veille. Les souris ont été anesthésiées avec un mélange kétamine/xylazine juste avant le début de l'expérience. Deux prélèvements préliminaires par la veine de la

queue ont été réalisés. Ensuite, lors de la stimulation orale, un dépôt de 50 μ L a été réalisé à l'aide d'une pipette, suivi de 5 allers retours effectués lentement. A la fin de la stimulation, les solutions ont été entièrement retirées de la gueule de l'animal afin d'éviter aux souris de s'étouffer. Enfin, 4 prélèvements sanguins ont été réalisés pendant 15 minutes. Les prélèvements ont été placés dans des tubes contenant de l'héparine. Tous les échantillons prélevés ont été placés sur glace puis centrifugés afin de récupérer le plasma qui a été stocké à -20°C. La triglycéridémie plasmatique a été mesurée à l'aide d'un kit spécifique (Biomérieux, France).

Dans un deuxième temps, une cinétique identique à la précédente a été réalisée en utilisant cette fois-ci les mêmes solutions que celles utilisées chez l'Homme. Dans le but d'identifier un éventuel rôle joué par CD36 dans ce phénomène, les expériences ont été menées à la fois chez des souris sauvages (n=6) et chez des souris CD36^{-/-} (n=5). La moitié des souris a eu une stimulation orale avec la solution expérimentale (LA 1%) lors de la première séance puis avec la solution témoin pour la seconde séance (les deux séances étant espacées de 2 semaines) et vice versa. A la fin de l'expérience, nous pouvons donc considérer chaque souris comme étant son propre témoin.

- Tests statistiques

Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM. La significativité des différences observées entre les groupes a été mesurée à l'aide de XLSTAT (Addinsoft, France). Nous avons d'abord vérifié la distribution normale des échantillons et l'égalité des variances puis effectué un two-tailed Student's t test. Des tests one-way ANOVA et Studen-Newman-Keuls ont été utilisés pour l'analyse des consommations alimentaires.

Projet d'article n° 1

Obesity interfere with the oro-sensory detection of long-chain fatty acids in Human

Chevrot *et al.* (2013)

***Obesity interferes with the oro-sensory detection
of long-chain fatty acids in Human***

Michael Chevrot¹, Patricia Passilly-Degrace¹, Céline Martin¹, Géraldine Enderli^{2,3,4},
Marlène Gomes^{1, 2,3,4}, Déborah Ancel¹, Isabelle Robin⁵, Sylvie Issanchou^{2,3,4}, , Bruno
Vergès⁵, Sophie Nicklaus^{2,3,4}, Philippe Besnard^{1*}.

¹ Physiologie de la Nutrition et Toxicologie (NUTox), UMR U866 INSERM/Université
de Bourgogne/AgroSup Dijon, F-21000 Dijon, France.

² CNRS, UMR6265 Centre des Sciences du Goût et de l'Alimentation, F-21000 Dijon,
France.

³ INRA, UMR1324 Centre des Sciences du Goût et de l'Alimentation, F-21000 Dijon,
France.

⁴ Université de Bourgogne, UMR Centre des Sciences du Goût et de l'Alimentation,
F-21000 Dijon, France

⁵ Physiopathologie des dyslipidémies, UMR U866 INSERM/Université de
Bourgogne/AgroSup Dijon, F-21000 Dijon, France.

Short title: **Obesity and oral fat detection**

* Correspondence to: P. Besnard, Physiologie de la Nutrition et Toxicologie (NUTox),
AgroSup Dijon, 1, Esplanade Erasme, F-21000 Dijon (France).

Tel/Fax: (+33) 380 77 40 91

e-mail: pbsnard@u-bourgogne.fr

Abstract

A recent study performed in lean subjects suggests the existence of a negative correlation between the oro-sensory perception of dietary lipids and body mass index (BMI) in Human. It was extrapolated that obesity might promote overconsumption of fatty foods by decreasing the detection of lipids in oral cavity. In this report, psychophysical and physiological approaches were used to explore this hypothesis. Linoleic acid (LA) detection threshold was determined in lean ($19 < \text{BMI} < 25$, $n=30$) and obese ($\text{BMI} > 30$, $n=29$) volunteers using a 3-alternative forced choice ascending concentration presentation procedure in conditions known to minimize visual, olfactory and textural cues. A large distribution of LA detection was found in both groups. Mean detection thresholds were 0.053% (w/v) and 0.075% (w/v) in lean and obese subjects, respectively and did not differ across groups. No relationship between LA detection threshold and BMI was observed. LA threshold failed to be obtained in 3 obese patients, 2 others detecting only the higher concentration of LA (5%) what suggests a bimodal distribution in obese group with LA-tasters and non-tasters. Whole mouth stimulation with 1% LA emulsion induced a rapid and significant rise in plasma triglyceride ([TG]pl) levels as compared to control emulsion in lean subjects. This [TG]pl up-regulation, considered as a biomarker for oral fat detection, was not retrieved in obese subjects. Altogether these data support that obesity may interfere with the orosensory detection of free fatty acids in Human.

Introduction

Growing evidence supports the existence of a gustatory component in the oro-sensory detection of dietary lipids in Human (1). It is a very sensitive detection system maintained when textural and olfactory cues are minimized in patients with a tongue desensitized with capsaicin (2, 3). Effective stimuli are free fatty acids released by lipase hydrolysis of triglycerides (TG) (4) and/or present in low levels in foodstuffs (5). The long-chain fatty acid (LCFA) membrane receptor CD36, previously identified as a reliable gustatory lipid sensor candidate in mice (6), seems also to play a significant role in Human. Indeed, CD36 is specifically found in apical side of taste buds in human gustatory papillae (7). Moreover, subjects carrying the common single nucleotide polymorphism (SNP rs1761667) in the CD36 gene, known to reduce CD36 expression (8), display a higher oleic acid detection threshold (*i.e.* a lower sensitivity) than the wild-type controls (4). Interestingly, this SNP seems also to be associated to a better acceptance of added fat and oil in food suggesting an involvement of lingual CD36 in eating behavior (9).

Oral lipid stimulation also affects peripheral parameters likely through a reflex vagal loop in Human as already described in rats (10) and mice (6). Volunteers subjected to a sham feeding with fat exhibit a rise in gastric lipase (11), ghrelin (12) and pancreatic polypeptide (PPY) (13) levels together with a decrease of gastric emptying (12). A rise in triglyceridemia is also elicited by a brief oral lipid stimulation in fasted people previously subjected to fat load with encapsulated lipids in order to avoid any oral stimulation (14, 15). It is a biphasic phenomenon with an early, but modest, peak occurring in the minutes after oral stimulation followed by a prolonged elevation of the triglyceridemia. Further experiments carried out to elucidate the mechanisms involved have demonstrated that this change is due to the release of TG from the previous meal stored in the body (16). The physiological and/or physiopathological impact of these changes remains to be elucidated.

Obesity is an actual spreading pathology in the world, associated with dramatic consequences in term of public health. It has been recently shown in children and adolescents that obesity significantly lower detection rate for umami, bitter and salty (17). Whether obesity can also lead to changes in the oro-sensory perception of dietary fat in humans appear to be a primordial way to explore. Interestingly, a

negative correlation between the oro-sensory perception of dietary lipids and body mass index (BMI) has been reported in lean subjects (18). It was extrapolated that a high BMI might impair to the detection of lipids in oral cavity. However, a direct comparison between lean and obese subjects is missing in this experiment. In this report, oral detection thresholds of linoleic acid (LA), change in triglyceridemia mediated by an oral fat stimulation and food consumption habits were compared between lean and obese subjects .

Results

Subjects

Sixty one male volunteers were included according to criteria presented in Table 1: 31 lean subjects and 30 obese subjects. However, 2 lean subjects had to be further excluded from data analysis because their measured BMI was above 25 kg/m² and 2 because they did not fully followed the protocol.

Table 1: Inclusion criteria

Lean subjects	Obese but non-diabetic subjects
<ul style="list-style-type: none"> • Men > 18 years-old • 19 < BMI < 25 kg.m⁻² • Triglyceridemia < 1.50 g.L⁻¹ • Fasted Glycemia < 6.10 mmol.L⁻¹ • No regular drugs intake 	<ul style="list-style-type: none"> • Men > 18 years-old • BMI ≥ 30 kg.m⁻² • Fasted Glycemia < 6.10 mmol.L⁻¹ • HbA1c < 6.0 % • No drugs or surgical treatment of obesity • No hypoglycemic drugs intake
<p>Non-inclusion criteria:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Smokers or former smokers (for less than 3 months) • Severe digestive pathologies • Pancreatic, renal, hepatic failures • Antecedents of pancreatic surgery • Type 1 diabetes • Treatments with inhibitors of proton pumps, insulin, GLP-1 analogs or DPP IV inhibitors 	

BMI: Body Mass Index, HbA1c: Glycated Hemoglobin.

As expected, waist circumference, fasted triglyceridemia and leptinemia were clearly higher in obese than in lean subjects (Table 2). Fasted total cholesterolemia was the same between both groups. Although fasted plasma glucose and HbA1c levels were slightly more elevated in obese patients, values remained in normal ranges supporting an absence of insulin-resistance in the obese group (Table 2).

Table 2: Clinical characteristics of the subjects

Mean (\pm SEM)	Lean (n=29)	Obese (n=30)
Age (year-old)	50.69 \pm 2.69	52.27 \pm 2.13
BMI (kg.m ⁻²)	22.76 \pm 0.37	36.45 \pm 0.99 ***
Waist circumference(m)	0.86 \pm 0.02	1.18 \pm 0.02 ***
Fasted plasma TG level (g.L ⁻¹)	0.96 \pm 0.06	2.12 \pm 0.27 ***
Fasted plasma glucose level (mmol.L ⁻¹)	4.99 \pm 0.11	5.37 \pm 0.1 *
Fasted total cholesterol level (mmol.L ⁻¹)	5.15 \pm 0.17	5.34 \pm 0.16
Fasted HbA1c (%)	5.33 \pm 0.06	5.61 \pm 0.08 *
Fasted plasma leptin level (μ g.L ⁻¹)	1.84 \pm 0.24	15.66 \pm 2.23 ***

BMI: Body Mass Index, TG: Triglycerides, HbA1c: Glycated Hemoglobin. P<0.05 (*), and P<0.001 (***).

Determination of oral sensitivity to linoleic acid

A systematic comparison of oral detection of LCFA between lean and obese subjects is lacking. To address this question, oral threshold sensitivity to LA was determined by using the 3-alternative ascending concentration procedure (ASTM, 2004). As shown in Fig. 1-A, a large distribution of LA threshold was observed in both lean and obese subjects, but both distribution did not differ from each other (two-sided Wilcoxon two-sample test, P=0.31). No significant difference in oral sensitivity between lean and obese subjects was observed (0.403 \pm 0.789% and 1.007 \pm 1.842% w/v, in lean and obese groups, respectively, P=0.11). Notably, the 5 subjects who only detected the higher concentration of LA (5%) or were unable to distinct properly between control and LA emulsion were obese people (Fig. 1-B) suggesting the existence of LA tasters and non-tasters in this group.

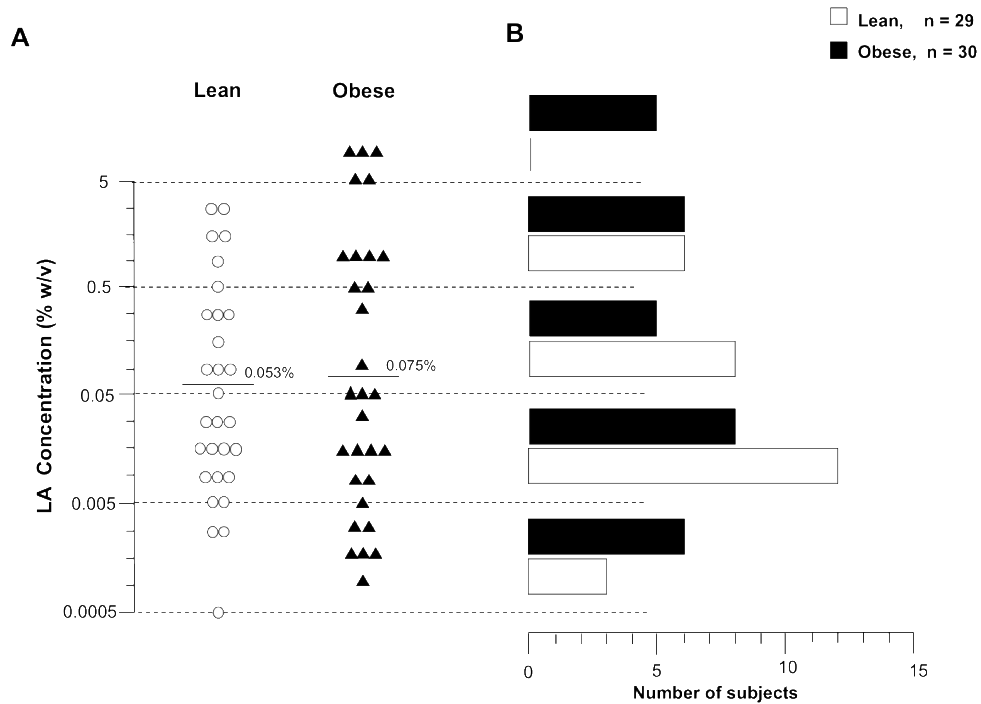


Fig. 1: LA detection threshold measurement between lean and obese subjects.

A: Results of the 3-AFC tests used to determine the LA detection threshold for each people of the lean (white circles, n=29) and obese (black triangles, n=30) group. This test was realized with solutions containing from 0.0005 to 5% of LA (w/v). Black lines represent the geometric means. tB: For each log step, the number of lean (white) and obese (black) subjects is reported in the diagram. LA: Linoleic Acid.

Plasma triglyceride response to oral lipid stimulations

Plasma changes following a sip and spit procedure using an emulsion with or without LA were explored in these subjects. After an overnight fasting period, each patient was subjected either to the control or 1% LA emulsions in randomized manner during two different sessions. Consistent to our detection thresholds, 1% LA was chosen. Therefore, 4 groups of subjects were distinguished: LA tasters whom the LA detection threshold was <1% (n = 23 and 21 in lean and obese groups, respectively) and LA non-tasters whom the LA detection threshold was >1% (n = 4 in both lean and obese groups). In lean LA tasters, the oro-sensory stimulation with 1% LA led to a progressive rise in plasma TG levels. This phenomenon occurred rapidly after oral stimulation and was specific to LA since it was not reproduced with control emulsion (Fig. 2-A). Integration of area under curves (AUC) showed a significant difference

between the two conditions (Control: 3987 ± 56 vs LA: 4233 ± 91 , $P < 0.026$). By contrast, no change in plasma TG levels were observed in obese LA tasters after oral stimulation with LA (Fig. 2-A). Comparison between lean and obese LA tasters highlighted that obesity impaired the plasma TG responsiveness to LA (Fig. 2-B). The fact that the LA-mediated rise in plasma TG levels found in lean LA taster was abrogated in lean LA non tasters brings an additive demonstration of the relationship between the orosensory detection of LA and the changes in plasma TG levels (Fig. 2-C).

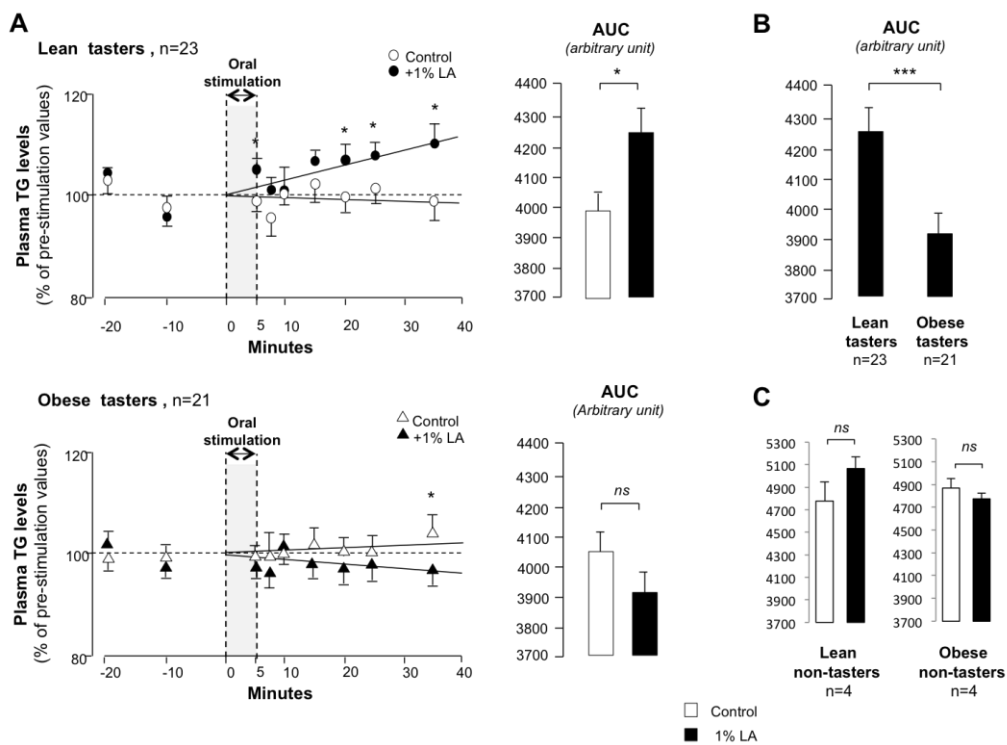


Fig. 2: LA triggered a rise in TG levels in lean but not in obese subjects.

A: Plasma TG levels measurement in lean (upper graph, n=23) and obese (lower graph, n=21) subjects blood samples. Only the taster subjects (*i. e.* with a LA detection threshold $\leq 1\%$) are represented. The kinetics of blood collection begins with 2 pre-stimulation samples and 7 samples in 35 minutes after the stimulation with a solution containing 1%LA (black) or not (white). The results are expressed in percent of pre-stimulation TG levels. Means \pm SEM. For each condition, AUC are also represented. The AUC for control stimulation are in white and those for LA stimulation are in black. AUC are represented with arbitrary units. Mean \pm SEM. B: Comparison of AUC of lean (n=23) and obese (n=21) subjects when they are stimulated with the solution containing 1% of LA. Arbitrary unit. Mean \pm SEM. C: AUC for the lean (n=4) and obese (n=4) non-taster subjects. Control conditions are represented

in white and LA conditions in black. Arbitrary unit. Mean \pm SEM. $P < 0.05$ (*), $P < 0.001$ (***), and *ns*: non-significant. LA: Linoleic Acid, TG: Triglyceride, AUC: Area Under the Curve.

This phenomenon appears to be specific to TG since other blood parameters as plasma glucose or CCK levels were unchanged secondary to an oral LA stimulation both in lean and obese subjects (Fig. 3).

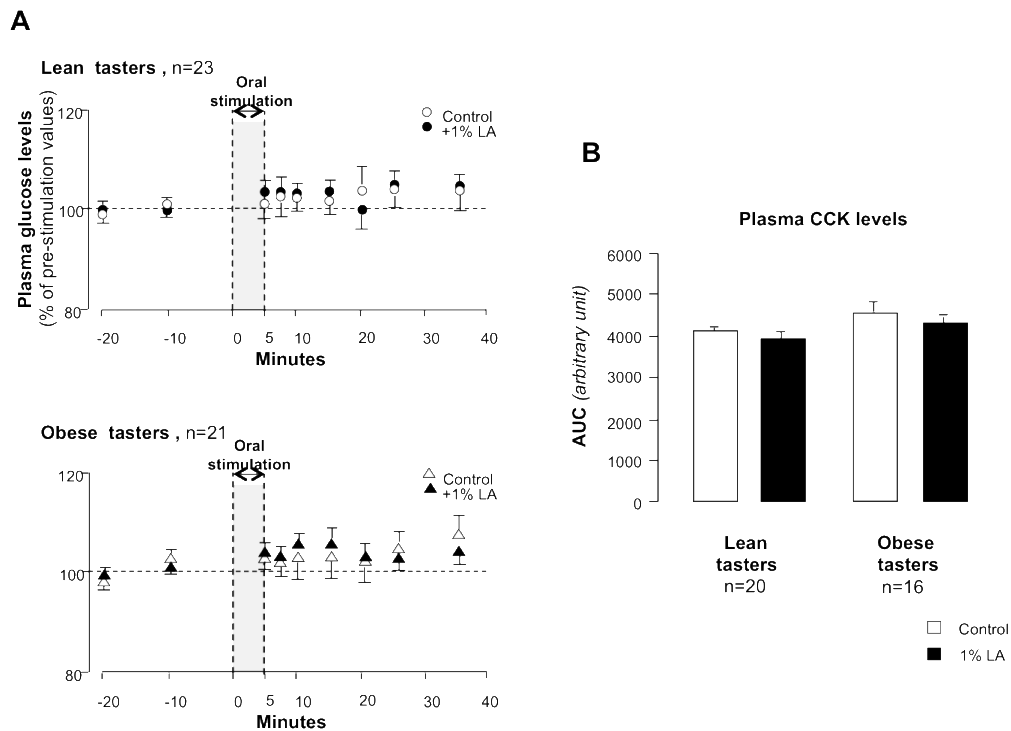


Fig. 3: No differences are observed with plasma glucose and CCK levels between lean and obese subjects when stimulated with LA.

A: Plasma glucose levels measurement in lean (upper graph, n=23) and obese (lower graph, n=21) subjects blood samples. Only the taster subjects (*i. e.* with a LA detection threshold $\leq 1\%$) are represented. The kinetics of blood collection begins with 2 pre-stimulation samples and 7 samples in 35 minutes after the stimulation with a solution containing 1%LA (black) or not (white). The results are expressed in percent of pre-stimulation TG levels. Means \pm SEM. B: AUC for the lean (n=20) and obese (n=16) taster subjects for the plasma CCK levels after oral stimulation. Control conditions are represented in white and LA conditions in black. Arbitrary unit. Mean \pm SEM.

Comparison of dietary habits in lean and obese subjects

When the 4 groups were compared, age of the subjects did not vary ($P=0.43$). BMI was similar in lean tasters and non-tasters (22.71 ± 2.00 vs. 21.99 ± 0.74 , respectively,

P=0,49) as well as in obese tasters and non-tasters (36.85±5.66 vs. 35.26±7.39, respectively, P=0.59). For each subject, food intake was reported for 4 days and was calculated by groups combining sensitivity and weight status. Intake varied across groups for some nutrients (Table 3). In particular, energy intake was higher in obese non-tasters than in the other groups (P=0.0007). This group consumed more carbohydrates (P=0.0003) and lipids (P=0.0079), especially saturated fatty acids (P=0.01). Surprisingly, obese tasters displayed lower energy intake than other groups. One cannot completely rule out the possibility that obese subjects under-reported their food intake to a larger extent than lean subjects (19–21) or under-ate during the reporting period.

Table 3: Dietary intake (mean over 24h-dietary logs from four different days) in the different groups.

			O-NT (N=5)		O-T (N=21)		L-NT (N=4)		L-T (N=25)	
	Mean ¹	P ²	Mean ³	SD	Mean ³	SD	Mean ³	SD	Mean ³	SD
Sodium (mg)	3010.1	0.02	3454.8 A	1333.6	2563.7 A	777.2	2593.4 A	781.9	3362.8 A	926.8
Magnesium (mg)	353.6	0.02	507.2 A	261.1	310.4 B	94.2	303.9 B	85.4	364.9 B	122.8
Phosphore (mg)	1243.4	0.03	1499.7 A	421.3	1101.9 A	353.3	1223.4 A	170.2	1314.2 A	252.6
Potassium (mg)	3177.7	0.07	3448.3	770.0	2845.2	823.5	3158.9	310.6	3405.9	674.3
Calcium (mg)	878.8	0.009	1193.5 A	485.9	736.0 B	247.7	834.9 B	198.4	942.8 AB	271.7
Manganese (mg)	3.2	0.73	3.2	1.6	3.1	1.7	2.6	0.6	3.4	1.5
Iron (mg)	12.4	0.12	15.2	2.3	11.3	4.0	11.1	1.9	12.9	3.5
Copper (mg)	1.8	0.67	2.0	0.8	1.8	0.9	1.5	0.6	1.9	0.5
Zinc (mg)	9.7	0.18	12.0	1.9	9.3	3.0	8.9	2.1	9.8	2.1
Selenium (mg)	96.6	0.70	48.7	27.6	185.6	694.9	24.8	2.3	42.9	20.1
Iodine (mg)	116.9	0.24	140.2	43.9	102.8	48.0	118.9	34.9	123.9	40.2
Protein (g)	84.4	0.047	101.3 A	14.5	78.2 A	20.0	78.7 A	12.2	87.2 A	15.8
Carbohydrates (g)	245.3	0.0003	291.3 A	91.6	196.0 B	58.3	262.2 A	63.6	274.8 A	58.1
Sugar (g)	89.0	0.0025	109.2 A	64.8	69.0 A	18.1	99.1 A	13.2	100.1 A	28.7
Starch (g)	112.5	0.0284	103.4 A	35.7	94.5 A	37.6	123.9 A	50.6	127.5 A	34.3
Fiber (g)	20.1	0.0047	25.1 A	8.3	16.1 B	7.3	20.2 AB	4.5	22.5 AB	5.5
Lipids (g)	78.8	0.0079	102.3 A	18.5	67.4 B	25.5	74.4 B	21.5	84.5 AB	19.3
Saturated fatty acids (g)	31.5	0.0101	42.2 A	13.3	26.8 B	10.6	29.2 B	7.6	33.8 AB	8.4
Monounsaturated fatty acids (g)	26.1	0.0572	30.7	6.2	22.5	9.1	24.8	5.4	28.4	7.7
Polyunsaturated fatty acids	10.7	0.38	13.0	4.6	9.8	3.9	10.8	4.2	11.1	3.9
Butyric acid 4:0 (g)	0.8	0.0054	1.4 A	0.6	0.7 B	0.3	0.7 B	0.2	0.9 B	0.4
Caproic acid 6:0 (g)	0.6	0.0150	0.9 A	0.4	0.5 B	0.2	0.5 B	0.1	0.6 B	0.3
Caprylic acid 8:0 (g)	0.4	0.0061	0.6 A	0.3	0.3 B	0.1	0.4 B	0.1	0.5 AB	0.2
Capric acid 10:0 (g)	0.9	0.0195	1.3 A	0.4	0.7 B	0.3	0.7 B	0.1	1.0 AB	0.5

Lauric acid 12:0 (g)	1.3	0.0090	2.2 A	1.7	1.1 B	0.5	1.1 B	0.3	1.4 B	0.5
Myristic acid 14:0 (g)	3.3	0.0137	4.7 A	1.6	2.8 B	1.2	3.0 B	0.9	3.5 AB	1.2
Palmitic acid 16:0 (g)	15.7	0.0044	20.9 A	5.6	13.2 B	4.7	15.3 AB	4.2	16.9 AB	4.2
Stearic acid 18:0 (g)	6.4	0.13	8.4	3.0	5.7	2.8	5.9	1.1	6.6	1.9
Oleic acid 18:1 9c (n-9) (g)	20.3	0.0303	25.0 A	4.8	17.4 A	6.4	19.0 A	4.6	22.0 A	6.2
Linoleic acid 18:2 9c,12c (n-6) (g)	7.1	0.5754	8.7	5.4	6.5	2.5	7.1	3.3	7.2	3.3
α -Linolenic acid 18:3 c9,c12,c15 (n-3) (g)	0.9	0.93	1.0	0.6	0.9	0.6	0.9	0.3	1.0	0.5
Arachidonic acid 20:4 5c,8c,11c,14c (n-6) (g)	0.1	0.061	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.0	0.1	0.0
EPA 20:5 5c,8c,11c,14c,17c (n-3) (g)	0.2	0.55	0.3	0.7	0.2	0.4	0.0	0.0	0.1	0.3
DHA 22:6 4c,7c,10c,13c,16c,19c (n-3) (g)	0.1	0.6254	0.1	0.3	0.2	0.3	0.0	0.0	0.1	0.2
Retinol (μ g)	538.7	0.21	347.2	142.7	429.6	649.2	1182.0	1768.5	565.7	476.7
β -Carotene (μ g)	3281.1	0.53	3820.5	1916.7	2814.6	2165.0	3132.9	1793.6	3588.7	1788.7
Vitamin D (μ g)	2.5	0.80	3.1	3.9	2.7	4.0	1.1	0.5	2.6	2.5
Vitamin E (mg)	9.8	0.035	14.5 A	7.0	7.6 A	4.1	8.8 A	3.7	10.8 A	5.5
Vitamin K (μ g)	2.9	0.72	6.0	8.3	3.5	12.0	0.4	0.4	2.3	3.8
Vitamin C (mg)	104.5	0.29	108.9	51.7	88.7	44.0	104.3	45.9	117.0	53.2
Vitamin B1 (mg)	1.2	0.0247	1.4 A	0.3	1.1 A	0.4	1.2 A	0.1	1.4 A	0.3
Vitamine B2 (mg)	1.6	0.0785	1.9	0.6	1.4	0.4	1.8	0.5	1.7	0.4
Vitamine B3 (mg)	18.5	0.59	19.2	2.9	17.5	6.0	16.7	2.1	19.4	5.6
Vitamine B5 (mg)	4.9	0.19	5.4	1.4	4.4	1.5	5.6	1.1	5.0	1.2
Vitamine B6 (mg)	1.8	0.11	2.0	0.4	1.6	0.5	1.5	0.3	1.9	0.4
Vitamine B12 (μ g)	37.9	0.34	14.0	20.2	56.4	86.4	3.8	2.2	32.6	57.5
Vitamine B9 (μ g)	310.4	0.0126	318.6 A	54.8	264.1 A	77.3	317.9 A	98.1	346.6 A	85.1
Alcohol (g)	11.7	0.10	0.7	1.5	10.4	9.9	15.8	2.5	14.4	14.3
Cholesterol (mg)	298.6	0.72	354.3	81.4	287.7	152.3	280.9	38.7	299.4	103.2
Energy (kJ)	9100.9	0.0007	10752.6 A	2376.4	7652.5 B	2108.5	9243.0 AB	1798.2	9964.6 AB	1749.0
Energy (kcal)	2169.5	0.0007	2562.6 A	563.7	1824.8 B	503.7	2203.6 AB	429.0	2375.0 AB	417.4
%Energy from lipids*	34.1	0.55	36.6	3.0	34.5	5.7	32.0	4.9	33.7	5.0
%Energy from carbohydrate*	47.2	0.0805	45.1	4.3	45.3	5.6	50.4	1.8	48.7	5.2
%Energy from protein*		0.0117	16.2 A	2.2	18.4 A	3.0	15.7 A	4.3	15.6 A	2.4

O: Obese, L: Lean, T: Taster, NT: Non-taster

1: Mean observation for the whole group (N=55)

2: P-value of the one-way ANOVA on the group effect (4 levels: O-NT, O-T, L-NT and L-T)

3: Means with the same letter are not significantly different (Student-Newman-Keuls test, P<0.05)

*Total energy is calculated without alcohol intake

Discussion

Origin of differences in the orosensory detection of lipids, fat preference and consumption remains poorly understood in Human. Recent data support an etiological role for genetics. The present study brings the demonstration that obesity can also disturb this system. We found that oral detection of LA is highly variable in lean and obese subjects. Therefore, the geometric mean of LA detection thresholds appears to be similar in both groups (0.053+ % in leans and 0.075+ % in obesese, w/v), when all data are pooled. This parameter seems to be highly reproducible between trials since our values are of the same magnitude than those obtained in lean volunteers subjected to the same protocol (2). In contrast to what suggested by others (18), such an overall analysis did not reveal a relationship between orosensory sensitivity for LA and BMI. This discrepancy might be due to the fact that a direct comparison between lean and obese subjects was lacking in the Stewart's study. By contrast, it is consistent with recent results showing that taste responses to solution of stearic acid (C18:0) did not differ by BMI status (22). Nevertheless, a more detailed analysis highlights that obesity deeply affected lipid perception in some volunteers. Indeed, the 5 subjects detecting only the higher LA concentration (5%) or insensitive to LA are obese, suggesting the existence of "LA-tasters" and "LA non-tasters" in this group in contrast to what is found in lean subjects. Origin of this dichotomy might be due to genetics (e.g. deleterious mutations in gene encoding for lipid-sensors expressed in oral cavity). For example, a gene variant (rs1761667, AA allele) decreasing the CD36 expression levels has been found to be associated with a lower sensitivity to LCFA in obese females (4). Adiposity status might be an alternative hypothesis. Indeed, waist circumference of 4 of 5 "LA-non tasters" is especially low as compared to the mean of obese group (107+3 cm, n=4 vs 120+2 cm, n= 25, P<0.03). This observation suggests that the relative insensitivity to lipids might be related to the dynamic phase of obesity. Mechanism underlying this putative association remains to be explored. Interestingly, overconsumption of lipid-rich foods was only found in these 5 "non-taster" obese individuals. Thus, the impairment of orosensory detection of LCFA induced by obesity might lead to change in fat ingestive behavior. This greater fat consumption is likely required to reach a hedonic fulfillment in individuals poorly sensitive to LCFA. Such a behavior might contribute to create a vicious circle promoting obesity.

Post-prandial rise in triglyceridemia is considered as a biomarker for oral fat detection (15). To further study the association between obesity and lipid sensing in oral cavity, plasma TG levels were assayed in overnight fasted lean and obese subjects after a brief whole mouth stimulation with a control or 1%LA emulsions, according to a randomized crossover design. Oral exposure to LA elicited a rapid TG rise in lean “tasters” (detection threshold <1% LA). In coherence with our psycho-physical study, this change was lacking in lean “non-tasters” (detection threshold >1% LA). Interestingly, obesity abrogated this early peak of TG triggered by a whole mouth stimulation with LA. This finding is consistent with a defect in oral lipid sensing in relation with obesity. Origin of this change remains to be determined. An involvement of lingual CD36 is possible since it has recently reported a decrease of CD36 expression levels in gustatory circumvallate papillae from diet-induced obese rats (23). Alternatively, obesity might affect the expression levels of GPR120 and/or the LCFA-induced signaling cascade in taste bud cells. Further experiments are required to elucidate this point.

The fact that oral lipid exposure alters the plasma TG levels has been reported by multiple trials (14–16). It is a biphasic phenomenon with in an early, but modest, increase followed by a more sustained and prolonged elevation. The early plasma TG rise observed in lean subjects is likely due to an enhanced secretion of VLDL by liver since it occurred after an overnight fasting. Implication of a cephalic phase reflex in this effect is supported by several observations. First, in overnight fasted women, oral fat stimulation induces a rapid rise in plasma pancreatic polypeptide (PPY) levels which peaks at 5min (13). Second, VLDL synthesis and release are enhanced by PPY in rat hepatocytes(24). Third, efferent vagal activation controls PPY release (25). Fourth, vagal stimulation enhances postprandial lipemia by impacting mainly the VLDL metabolism in Human (26). A dysfunction in this LA-mediated regulatory loop might exist in obese subjects since a lower PPY-responsiveness is found during obesity in Human (27).

The physiological significance of early peak of TG remains elusive. It may have a signaling role for the brain limiting, for example, the size of the meal. A better understanding of this oro-sensory detection and preference in human might lead to its manipulation in order to fight against the current obesity epidemics.

Materials and Methods

Subjects

Criteria for subject inclusion in the study are described in Table 1. The aim was to recruit 30 lean men and 30 obese men. The study was advertised through local newspapers, and at the endocrinology department of the local hospital. All subjects received detailed information about the study and gave written consent at the first visit. The study was approved by ethic Comity. All participants received financial compensation.

FA solution preparation

Linoleic acid (LA C18:2; cis-9, cis-12, Sigma Aldrich, USA) emulsions ranged in concentration from 0.00028 to 5% (w/v) and differed by 0.25 log units for psychophysical analysis (18 solutions in total) according to previous published procedures (2). Oral challenge was performed using 1% LA (w/v). All solutions were prepared daily in polypropylene labware. LA oil-in-water emulsions were prepared in a solution of 5% acacia gum (w/w, Fluka, USA), 5% mineral oil (w/w, Cooper, France), 0.01% ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) (w/w, VWR, USA) diluted in Evian® mineral water. Acacia gum and paraffin oil were added to limit viscosity and lubricity differences between control and stimuli samples. EDTA was added to prevent oxidation of linoleic acid. Samples were mixed conventionally by a Corning stirrer then homogenized using a sonicator (Misonix sonicator model S-4000, QSonica, LLC, Newton, USA) set maximal amplitude of ultrasonic vibrations. Duration of sonication was adapted to LA concentrations. Sonication duration was 1min45 for LA solutions and 3min30 for the control solution. In all cases sonication was conducted by lapses of 30 sec separated by 1 min pause.

Sonication was conducted in a hermetic chamber saturated in nitrogen and beakers were cooled using ice bath to limit the formation of oxidized compounds during preparation. Samples homogeneity was checked by particle size analysis (Mastersizer 2000, Malvern Instrument, UK) and revealed that the distribution of fat droplets did not differ across LA concentration range. To check that the sample preparation did not lead to oxidation of fatty acid, a 5 % LA emulsion was analyzed by solid phase microextraction headspace gaz chromatography 60 hours after sonication. Comparison of chromatograms of the pure LA compound and of the 5%

LA emulsion revealed no major differences on the oxidation-related volatiles. All samples were prepared the day before the session, were stored in propylene light-protected sealed bottles, under nitrogen and at 4°C.

LA threshold determination

The threshold determination was conducted in the sensory evaluation rooms at the Centre des Sciences du Goût et de l'Alimentation (GSGA) at the second visit. Subjects were installed in an air-conditioned room ($21\pm 1^\circ\text{C}$) in individual sensory booth. Participants were asked to refrain from consuming food or beverages, and using oral care products at least two hours before the session. The methodology was based on previous work described by (2). Thresholds were determined using the three-alternative forced-choice (3-AFC) procedure, in which participants were provided with successive sets of three samples. Each set contained two control samples and one stimuli sample. Within each set, participants had to indicate which sample was different from the two others. Sets were presented in an ascending concentration which means participants began evaluating the set containing the stimuli sample with the lowest LA concentration towards the highest concentration. When the participant could not identify the stimuli sample, the LA concentration was increased for the following set. When the participant correctly identified the stimuli sample, a second set at the same LA concentration was provided. This procedure stopped when the participant identified correctly the stimuli sample at a given concentration three consecutive times. This concentration represented the threshold value of the participant.

Samples were presented as 5 ml portions in opaque cups, and were tested at room temperature. Subjects were instructed to hold the 5 ml solution in their mouth for 7 seconds, then to spit the solution out, and to wait for 20 seconds before tasting the next sample. The interval between two sets was 60 to 120 seconds, during which participants were asked to rinse their mouth with water heated to 50°C . Testing was conducted under red lighting and with participants wearing nose-clip to limit respectively visual and olfactory inputs. In order to verify the ability of participants to comply with the tasting protocol, exercises were done before the threshold

measurement. Two exercise sets were performed with water samples and one exercise with the test samples.

Blood sampling

Blood samples were drawn during the third and fourth visit at the University Hospital. During these sessions, the subjects had a catheter in a vein of their arm, and wore a nose clip to avoid olfaction. A kinetic of blood collection was carried out for each patient. First two-preliminary blood collections were realized. Then, for the oral stimulation, the patient had to sip and spit 5 times in a row the solutions containing or not the LA (1%). After that 7 blood samples were collected in 35 minutes. Each collection was realized into a vacutainer containing EDTA. All samples were placed on ice and spun in a refrigerated centrifuge. Plasmas were then aliquoted and stored at -20°C. Half of the patients had the control solution for their first session and the LA solution for the second visit and vice versa for the second half. At the end of the study, each patient could be considered as his own control.

Biochemical analysis

Plasma glucose and triglycerides levels were assayed using specific kits (Biomérieux, France). Plasma CCK and leptin levels were determined using EIA kits (Phoenix Pharmaceuticals, Germany).

Dietary intake determination

At each visit for blood sampling, subjects had to report their food intake during the two previous days by filling out two consecutive 24-h food consumption diaries. During these four days participants had to maintain their normal eating pattern and to avoid food or alcohol excess. They were asked by the dietician to record all foods and drinks consumed, by being as precise as possible when reporting the type of food or drink consumed (e.g. skimmed milk or full-fat milk); by specifying seasoning or additions made to food (e.g. sugar, butter, oil, sauce...), the type of cooking applied (e.g. baking, steaming, frying...) and the amounts of all foods, drinks and seasoning consumed.

Dietary records were analyzed by a registered dietician. The CIQUAL 2012 table, published by ANSES and relevant for foods consumed in France was used to access nutritional composition of foods (<http://www.anses.fr/TableCIQUAL/index.htm>). This database includes details about fatty acid content in foods. When needed, this database was implemented with new foods, calculating the nutritional composition using food data from the database and standard recipes and when it was not possible, using manufacturer information. Ingested amount were converted into grams using reference amount from a commonly used French reference “*Manuel Photos pour l'estimation des quantités mis au point pour l'étude SUVIMAX*”. Nutrient intakes were analysed using The SAS System for Windows version 9.1 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA).

Statistical analyses

Results are expressed as Means \pm SEM. The significance of differences between groups was evaluated with XLSTAT (Addinsoft, France). We first checked that the data for each group were normally distributed and that the variances were equal. We then carried out two-tailed Student's t test. One-way ANOVA and Student-Newman-Keuls test were used in dietary intake analyses.

Acknowledgments

This work was supported by the Burgundy Council and Centre National Interprofessionnel de l'Economie Laitière (CNIEL) (HumanFATaste program to P.B.). M.C. is a PhD fellow of HumanFATaste program.

References

1. Mattes RD (2011) Accumulating evidence supports a taste component for free fatty acids in humans. *Physiol Behav* 104:624–631.
2. Chalé-Rush A, Burgess JR, Mattes RD (2007) Evidence for human orosensory (taste?) sensitivity to free fatty acids. *Chem Senses* 32:423–431.
3. Mattes RD (2009) Oral detection of short-, medium-, and long-chain free fatty acids in humans. *Chem Senses* 34:145–150.
4. 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.
5. Stewart JE, Feinle-Bisset C, Keast RSJ (2011) Fatty acid detection during food consumption and digestion: Associations with ingestive behavior and obesity. *Prog Lipid Res* 50:225–233.
6. Laugerette F et al. (2005) CD36 involvement in orosensory detection of dietary lipids, spontaneous fat preference, and digestive secretions. *J Clin Invest* 115:3177–3184.
7. Simons PJ, Kummer JA, Luiken JJFP, Boon L (2011) Apical CD36 immunolocalization in human and porcine taste buds from circumvallate and foliate papillae. *Acta Histochem* 113:839–843.
8. Love-Gregory L et al. (2011) Common CD36 SNPs reduce protein expression and may contribute to a protective atherogenic profile. *Hum Mol Genet* 20:193–201.
9. Keller KL et al. (2012) Common variants in the CD36 gene are associated with oral fat perception, fat preferences, and obesity in African Americans. *Obesity (Silver Spring)* 20:1066–1073.
10. Hiraoka T, Fukuwatari T, Imaizumi M, Fushiki T (2003) Effects of oral stimulation with fats on the cephalic phase of pancreatic enzyme secretion in esophagostomized rats. *Physiol Behav* 79:713–717.

11. Wøjdemann M, Olsen O, Nørregaard P, Sternby B, Rehfeld JF (1997) Gastric lipase secretion after sham feeding and cholinergic blockade. *Dig Dis Sci* 42:1070–1075.
12. Heath RB, Jones R, Frayn KN, Robertson MD (2004) Vagal stimulation exaggerates the inhibitory ghrelin response to oral fat in humans. *J Endocrinol* 180:273–281.
13. Crystal SR, Teff KL (2006) Tasting fat: cephalic phase hormonal responses and food intake in restrained and unrestrained eaters. *Physiol Behav* 89:213–220.
14. Mattes RD (1996) Oral fat exposure alters postprandial lipid metabolism in humans. *Am J Clin Nutr* 63:911–917.
15. Mattes RD (2009) Brief oral stimulation, but especially oral fat exposure, elevates serum triglycerides in humans. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 296:G365–371.
16. Chavez-Jauregui RN, Mattes RD, Parks EJ (2010) Dynamics of fat absorption and effect of sham feeding on postprandial lipemia. *Gastroenterology* 139:1538–1548.
17. Overberg J, Hummel T, Krude H, Wiegand S (2012) Differences in taste sensitivity between obese and non-obese children and adolescents. *Arch Dis Child* 97:1048–1052.
18. Stewart JE et al. (2010) Oral sensitivity to fatty acids, food consumption and BMI in human subjects. *Br J Nutr* 104:145–152.
19. McGowan MJ et al. (2001) An evaluation of energy intakes and the ratio of energy intake to estimated basal metabolic rate (EI/BMR_{rest}) in the North/South Ireland Food Consumption Survey. *Public Health Nutr* 4:1043–1050.
20. Pikholtz C, Swinburn B, Metcalf P (2004) Under-reporting of energy intake in the 1997 National Nutrition Survey. *N Z Med J* 117:U1079.
21. Livingstone MBE, Black AE (2003) Markers of the validity of reported energy intake. *J Nutr* 133 Suppl 3:895S–920S.
22. Mattes RD (2011) Oral fatty acid signaling and intestinal lipid processing: support and supposition. *Physiol Behav* 105:27–35.
23. Zhang X-J et al. (2011) Decreased expression of CD36 in circumvallate taste buds of high-fat diet induced obese rats. *Acta Histochem* 113:663–667.
24. Wolfe BM (1992) Effects of gastro-entéro-pancreatic hormones upon triglyceride synthesis and secretion by rat hepatocytes. *Clin Invest Med* 15:30–41.
25. Schwartz TW et al. (1978) Vagal, cholinergic regulation of pancreatic polypeptide secretion. *J Clin Invest* 61:781–789.

26. Robertson MD, Mason AO, Frayn KN (2002) Timing of vagal stimulation affects postprandial lipid metabolism in humans. *Am J Clin Nutr* 76:71–77.
27. Lassmann V, Cabrerizzo Garcia L, Vialettes B, Vague P (1985) Impaired pancreatic polypeptide response to insulin hypoglycemia in obese subjects. *Horm Metab Res* 17:663–666.

Discussion

Les résultats obtenus confirment l'existence d'une détection orale des AGLC chez l'Homme. La moyenne géométrique des seuils de détection du LA mesurés chez le groupe de personnes de poids normal est de 0.065% (m/m). D'autres études récentes ont également abouti à des résultats très similaires. En effet, l'équipe de R. Mattes, dont le protocole a été reproduit dans notre projet, a obtenu une moyenne des seuils de perception du LA de l'ordre de 0.034%, dans la population considérée (IMC<30) (Chalé-Rush, Burgess, and Mattes 2007). De plus, Stewart et ses collaborateurs, qui ont mis en œuvre le même type de protocole, ont trouvé une moyenne des seuils de perception de leur population à 0.042%, sur des sujets dont l'IMC est inférieur à 30 (IMC moyen : 22.8 ± 0.8) (Jessica E Stewart et al. 2010). Ainsi, de manière globale, ces trois résultats sont cohérents entre eux et permettent de conclure qu'il existe bien une détection orale pour le LA chez l'Homme, dont le seuil de détection se situe vers 0.05%. En revanche, la comparaison des seuils de détection pour le LA mesurés dans notre étude n'a pas permis de mettre en évidence une différence entre les sujets minces et obèses. En effet, dans les deux populations, une grande dispersion interindividuelle est systématiquement retrouvée. Nos résultats ne confirment pas ceux de Stewart et ses collaborateurs qui rapportent une corrélation inverse entre les seuils de détection des AGLC et l'IMC chez l'Homme (Jessica E Stewart et al. 2010). Cependant, si l'on s'intéresse de plus près à la cohorte de cet article, on s'aperçoit qu'il n'y a pas de comparaison de deux populations différentes puisque l'IMC moyen des sujets est de 21.1 ± 0.5 avec un seul sujet obèse. De plus, la différence de seuils de détection entre les sujets est plus que modeste. Dans une revue récente de R. Mattes, des résultats obtenus chez des cohortes de sujets minces, en surpoids ou obèses ne montrent pas de différence de seuils de détection pour l'acide stéarique en fonction de l'IMC (Richard D Mattes 2011b). En conclusion, contrairement à ce qui est couramment repris dans la littérature, l'obésité ne modifie pas le seuil de détection des AGLC chez l'Homme.

Ces résultats n'excluent pas pour autant l'existence d'une interférence possible entre l'obésité et la gustation. En effet, des études montrent que la chirurgie bariatrique, couramment utilisée chez le sujet atteint d'une obésité massive, est à l'origine de changements de la préférence pour les aliments (Miras et al. 2012), avec notamment une diminution de la préférence pour des aliments riches en lipides et glucides. De plus, une

étude réalisée chez des adolescents obèses indique des perturbations de détection chez ces sujets pour les saveurs sucrée, salée, amère, acide et *umami*. D'une manière intéressante, nous avons constaté dans notre étude qu'un groupe de 5 sujets se détachait de la cohorte de sujets obèses en présentant une perturbation de la lipido-détection orale du LA. En effet, ces sujets, qualifiés de non-tasters pour le LA, ne parviennent pas ou peu à discriminer une solution contenant 5% de LA lors des tests de seuils de détection. Ainsi, l'obésité pourrait dans certains cas interférer avec la détection oro-sensorielle des AGLC chez l'Homme et provoquer une augmentation de la consommation alimentaire en lipides. Comment peut-on expliquer cette perturbation de la détection des AGLC chez ces sujets particuliers ?

Il est possible que cette perturbation de la détection du LA s'explique par des mutations au niveau de gènes tels que CD36 ou GPR120. En effet, une étude récente a montré qu'un variant commun de CD36 (la mutation rs1761667, dans le promoteur du gène) était responsable d'une augmentation des seuils de détection (c'est-à-dire une diminution de la sensibilité) de l'acide oléique chez les sujets porteurs (Pepino et al. 2012). Dans cet article, des mesures de seuils de détection de l'acide oléique ont été réalisées sur des sujets « normaux », portant l'allèle GG, avec un niveau de CD36 normal et des sujets portant l'allèle AA, chez qui l'expression de CD36 est fortement diminuée, associée à une diminution de la sensibilité pour le OLA (**Figure 31**). Les sujets hétérozygotes AG possèdent, quant à eux, un niveau intermédiaire d'expression de CD36 et une sensibilité très peu affectée.

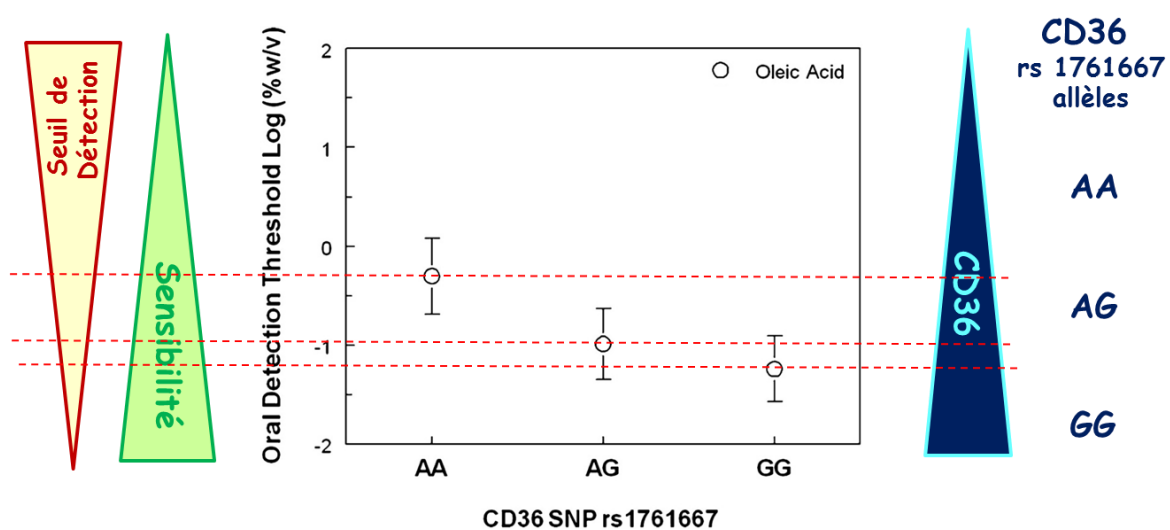


Figure 31 : Mesure de seuils de détection de l'acide oléique chez des sujets présentant un polymorphisme de CD36

(Source : P. Besnard, d'après (Pepino et al. 2012))

Il existe donc un lien entre CD36 et la perception des AGLC chez l'Homme. De plus, il a été suggéré une augmentation de la consommation de lipides chez des sujets porteurs d'une autre mutation de CD36 (rs3840546), associée également à une augmentation de leur adiposité (Keller et al. 2012). Ainsi, des mutations du lipido-récepteur CD36 chez l'Homme pourraient être à l'origine d'une perturbation de la lipido-réception orale associée à une surconsommation d'aliments riches en lipides et donc à une survenue de l'obésité. Seulement, ces résultats sont à interpréter avec précaution. En effet, selon le *single-nucleotide polymorphism* (SNP) de CD36 considéré, les relations connues entre les perturbations de la détection des lipides dans l'alimentation, leur consommation et l'adiposité ne sont pas systématiques (Keller et al. 2012). De plus, des études génétiques de grande ampleur ont permis de mettre en évidence (Bokor et al. 2010), ou non (Choquet et al. 2011), un lien entre 4 SNP de CD36 (rs3211867, rs3211883, rs3211908, et rs1527483) et l'obésité, indiquant qu'il y a également de grandes variations en fonction des populations considérées. La littérature concernant les mutations du récepteur GPR120 est beaucoup moins étoffée. Une étude récente a mis en évidence l'existence d'une mutation délétère non synonyme affectant le codon 270 (R270H) du GPR120, inhibant ainsi toute activité de signalisation de la protéine. Il a été démontré que cette mutation est associée à une augmentation du risque d'obésité chez la population européenne (Ichimura et al. 2012). Ainsi, des mutations de CD36, mais également de GPR120 chez l'Homme, sont à l'origine de l'apparition de cas d'obésité. Des études sont actuellement en cours au Laboratoire pour explorer si des sujets de nos cohortes sont porteurs de ces mutations.

Outres les causes génétiques, une autre hypothèse pourrait être émise pour expliquer la perturbation de la lipido-détection orale chez nos sujets non-tasters : il y aurait, chez ces personnes, une phase d'installation dynamique de l'obésité. En effet, 4 de ces 5 sujets présentent un périmètre abdominal et un IMC parmi les plus faibles au sein du groupe des sujets obèses. De manière intéressante, ces sujets déclarent consommer beaucoup plus d'aliments denses en énergie (Energie (kcal) : 2562.6 ± 563.7 vs 1824.8 ± 503 $p < 0.05$; Lipides (g) : 102.3 ± 18.5 vs 67.4 ± 25.5 $p < 0.05$) et notamment beaucoup plus d'aliments riches en acides gras saturés (AGS (g) : 42.2 ± 13.3 vs 26.8 ± 10.6 $p < 0.05$) comparé au reste des sujets obèses. Ainsi, on pourrait imaginer que ces sujets sont en pleine période d'installation de leur obésité, avec pour conséquence une consommation accrue de lipides alimentaires

conduisant à une diminution de leur sensibilité au AGLC. Ainsi, bien plus que l'obésité, cette hypothèse suggère que c'est une consommation excessive de lipides alimentaires qui pourrait être responsable des perturbations de la détection orale des lipides alimentaires observées chez certains sujets humains.

Enfin, il ne faut pas négliger les limites de la méthode utilisée pour la mesure des seuils de détection du LA. D'autres méthodes alternatives à la méthode 3-AFC ascendante, telles que la méthode de mesure par encadrement du seuil de détection du LA aurait pu être utilisée. Cependant, aussi bien l'une ou l'autre des méthodes possèdent le même biais, propre aux méthodes psycho-physiques, à savoir que celles-ci reposent sur des déclarations des sujets, qui peuvent être plus ou moins influencés par l'expérimentateur, l'expérience etc....

Ainsi, pour s'affranchir de ces biais dus à l'approche psycho-physique (c'est-à-dire la détermination des seuils de détection) mise en place, une approche physiologique nécessitant une étude clinique a été réalisée en parallèle. Pour cet étude, des cinétiques de prélèvements sanguins chez les sujets ont été réalisées suite à une stimulation orale avec une solution témoin ou une solution expérimentale contenant 1% de LA. Tous les sujets ont participé deux fois à la cinétique, une fois avec la solution contrôle et la deuxième avec la solution expérimentale, et ceci de manière aléatoire de telle sorte que chaque sujet est son propre témoin. Les résultats inédits que nous avons obtenus indiquent une augmentation du taux de TG circulants chez les sujets minces lorsqu'ils sont stimulés avec la solution contenant le LA. Cette augmentation est rapide puisqu'elle intervient dans les 5 minutes qui suivent la mise en bouche de la solution contenant le LA. R. Mattes et ses collaborateurs ont été les premiers à mettre en évidence l'existence d'un lien entre la présence d'AGLC dans la cavité buccale et des variations de la triglycéridémie (R D Mattes 1996). On considère aujourd'hui que ce phénomène est un bon marqueur biologique de la sensibilité oro-sensorielle aux lipides. Dans ce contexte, il est notable que ce phénomène ne soit pas reproduit chez les sujets obèses préalablement identifiés comme étant capables de détecter 1% de LA lors des mesures de seuils. Cette observation suggère pourtant qu'il existe une perturbation du système de détection chez les sujets obèses. A première vue, nos résultats obtenus avec les approches de psycho-physique ou de physiologie semblent contradictoires entre eux, sauf pour certains sujets. En effet, on conclut, d'une part, que l'obésité ne

perturbe pas les seuils de détection aux AGLC et, d'autre part, que l'obésité inhibe la sécrétion de TG plasmatiques suite à une stimulation orale avec le LA. Comment peut-on expliquer cette différence ? L'hypothèse que nous avançons est l'existence d'un double système de signalisation. En effet, on pourrait imaginer un différentiel de sensibilité aux AGLC entre les deux conséquences physiologiques observées avec les méthodes utilisées dans notre étude. Tout d'abord, la mesure de la variation de TG plasmatiques suite à une stimulation orale serait une méthode plus sensible à des perturbations du système de détection orale des lipides. Il s'agit en effet d'un arc réflexe (on parle de boucle céphalique) dont le message transite par le NTS pour ensuite rejoindre directement la périphérie *via* la voie vagale efférente. Une modification minimale du signal cellulaire dans les cellules gustatives chez les sujets obèses aurait alors des conséquences directes sur les sécrétions de TG. En revanche, dans cette même logique, une modification de la signalisation cellulaire chez les obèses, qui conduit également à une diminution du signal, pourrait être compensée, lors des tests de mesure de seuils de détection des AGLC, par des influences extérieures (dus au stress, aux consignes, à l'expérimentateur) intégrées au niveau central lors des projections du signal du NTS vers le cortex. Ces renforcements du signal pourraient alors être à l'origine d'une atténuation des différences individuelles, justifiant ainsi les résultats différents observés entre les approches (**Figure 32**).

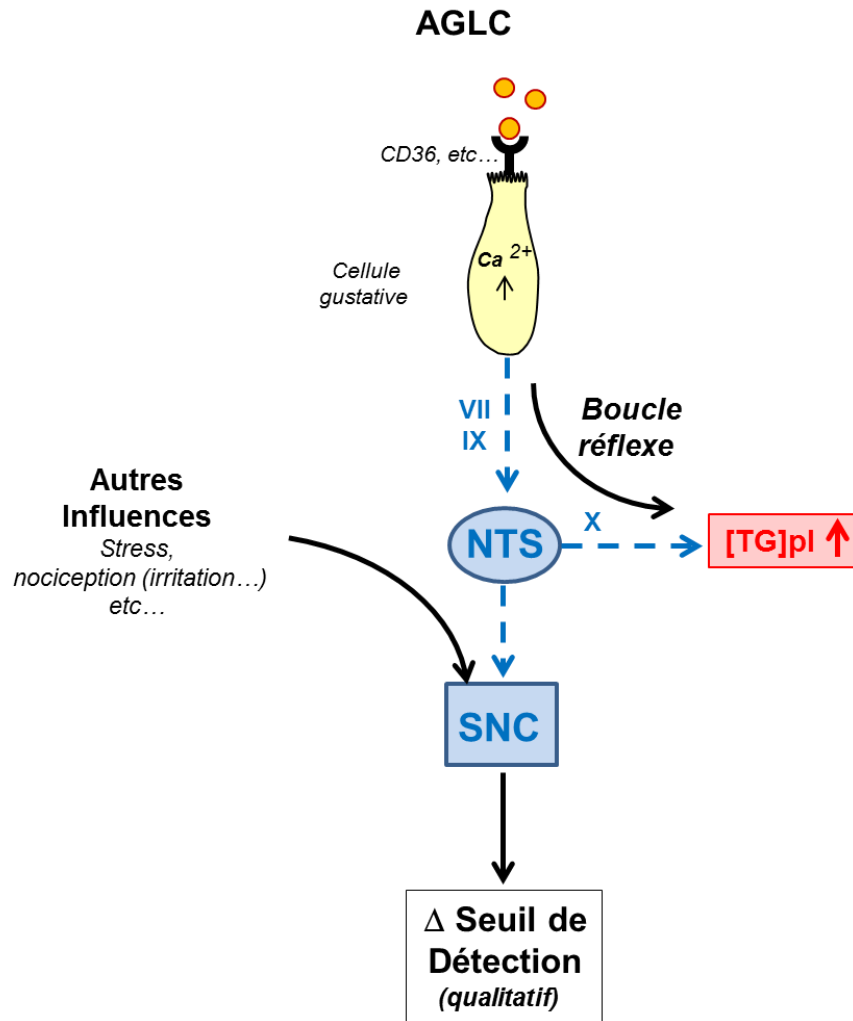


Figure 32 : Représentation schématique des résultats obtenus chez l'Homme.
 VII, IX, X : nerfs craniens ; TG : triglycérides ; NTS : Noyau du Tractus Solitaire ; SNC : Système Nerveux Central.
 (Source : P. Besnard)

Afin d'approfondir nos connaissances sur les mécanismes impliqués dans la détection orale des lipides alimentaires, des études sur le rôle de CD36 dans la sécrétion de TG plasmatiques suite à une stimulation orale avec des lipides ont été conduites chez la souris.

La première étape a consisté à vérifier l'existence de ce phénomène chez la souris. Pour cela, des expériences dans des conditions drastiques ont été mises en œuvre. Ainsi, une cinétique de dosage des TG plasmatiques a été réalisée chez des souris à jeun après un dépôt lingual avec du LA pur ou d'eau pour la condition témoin. Les résultats montrent une augmentation des sécrétions de TG à partir de 10 minutes suite à une stimulation avec du LA pur mais également en terme d'AUC, comparer au groupe contrôle (**Figure 33**).

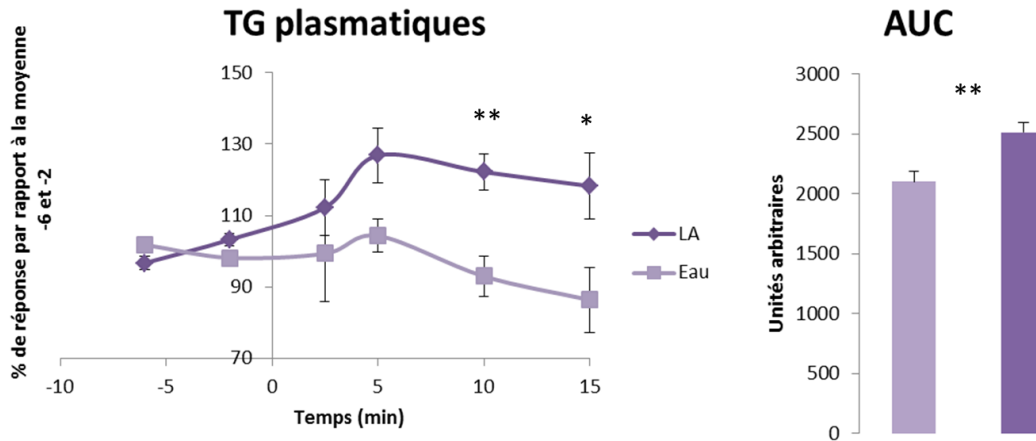


Figure 33 : Cinétique de dosage des TG plasmatiques suite à un dépôt d'eau (n=4) ou de LA pur (n=11) chez la souris.

TG : triglycérides ; AUC : aire sous courbe (*Area Under the Curve*) ; LA : acide linoléique.

(*) p<0.05 ; (**) p<0.01

Comme chez l'Homme, on observe donc chez la souris un effet de la détection orale des lipides sur les sécrétions de TG, ce qui confirme l'existence d'un lien étroit entre la détection orale des AGLC et la régulation de la triglycéridémie. En revanche, ces résultats ne reflètent pas exactement ce qui a été réalisé dans le protocole clinique. Ainsi, dans un souci de comparaison, une cinétique identique à la précédente mais réalisée cette fois-ci en testant exactement les mêmes solutions que celles utilisées chez l'Homme a été conduite chez la souris. De plus, dans le but d'identifier un éventuel rôle joué par CD36 dans ce phénomène, les expériences ont été menées à la fois chez des souris sauvages et chez des souris CD36^{-/-} (**Figure 34**). Les résultats obtenus, même s'ils ne sont pas significatifs d'un point de vue statistique (probablement en raison du faible nombre d'animaux étudiés), suggèrent une augmentation de la concentration plasmatique en TG chez la souris sauvage suite à une stimulation orale avec une solution contenant 1% de LA. Il est intéressant de noter que lorsque les mêmes conditions sont appliquées à des souris CD36^{-/-}, nous n'observons pas de différences entre les souris stimulées avec une solution témoin ou une solution contenant 1% de LA.

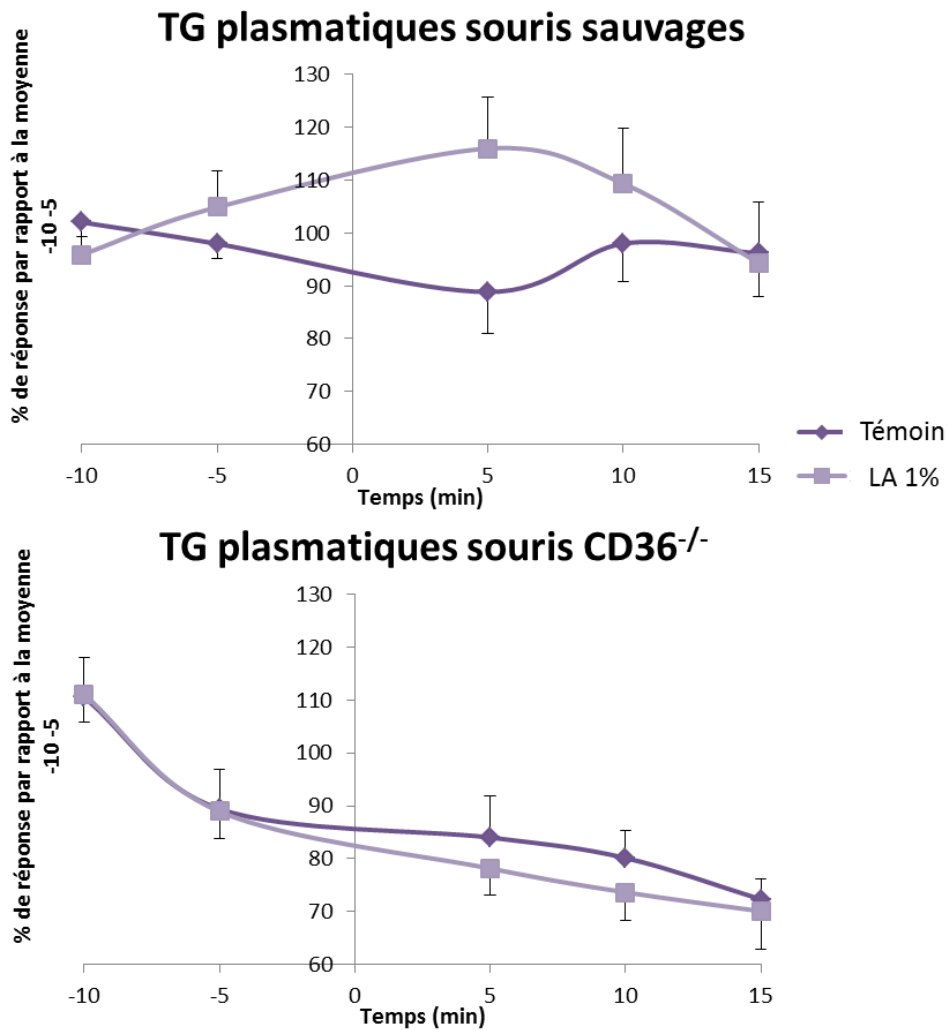


Figure 34 : Cinétique de dosage des TG plasmatiques suite à un dépôt de solution contenant, ou non 1% de LA chez la souris sauvage (n=6) et CD36^{-/-} (n=5).
TG : triglycérides ; LA : acide linoléique.

Ainsi, ces données chez la souris suggèrent très fortement l'existence de sécrétions de TG dans le sang suite à une stimulation orale avec du LA. Des expériences menées chez des souris CD36^{-/-} permettent d'envisager un rôle de ce lipido-récepteur dans ce mécanisme. En revanche, aucune donnée sur des souris rendues obèses suite à un régime obésogène n'existe à l'heure actuelle, mais des expériences sont en cours au Laboratoire.

En conclusion, les données obtenues chez l'Homme indiquent que l'obésité est à l'origine de perturbations de la lipido-détection orale. Des expériences de mesures de seuils de détection pour le LA ont permis de montrer, malgré une grande variabilité interindividuelle, que certains sujets obèses présentaient une perte de sensibilité au LA. De

plus, les variations de TG plasmatiques, observées chez les sujets minces suite à une stimulation orale avec le LA, ne sont plus observées en cas d'obésité. Des expériences complémentaires chez la souris suggèrent très fortement que le récepteur membranaire CD36 est impliqué dans ce phénomène. Il serait intéressant, pour identifier le rôle éventuel joué par CD36 dans la détection orale des lipides chez l'Homme et plus particulièrement sur la sécrétion de TG plasmatiques, de réaliser les mêmes expérimentations sur des sujets porteurs de mutations de CD36.

II. Quel est l'impact de l'obésité induite par le régime alimentaire sur la détection gustative des lipides chez la souris ?

Afin d'approfondir les données obtenues chez l'Homme sur l'impact de l'obésité sur la détection orale des lipides alimentaires, des expériences ont été réalisées sur des souris rendues obèses par leur régime alimentaire. Dans ce but, deux régimes obésogènes différents ont été utilisés. Ces deux régimes ont une composition très proche en lipides (majoritairement saturés), un des deux contenant en plus du saccharose. La comparaison de l'effet de ces deux régimes chez la souris permettra de différencier, si nécessaire, l'effet calorique en tant que tel de l'effet propre des lipides saturés sur la détection orale des lipides alimentaires. Dans un premier temps, un suivi des données physiologiques a été réalisé au cours des 2 régimes alimentaires, puis lorsque les souris sont devenues obèses, des tests de comportements alimentaires, des analyses par western-blot, et de signalisation calcique ont été réalisés. Enfin, dans une restriction alimentaire a été imposée aux souris obèses afin d'étudier la réversibilité du phénomène. Ces expériences ont été menées dans le but de répondre aux questions suivantes :

- Des souris présentant une obésité induite ont-elles des modifications au niveau de leur préférence pour les lipides ? La dimension gustative est-elle impliquée ?
- Une obésité induite par un changement d'alimentation peut-elle perturber la dynamique cellulaire de CD36 observée précédemment chez des souris renourries après un jeûne (Chapitre V-4) ?
- Une induction de l'obésité est-elle à l'origine d'un dysfonctionnement dans la signalisation calcique des cellules gustatives ?
- Ces effets sont-ils réversibles ?

Les résultats de ces expérimentations ont fait l'objet d'un article accepté dans la revue « Journal of Lipid Research » en 2013.

Matériels et méthodes

Les différentes méthodes utilisées chez la souris sont détaillées ci-après :

- Ethique

Les recommandations pour l'utilisation et l'élevage d'animaux de laboratoire ont été respectées et les protocoles d'expérimentations ont été approuvés par le comité d'éthique en expérimentation animale de l'Université de Bourgogne.

- Animaux

Des souris C57Bl/6 mâles de six semaines achetées chez Charles River Laboratories ont été cagées dans des cages filtrées et dans un environnement contrôlé (température et humidité constantes, période de nuit de 19h à 7h), avec un accès à volonté à la nourriture et à l'eau. Après une période d'acclimatation de 1 semaine, les souris ont été nourries soit avec un régime standard (4RF21, Mucedola, Italie ; contenant 3 % de lipides, m/m) soit deux régimes obésogènes (**Tableau 6**). Des durées de régimes de 23 semaines (long-terme) et 4 semaines (court-terme) ont été appliquées. La masse corporelle des animaux ainsi que leur consommation alimentaire ont été mesurées chaque semaine. La composition corporelle des animaux (masse grasse, masse maigre et eau totale) a été mesurée par EchoMRI (Echo Medical Systems, Houston, Texas, USA) à la fin de l'expérience. Les animaux anesthésiés ont été sacrifiés par dislocation cervicale. Un prélèvement sanguin et une dissection des papilles caliciformes (selon la technique développée par Laugerette et al. 2005) ont été réalisés.

% (m/m)	HF		HFHS	
	Contrôle	HF	Contrôle	HFHS
Protides	19	15	19	26
Glucides	54	34	63	-
dont sucrose	-	-	-	26
Lipides	3	34	7	35
Energie totale (kcal/100g)	315	506	387	523

Tableau 6 : Tableau de composition des régimes obésogènes utilisés

HF : High Fat ; HFHS : High Fat High Sucrose

Afin d'étudier la réversibilité du phénomène, certaines souris obèses nourrit avec le régime HF ont subis une restriction calorique (=60% de l'énergie consommée *ad libitum*). La masse corporelle de ces animaux en restriction alimentaire a été mesurée chaque semaine. La composition corporelle des animaux (masse grasse, masse maigre et eau totale) a été déterminée par EchoMRI.

- Paramètres sanguins

Les plasmas ont été obtenus après centrifugation du sang à 5000g pendant 10min. La glycémie et la triglycéridémie plasmatiques ont été mesurées à l'aide de kits spécifiques (Biomérieux, France). Le taux plasmatique d'insuline a été mesuré par EIA (Mercodia, Suède).

- Comportement animal

La préférence des animaux pour les lipides alimentaires a été mesurée à long-terme (12h) à l'aide du double choix long-terme (en cage traditionnelle) (**Tableau 3**). Lors de ce test, les souris doivent faire un choix de consommation entre la solution témoin et la solution expérimentale. Pendant la période de nuit, deux biberons sont proposés à la souris : le biberon témoin ou le biberon test. Les deux contiennent une solution à 0.3% (m/v) de gomme de xanthane (Sigma-Aldrich, USA) homogénéisée dans l'eau dans laquelle on ajoute de 0.02 à 2% (m/v) d'huile de colza (Lesieur, France) pour la solution expérimentale. La gomme de xanthane est utilisée pour émulsifier l'huile et pour minimiser les différences de texture entre les deux solutions. Afin d'éviter le développement de préférence positionnelle, la position des biberons dans la cage est inversée à chaque test. A la fin du test, la consommation de chaque souris est déterminée par pesée et la préférence pour la solution expérimentale est déterminée en calculant le ratio entre la consommation en solution expérimentale et la consommation totale (en g).

Des tests de préférence ont également été réalisés à court-terme (1-5 min) à l'aide de la méthode appelée « licking test ». Ce test consiste à présenter à la souris la solution contrôle et la solution expérimentale successivement et de déterminer le nombre de coups de langue donnés sur chacun des biberons à l'aide de lickomètres de contact (Med Associates, USA). Les souris ont été mises à jeun de nourriture et d'eau 6h avant le début du test. Le test se

déroule 6h après le début de la période de nuit. Après une période d'entraînement, requise pour l'apprentissage du test, les souris ont été soumises de manière aléatoire soit à un biberon contenant la solution contrôle (Huile de paraffine, Cooper, France), soit à un biberon contenant la solution expérimentale (Huile de paraffine + 0.5% d'acide oléique (OLA), Sigma-Aldrich, USA) pendant 15 min. Le deuxième biberon est ensuite proposé aux souris pendant 15 min supplémentaires. Dans cette expérience, les données sont analysées sur 1 et 5 min, à partir du premier coup de langue, afin d'éviter les signaux post-absorptifs.

- Prélèvement des papilles caliciformes

Les papilles caliciformes de plusieurs souris ont été isolées suivant la procédure décrite précédemment (Laugerette et al. 2005). En bref, l'épithélium lingual est séparé du tissu conjonctif par dissociation enzymatique (mélange élastase/dispase, chacune à 2mg/mL dans un tampon de tyrode : 140mM NaCl, 5mM KCl, 10mM HEPES, 1mM CaCl₂, 10mM glucose, 1mM MgCl₂, 10mM Na Pyruvate, pH7.4) puis la papille est disséquée sous loupe binoculaire. Les échantillons prélevés sont immédiatement congelés de manière rapide dans de l'azote liquide puis stockés à -80°C jusqu'à leur utilisation finale.

- Western-blot

Les échantillons prélevés comme décrit précédemment sont ensuite homogénéisés à l'aide d'un micro-potter dans du tampon TSE (50mM Tris HCl, 150mM NaCl, 1mM EDTA, 1% Igepal CA-630, 5µL/mL de cocktail anti-protéase (Sigma-Aldrich, USA) et 10µL/mL d'antiphosphatase (Thermo Fisher, USA)). Les homogénats sont laissés sur glace pendant 30min puis centrifugés (12000g, 15min, 4°C). Les lysats obtenus sont utilisés immédiatement ou alors stockés à -80°C. La concentration en protéine des lysats a été mesurée à l'aide d'un kit BCA (Thermo Fisher, USA). Les protéines dénaturées (4µg) ont été séparées par SDS-PAGE (10%) puis transférées sur une membrane PVDF par électro-blotting. Après une saturation de la membrane pendant toute une nuit, à 4°C, à l'aide d'un tampon TBS contenant 5% de BSA et 1% de Tween 20, une incubation de 3h à température ambiante avec un anticorps anti-CD36 (dilution 1/1000, R&D Systems, USA) a été réalisée. Après une série de rinçage, l'anticorps secondaire approprié, couplé à une peroxydase, a été ajouté. L'anticorps marqué a été révélé par chimioluminescence (réactif ECL-plus, Perkin Elmer, USA). La β-actine

(dilution 1/100, Santa Cruz Biotechnology Inc., USA) a été utilisée comme protéine de référence.

- Mesure du signal calcique

Les cellules gustatives CD36-positives des papilles caliciformes de souris ont été isolées selon la méthode décrite précédemment (El-Yassimi et al. 2008; Gaillard et al. 2008) puis mise en culture pendant 24h dans des puits Willico-Dish contenant du milieu RPMI-1640 supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal, 200U/mL de pénicilline et 0.2mg/mL de streptomycine. Les cellules gustatives CD36-positives sont ensuite rincées délicatement (3.5mM KH_2PO_4 , 17.02mM Na_2HPO_4 , 136mM NaCl, pH7.4) puis incubées avec le Fura-2/AM (1 μM) pendant 1h à 37°C dans un tampon (110mM NaCl, 5.4mM KCl, 25mM NaHCO_3 , 0.8mM MgCl_2 , 0.4mM KH_2PO_4 , 20mM Hepes-Na, 0.33mM Na_2HPO_4 , 1.2mM CaCl_2 , pH7.4). Ensuite, les cellules (2x10⁶/mL) sont lavées 3 fois et resuspendues dans le même milieu. Les changements en Ca^{2+} intracellulaire (F_{340}/F_{380}) sont suivis par microscopie (Nikon, TiU) à l'aide d'un objectif S-fluor 40x à immersion. Les plans ont été pris à des intervalles Z de 0.3 μm et le logiciel NIS-Element a été utilisé pour déconvolutionner les images. Le microscope est équipé d'une caméra EM-CCD (Lucas) pour l'enregistrement en temps réel d'images digitale 16-bit. Le système d'imagerie par fluorescence à double excitation a été utilisé pour des études sur cellules isolées. Les variations en Ca^{2+} intracellulaire sont exprimées en tant que ΔRatio , calculé comme étant la différence entre le ratio des pics F_{340}/F_{380} . Dans les expériences avec du milieu Ca^{2+} -free, le CaCl_2 est remplacé par de l'EGTA (2mM).

- Immunohistochimie

Les papilles caliciformes de souris contrôle et en régime HF ont été prélevées puis fixées 3h dans une solution glacée de paraformaldéhyde à 4% dans un tampon phosphate 0.1M à pH7.4. Les échantillons ont été cryoprotégés par une incubation dans une solution de saccharose à 15% dans un tampon phosphate 0.1M à pH 7.4 pendant 2h puis une nuit entière dans une solution de saccharose à 30% dans un tampon phosphate 0.1M à pH 7.4. Les papilles ont ensuite été incluses dans de l'OCT (Tissue-Tek, Sakura Finetek), puis conservées à -80°C. Les sections de 10 μm obtenues au cryostat sont séchées à température ambiante pendant 45min puis réhydratées dans du PBS 0.1M à pH 7.4 pendant 10min. Les

coupes ainsi réhydratées sont saturées avec une solution de PBS contenant 10% de BSA free-Fatty Acid et 0.2% de TritonX-100 pendant 1h à température ambiante puis incubées overnight à 4°C avec un anticorps polyclonal de lapin dirigé contre le CD36 (1/50, Abcam ab80978). Après des rinçages, les coupes sont incubées pendant 3h à température ambiante avec un anticorps secondaire fluorescent dirigé contre les antigènes de lapin (Alexa 568, 1/200, Invitrogen), puis une coloration au Hoechst est réalisée (coloration des noyaux cellulaires) (0.05mg/mL, Sigma-Aldrich). Les coupes ont enfin été observées en microscopie à épifluorescence (Axiovert 200M).

- Statistiques

Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM. La significativité des différences observées entre les groupes a été mesurée à l'aide de XLSTAT (Addinsoft, France). Nous avons d'abord vérifié la distribution normale des échantillons et l'égalité des variances puis effectué des two-tailed Student's t tests, des tests de Mann-Whitney ou des corrélations de Pearson.

Article n° 2

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

Chevrot *et al.* (2013) *Journal of Lipid Research* (in press)

MS ID: JLR/2013/039446

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

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

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

Short title: **Obesity decreases the fat preference**

[§] Have equally contributed to this investigation

* Correspondence to: P. Besnard, Physiologie de la Nutrition et Toxicologie (NUTox), AgroSup Dijon, 1, Esplanade Erasme, F-21000 Dijon (France).

Tel/Fax: (+33) 380 77 40 91

E-mail: pbesnard@u-bourgogne.fr

Supplementary key words: Long-chain fatty acids, taste sensitivity, calcium imaging, health.

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

ABSTRACT

A relationship between orosensory detection of dietary lipids, regulation of fat intake and body mass index was recently suggested. However, involved mechanisms are poorly understood. Moreover, whether obesity can directly modulate preference for fatty foods remains unknown. To address this question, exploration of the oral lipid sensing system was undertaken in diet-induced obese (DIO) mice. By using a combination of biochemical, physiological and behavioral approaches, we found that *i)* the attraction for lipids is decreased in obese mice, *ii)* this behavioral change has an orosensory origin, *iii)* it is reversed in calorie-restricted DIO mice, revealing an inverse correlation between fat preference and adipose tissue size, *iv)* obesity suppresses the lipid-mediated down-regulation of the lipid-sensor CD36 in circumvallate papillae, usually found during the refeeding of lean mice and *v)* the CD36-dependent signaling cascade controlling the intracellular calcium levels ($[Ca^{2+}]_i$) in taste bud cells is decreased in obese mice. Therefore, obesity alters the lipid sensing system responsible for the oral perception of dietary lipids. This phenomenon seems to take place through aCD36-mediated mechanism leading to changes in the eating behavior.

INTRODUCTION

Existence of an attraction for dietary lipids is observed both in rodents (1-3) and human (4, 5). Over the last decade, mechanisms leading to this stereotyped behavior have been actively studied and compelling evidence support the implication of a taste component in the detection of lipids (*i.e.* long-chain fatty acids – LCFA), in addition to textural, olfactory and post-ingestive cues. In mice, it was shown that *i)* gene invalidation of two unrelated LCFA-receptors specifically expressed in taste buds (*i.e.* CD36 and GPR120) renders animals unable to detect properly lipids during behavioral tests (6, 7), *ii)* LCFA trigger a signaling cascade in freshly isolated CD36-positive taste bud cells leading to a rise in $[Ca^{2+}]_i$ and to a neurotransmitter release (8, 9), and *iii)* the subsequent lipid signal uses peripheral and central nervous circuitry involved in gustation (7, 10). Recent data have highlighted important differences between lingual CD36 and GPR120 suggesting distinct, but complementary, functions in mouse taste buds. In contrast to GPR120, expression of CD36 protein in circumvallate papillae (CVP) is lipid-sensitive (11). Indeed, lingual CD36 protein levels displayed a rapid decrease in CVP when fasted mice were refed a diet containing lipids. It was suggested that the lipid-mediated down-regulation of CD36 in taste bud cells might modulate the motivation for fat consumption during a meal, initially high and then gradually decreasing secondary to the food intake, a phenomenon reminiscent of the sensory specific satiety (12). For GPR120, an implication in the glucagon-like peptide-1 (GLP-1) release by mouse CVP, producing a modulation of sweet and “fatty” taste sensitivity, was proposed (13).

Psychophysical experiments demonstrate that humans are also able to detect very low concentrations of LCFA in oral cavity in conditions where textural and olfactory cues are minimized (14). Recent data suggest an implication of lingual CD36 in this phenomenon. Indeed, obese patients with the common single nucleotide polymorphism A/A genotype at rs1761667, known to reduce the CD36 gene expression (15), displayed a higher detection threshold (*i.e.* low fat perception sensitivity) for lipids than G/G controls (16) and showed a greater attraction for added fats and oils (17). Therefore, genetic predispositions may affect the preference for fat, which might induce changes in eating behavior and obesity risk. Given the obesity epidemic, an important alternative issue is to determine whether obesity itself leads to changes in the orosensory perception of dietary fat. Interestingly, a relationship



between orosensory sensitivity for lipids and body mass index has been recently reported in human (18). Moreover, a comparison of obese and non-obese children and adolescents for the detection of sweet, umami, bitter, salty and sour tastes demonstrates that obesity affects taste sensitivity. Indeed, obese subjects display a low ability to correctly identify the different taste modalities (19). However, mechanisms involved in the modulation of taste sensitivity are poorly understood. To address this question, mice were subjected to nutritional challenges (obesogenic or calorie-restricted diets) and a combination of biochemical, physiological and behavioral approaches was used to analyse the impact of obesity on fat preference.

RESULTS

Mice fed a high fat diet display a lower preference for lipids

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

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

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

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

Lipid-mediated regulation of CD36 protein levels in gustatory papillae is impaired by the diet-induced obesity.

In gustatory mucosa, CD36 is thought to be a lipid-receptor implicated in the orosensory detection of dietary lipids (*i.e.* LCFA). To determine whether the lower lipid preference found in obese mice was related to lingual CD36 protein, comparison of immunolocalization of CD36 was undertaken in CVP from overnight fasted controls and DIO mice. As shown in Fig. 4-A, CD36 displays the same expression pattern in obese than in control mice. To confirm this observation, Western blotting analysis was performed in CVP. Similar expression levels of CD36 were found in control and obese mice, whatever the duration of HF diet (Fig. 4-B) or the composition of obesogenic diet used (HFHS - SD 2). It was recently reported in mouse CVP that *i)* CD36 protein levels are down-regulated by lipids during the post-prandial period (11) and *ii)* a disturbance in this regulation affects the spontaneous attraction for fat (13). Therefore, it was tempting to speculate that the lower attractive effect of oily solutions found in obese mice might be due to a dysfunction in this regulatory loop controlling the amounts of CD36 in CVP during a meal. To explore this hypothesis, CD36 protein levels in CVP were compared in fasted and refed controls and DIO mice. Since CD36 in CVP is lipid-sensitive and its post-prandial decrease is significant 60 min after the beginning of a meal (11), animals were refed the HF diet for one hour. Consistent with data in Fig. 4-B, fasted controls and DIO mice displayed similar CD36 expression levels in CVP. By contrast, the drop in CD36 content of CVP found 1 h after refeeding in controls was not retrieved in obese mice (Fig. 4-C).

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

In mouse CVP, LCFA-mediated activation of CD36 triggers a complex signaling cascade producing a huge rise in intracellular free calcium concentrations ($[Ca^{2+}]_i$) at the origin of neurotransmitters release (8-10). To assess whether obesity-mediated decrease in fat preference is due to a dysfunction in the CD36-dependent signaling, calcium imaging experiments were performed on freshly purified CD36-positive taste bud cells from control or from mice fed the HF for 4 weeks. The effects of the two main LCFA present in rapeseed oil, *i.e.* linoleic acid (LA) and oleic acid (OLA), were studied. Consistent with previously published data (8, 10), addition of LA or OLA led to a rapid rise in $[Ca^{2+}]_i$ in taste bud cells from control mice (Fig. 5-A). LCFA-evoked rise in $[Ca^{2+}]_i$ in a medium containing calcium (100% Ca^{2+}) was found decreased, albeit to a lesser extent, in the absence of calcium (0% Ca^{2+}), suggesting that LCFA led to the recruitment of calcium from both extra- and intracellular pools (Fig. 5-A). Although taste bud cells isolated from CVP of obese mice were responsive to LA or OLA (Fig. 5-B), $[Ca^{2+}]_i$ rises were dramatically lower than those found in CVP from lean controls in 0 or 100% calcium media (Fig. 5-C).

DISCUSSION

Obesity is one of the major public health challenges in the world by the reason of deleterious effects of its associated diseases (*i.e.* type 2 diabetes, vascular disorders, hypertension, cancer). Although the origin of obesity epidemic is clearly multifactorial, eating habits, especially overconsumption of high palatable energy-dense foods, is thought to play a significant role in this situation (4). Several lines of evidence indicate that laboratory rodents and humans display a preference for lipid-rich foods through poorly known mechanisms (21, 22). However, whether preference for fat is the cause and/or the consequence of obesity remains to be elucidated. The present report brings the first demonstration that a diet-induced obesity alters the gustatory pathway involved in the detection of dietary lipids in the mouse. Obese mice are not only unable to detect properly low concentrations of oil (0.02%), but also display a weaker preference for high concentrations (2.0% oil) than controls, demonstrating that obesogenic diets enhance the oral detection threshold (*i.e.* decrease the sensitivity) for lipids. It is noteworthy that the composition of the energy-dense diets used, especially the addition of sucrose, does not seem to play a significant role in this behavioral change since the two obesogenic diets used have produced similar results (Fig. 1 & SD 1).

A similar rightward shift in the dose-response to oil was also observed in DIO rats, obesity altering central reward functions (23). Our data strongly suggest that obesity also disturbs the function of the peripheral orosensory system since a lower preference for lipids is reproduced in obese mice by the use of computer-controlled licking tests in conditions minimizing post-ingestive influences (1-5 min). Although oral lipase activity is especially efficient in the mouse (24) and is involved in the detection threshold of lipids in human (16), a decrease in the expression and/or activity of lingual lipase in obese mice seems unlikely. Indeed, DIO animals also displayed a low attraction for solutions containing a free fatty acid (OLA). Our data support the fact that the size of fat mass is a major determinant for the modulation of oral fat sensitivity. Indeed, a reversal of obesity by a chronic food restriction corrects the detection thresholds and preference for oily solutions. Moreover, lipid preference (explored by using short-term liking tests) is inversely correlated to fat mass (assayed by echoMRI) (Fig. 2). The disturbance in the attraction for lipids found in DIO mice

appears to be independent of obesity-associated insulin resistance since a correlation between preference for fat and plasma insulin levels is lacking (Fig. 3).

These findings prompted us to explore the mechanism responsible for the obesity-mediated decrease in oral fat detection. CD36 expression in CVP from lean and obese mice was investigated. Indeed, lingual CD36 is known to play a major role in the preference for fat. Furthermore, CD36 expression is lipid-sensitive in mouse CVP (11). Finally, a decrease in CD36 expression level was recently reported in the gustatory mucosa of DIO rats (25). We did not observe such a change in fasted DIO mice whatever the obesogenic diets used (Fig. 4 & SD 2). This discrepancy might be due to experimental differences (*e.g.* duration of treatment, composition of diets) which might lead to a different inflammatory status. Indeed, inflammation interferes with taste cell renewal (26). The fact that the number of taste buds is clearly decreased in CV from obese rats (25), in contrast to what is found obese mice (Fig. 4-A), is consistent with this assumption. By contrast, we have found that the dynamic down-regulation of lingual CD36 protein levels, previously observed during the refeeding of fasted lean mice (11, 13) was not retrieved in obese animals. A similar CD36 dysfunction in CVP was already identified in GLP-1R-null mice in which attraction for oily solutions was also reduced (13). A direct evidence of a differential change in the cell surface expression of CD36 in CV from lean and obese mice seems unrealistic by reason of the scarcity of the biological material (1 CVP per mouse, containing few dozen of taste buds constituted of few dozen of CD36-expressing cells). The recent development of a human fungiform taste cell line could be a good alternative approach to get more information on this aspect in the future (27). Altogether our data strongly suggest that, the lack of preference of obese mice for fat might be due to alterations in the lipid sensing system related to the lingual CD36. Consistent with assumption, a reduction of the LCFA-mediated Ca^{2+} mobilization was observed using calcium imaging in CD36-positive taste bud cells freshly isolated from DIO mice, as compared with their lean counterparts (Fig. 5). This finding brings the first demonstration that obesity affects the lipid-mediated calcium signaling in taste bud cells. Although CD36 and GPR120 may be co-expressed in taste bud cells (13), it is tempting to speculate that the lower calcium response to LCFA found in CVP of obese mice is mainly dependent on CD36. Indeed, calcium response to LA was deeply reduced when taste bud cells were

previously treated with the specific and irreversible CD36 binding inhibitor sulfo-N-succinimidyl-oleate or in CD36-negative TBC (10).

The following working model, reconciling the present data with those of the literature, might explain the role played by the lingual CD36 in the decreased fat preference found in DIO-mice. In lean animals (Fig. 6-A), *i*) LCFA binding to lingual CD36 might induce its translocation in lipid-rafts, mostly found in the apical side of mature taste bud cells (1, 28); *ii*) by promoting the interaction of CD36 with Src-PTK (29), this event would trigger the signaling cascade (8); *iii*) this early event, which might contribute to the attraction for fatty foods at the beginning of a meal (11), would be followed by a progressive disappearance of CD36 from the plasma membrane which might occur *via* a caveolae-mediated endocytotic process (28); *iv*) once in the cell, CD36 might undergo a degradation by the ubiquitin/proteasome pathway, as previously demonstrated in the small intestine (30). This CD36 down-regulation might lead to a progressive decrease in the preference for fatty foods during a meal by reason of a gradual rise in the lipid detection threshold (*i.e.* a loss of sensitivity) (11). We postulate that obesity might impair this signaling machinery by limiting the CD36 amounts in lipid rafts which might restrain the subsequent signaling cascade and CD36 degradation. In these conditions, plasma membrane CD36 levels, related signaling, lipid detection threshold and preference for fat might remain relatively stable during a meal (Fig. 6-B). The lower preference for lipids found in DIO mice is consistent with such a scenario. An abnormal cell surface CD36 location was also found in muscular cells derived from obese patients (31), suggesting that obesity affects the distribution of CD36 in different cell types. Origin of this dysfunction remains to be established. A decrease in plasma membrane fluidity due to a chronic overconsumption of saturated fat, endocrine disturbances (*e.g.* insulin resistance, hyperleptinemia, drop in the plasma GLP-1 levels) and/or inflammation related to obesity are plausible candidates. Consistent with this idea, insulin, leptin and GLP-1 receptors are found in TBC (20, 32, 33). Moreover, plasma membrane localization of CD36 is controlled by insulin in myocytes (34), while leptin acts as modulator of sweet taste (32) and fat taste sensitivity is controlled by GLP-1 (13). Finally, it has recently reported that a lipopolysaccharide-induced inflammation disturbs the physiology of gustatory papillae in the mouse (26).

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

MATERIALS AND METHODS

Animals and diets

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

Tissues and blood samples

CVP from control and DIO mice were isolated according to the procedure described elsewhere (6). Briefly, lingual epithelium was separated from connective tissue by enzymatic dissociation (elastase and dispase mixture, 2 mg/ml each in Tyrode buffer: 140 mM NaCl, 5 mM KCl, 10 mM HEPES, 1 mM CaCl₂, 10 mM glucose, 1 mM MgCl₂, 10 mM Na pyruvate, pH 7.4) and the papilla was dissected under a binocular microscope. CVP were either used immediately for the calcium imaging assays or snap-frozen in liquid nitrogen then stored at -80°C until CD36 determination by Western blotting. Plasma was obtained after centrifugation of blood (5000 g for 10 min, 4°C). Plasma insulin levels were assayed by using a commercial ELISA kit (Mercodia, Sweden) and plasma glucose and triglyceride levels were determined with enzymatic reaction kits (Biomerieux, France).

Behavioral experiments

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

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

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

Immunohistochemistry

CVPs from fasted control and DIO mice were fixed for 3h in ice-cold 4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer pH7.4. Samples were cryoprotected by incubation in 15% sucrose in 0.1 M phosphate buffer for 2h, followed by overnight treatment with 30% sucrose in phosphate buffer. CVPs were then embedded in OCT medium (Tissue-Tek; Sakura Finetek) and stored at -80°C. Cryostat sections (10 µm)

were air dried for 45 min at room temperature and rehydrated in 0.1 M PBS (pH7.4) for 10 min. Rehydrated sections were blocked in 10% FA-free BSA and 0.2% TritonX-100 in PBS for 1h at room temperature and incubated overnight at 4°C with a polyclonal anti-rabbit CD36 antibody (1:50; Abcam ab80978). After washing, sections were incubated for 3 hours at room temperature with a fluorescent anti-rabbit secondary antibody (Alexa 568, 1:200 dilution, Invitrogen) and then counterstained with Hoechst reactive (0.05 mg/ml; Sigma-Aldrich) to stain the nuclei. Slices were analysed under an epifluorescent microscope (Axiovert 200M). No fluorescent staining was observed when the primary antibody was omitted.

Western blotting

Freshly isolated mouse CVP were homogenized using a micro-potter in a TSE buffer [50 mM Tris HCl, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Igepal CA-630, 5 µL/mL anti-protease cocktail (Sigma-Aldrich, USA) and 100 µL/10 mL antiphosphatase (Thermo Fischer, USA)]. Samples were stored on ice for 30 min and then centrifugated (12 000 g, 15 min, 4°C). Lysates were used immediately or stored at -80°C until the assay. Protein concentrations in homogenates were assayed using a BCA kit (Thermo Fisher, USA). Denaturated proteins (4 µg) were separated by SDS-PAGE (10%) and transferred to a PVDF membrane by electroblotting. After being blocked overnight using a TBS buffer containing 5% BSA and 0.05% Tween 20, membranes were incubated 3 h with an anti-CD36 antibody (1:1000 dilution; R&D Systems, USA). After a set of washes, the appropriate peroxidase-conjugated secondary antibody was added. Antibody labeling was detected by chemiluminescence (ECL-plus reagent, Perkin Elmer, USA). β-actin (1:100 dilution, Santa Cruz, USA) was used as an internal reference protein.

Each point corresponds to a pool of total proteins from 3 mice CVP. Each experiment was repeated 3 times.

Measurement of Ca²⁺ signaling

CD36-positive taste buds cells were freshly isolated from mouse CVP as described previously (8, 10) and further cultured for 24 h in Willico-Dish wells, containing RPMI-1640 medium, supplemented with 10% foetal calf serum, 200 U/mL penicillin and 0.2

mg/mL streptomycin. The next day, the CD36-positive TBC were gently washed with a buffer containing the following: 3.5 mM KH_2PO_4 ; 17.02 mM Na_2HPO_4 ; 136 mM NaCl, pH 7.4. The cells were then incubated with Fura-2/AM (1 μM) for 60 min at 37°C in loading buffer which contained the following: 110 mM NaCl; 5.4 mM KCl; 25 mM NaHCO_3 ; 0.8 mM MgCl_2 ; 0.4 mM KH_2PO_4 ; 20 mM Hepes-Na; 0.33 mM Na_2HPO_4 ; 1.2 mM CaCl_2 , pH 7.4.

After loading, the cells ($2 \times 10^6/\text{mL}$) were washed three times and remained suspended in the identical buffer. The changes in intracellular Ca^{2+} (F_{340}/F_{380}) were monitored under the Nikon microscope (TiU) by using S-fluor 40x oil immersion objective. The planes were taken at Z intervals of 0.3 μm , and NIS-Elements software was used to deconvolve the images. The microscope was equipped with EM-CCD (Lucas) camera for real time recording of 16-bit digital images. The dual excitation fluorescence imaging system was used for studies of individual cells. The changes in intracellular Ca^{2+} were expressed as ΔRatio , which was calculated as the difference between the peak F_{340}/F_{380} ratio. The data were summarized from the large number of individual cells (20–40 cells in a single run, with 3–9 identical experiments done in at least three cell preparations). For experiments in Ca^{2+} -free medium, CaCl_2 was replaced by EGTA (2 mM).

Each point corresponds to a pool of total proteins from 25 mice CVP. Each experiment was repeated 3 times.

Statistics

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

ACKNOWLEDGMENTS

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



REFERENCES

1. Tsuruta, M., T. Kawada, T. Fukuwatari, and T. Fushiki. 1999. The orosensory recognition of long-chain fatty acids in rats. *Physiol Behav* **66**: 285-288.
2. Takeda, M., M. Imaizumi, and T. Fushiki. 2000. Preference for vegetable oils in the two-bottle choice test in mice. *Life Sci* **67**: 197-204.
3. Takeda, M., M. Imaizumi, S. Sawano, Y. Manabe, and T. Fushiki. 2001. Long-term optional ingestion of corn oil induces excessive caloric intake and obesity in mice. *Nutrition* **17**: 117-120.
4. Drewnowski, A., and M. R. Greenwood. 1983. Cream and sugar: human preferences for high-fat foods. *Physiol Behav* **30**: 629-633.
5. Nysenbaum, A. N., and J. L. Smart. 1982. Sucking behaviour and milk intake of neonates in relation to milk fat content. *Early Hum Dev* **6**: 205-213.
6. Laugerette, F., P. Passilly-Degrace, B. Patris, I. Niot, M. Febbraio, J. P. Montmayeur, and P. Besnard. 2005. CD36 involvement in orosensory detection of dietary lipids, spontaneous fat preference, and digestive secretions. *J Clin Invest* **115**: 3177-3184.
7. Cartoni, C., K. Yasumatsu, T. Ohkuri, N. Shigemura, R. Yoshida, N. Godinot, J. le Coutre, Y. Ninomiya, and S. Damak. 2010. Taste preference for fatty acids is mediated by GPR40 and GPR120. *J Neurosci* **30**: 8376-8382.
8. El-Yassimi, A., A. Hichami, P. Besnard, and N. A. Khan. 2008. Linoleic acid induces calcium signaling, Src kinase phosphorylation, and neurotransmitter release in mouse CD36-positive gustatory cells. *J Biol Chem* **283**: 12949-12959.
9. Dramane, G., S. Abdoul-Azize, A. Hichami, T. Vogtle, S. Akpona, C. Chouabe, H. Sadou, B. Nieswandt, P. Besnard, and N. A. Khan. 2012. STIM1 regulates calcium signaling in taste bud cells and preference for fat in mice. *J Clin Invest* **122**: 2267-2282.
10. Gaillard, D., F. Laugerette, N. Darcel, A. El-Yassimi, P. Passilly-Degrace, A. Hichami, N. A. Khan, J. P. Montmayeur, and P. Besnard. 2008. The gustatory pathway is involved in CD36-mediated orosensory perception of long-chain fatty acids in the mouse. *FASEB J* **22**: 1458-1468.
11. Martin, C., P. Passilly-Degrace, D. Gaillard, J. F. Merlin, M. Chevrot, and P. Besnard. 2011. The lipid-sensor candidates CD36 and GPR120 are differentially regulated by dietary lipids in mouse taste buds: impact on spontaneous fat preference. *PLoS One* **6**: e24014.
12. Rolls, E. T. 1984. The neurophysiology of feeding. *Int J Obes* **8 Suppl 1**: 139-150.
13. Martin, C., P. Passilly-Degrace, M. Chevrot, D. Ancel, S. M. Sparks, D. J. Drucker, and P. Besnard. 2012. Lipid-mediated release of GLP-1 by mouse taste buds from circumvallate papillae: putative involvement of GPR120 and impact on taste sensitivity. *J Lipid Res* **53**: 2256-2265.
14. Chale-Rush, A., J. R. Burgess, and R. D. Mattes. 2007. Evidence for human orosensory (taste?) sensitivity to free fatty acids. *Chem Senses* **32**: 423-431.
15. Love-Gregory, L., R. Sherva, T. Schappe, J. S. Qi, J. McCrea, S. Klein, M. A. Connelly, and N. A. Abumrad. 2011. Common CD36 SNPs reduce protein expression and may contribute to a protective atherogenic profile. *Hum Mol Genet* **20**: 193-201.
16. Pepino, M. Y., L. Love-Gregory, S. Klein, and N. A. Abumrad. 2012. The fatty acid translocase gene CD36 and lingual lipase influence oral sensitivity to fat in obese subjects. *J Lipid Res* **53**: 561-566.

17. Keller, K. L., L. C. Liang, J. Sakimura, D. May, C. van Belle, C. Breen, E. Driggin, B. J. Tepper, P. C. Lanzano, L. Deng, and W. K. Chung. 2012. Common variants in the CD36 gene are associated with oral fat perception, fat preferences, and obesity in African Americans. *Obesity* **20**: 1066-1073.
18. Stewart, J. E., C. Feinle-Bisset, M. Golding, C. Delahunty, P. M. Clifton, and R. S. Keast. 2010. Oral sensitivity to fatty acids, food consumption and BMI in human subjects. *Br J Nutr* **104**: 145-152.
19. Overberg, J., T. Hummel, H. Krude, and S. Wiegand. 2012. Differences in taste sensitivity between obese and non-obese children and adolescents. *Arch Dis Child* **97**: 1048-1052.
20. Suzuki, Y., M. Takeda, Y. Sakakura, and N. Suzuki. 2005. Distinct expression pattern of insulin-like growth factor family in rodent taste buds. *J Comp Neurol* **482**: 74-84.
21. Mattes, R. D. 2011. Accumulating evidence supports a taste component for free fatty acids in humans. *Physiol Behav* **104**: 624-631.
22. Gaillard, D., P. Passilly-Degrace, and P. Besnard. 2008. Molecular mechanisms of fat preference and overeating. *Ann N Y Acad Sci* **1141**: 163-175.
23. Shin, A. C., R. L. Townsend, L. M. Patterson, and H. R. Berthoud. 2011. "Liking" and "wanting" of sweet and oily food stimuli as affected by high-fat diet-induced obesity, weight loss, leptin, and genetic predisposition. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **301**: R1267-1280.
24. Kawai, T., and T. Fushiki. 2003. Importance of lipolysis in oral cavity for orosensory detection of fat. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **285**: R447-454.
25. Zhang, X. J., L. H. Zhou, X. Ban, D. X. Liu, W. Jiang, and X. M. Liu. 2011. Decreased expression of CD36 in circumvallate taste buds of high-fat diet induced obese rats. *Acta Histochem* **113**: 663-667.
26. Cohn, Z. J., A. Kim, L. Huang, J. Brand, and H. Wang. 2010. Lipopolysaccharide-induced inflammation attenuates taste progenitor cell proliferation and shortens the life span of taste bud cells. *BMC Neurosci* **11**: 72.
27. Ozdener, H., A. I. Spielman, and N. E. Rawson. 2012. Isolation and culture of human fungiform taste papillae cells. *J Vis Exp*: e3730.
28. Ilegems, E., K. Iwatsuki, Z. Kokrashvili, O. Benard, Y. Ninomiya, and R. F. Margolskee. 2010. REEP2 enhances sweet receptor function by recruitment to lipid rafts. *J Neurosci* **30**: 13774-13783.
29. Thorne, R. F., E. G. Law, C. A. Elith, K. J. Ralston, R. C. Bates, and G. F. Burns. 2006. The association between CD36 and Lyn protein tyrosine kinase is mediated by lipid. *Biochem Biophys Res Commun* **351**: 51-56.
30. Tran, T. T., H. Poirier, L. Clement, F. Nassir, M. M. Pelsers, V. Petit, P. Degrace, M. C. Monnot, J. F. Glatz, N. A. Abumrad, P. Besnard, and I. Niot. 2011. Luminal lipid regulates CD36 levels and downstream signaling to stimulate chylomicron synthesis. *J Biol Chem* **286**: 25201-25210.
31. Aguer, C., J. Mercier, C. Y. Man, L. Metz, S. Bordenave, K. Lambert, E. Jean, L. Lantier, L. Bounoua, J. F. Brun, E. Raynaud de Mauverger, F. Andreelli, M. Foretz, and M. Kitzmann. 2010. Intramyocellular lipid accumulation is associated with permanent relocation ex vivo and in vitro of fatty acid translocase (FAT)/CD36 in obese patients. *Diabetologia* **53**: 1151-1163.
32. Kawai, K., K. Sugimoto, K. Nakashima, H. Miura, and Y. Ninomiya. 2000. Leptin as a modulator of sweet taste sensitivities in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 11044-11049.

33. Shin, Y. K., B. Martin, E. Golden, C. D. Dotson, S. Maudsley, W. Kim, H. J. Jang, M. P. Mattson, D. J. Drucker, J. M. Egan, and S. D. Munger. 2008. Modulation of taste sensitivity by GLP-1 signaling. *J Neurochem* **106**: 455-463.
34. van Oort, M. M., J. M. van Doorn, A. Bonen, J. F. Glatz, D. J. van der Horst, K. W. Rodenburg, and J. J. Luiken. 2008. Insulin-induced translocation of CD36 to the plasma membrane is reversible and shows similarity to that of GLUT4. *Biochim Biophys Acta* **1781**: 61-71.
35. Simons, P. J., J. A. Kummer, J. J. Luiken, and L. Boon. 2011. Apical CD36 immunolocalization in human and porcine taste buds from circumvallate and foliate papillae. *Acta Histochem* **113**: 839-843.
36. Miras, A. D., and C. W. le Roux. 2010. Bariatric surgery and taste: novel mechanisms of weight loss. *Curr Opin Gastroenterol* **26**: 140-145.
37. Stewart, J. E., C. Feinle-Bisset, and R. S. Keast. 2011. Fatty acid detection during food consumption and digestion: Associations with ingestive behavior and obesity. *Prog Lipid Res* **50**: 225-233.

Fig. 1: Comparison of body composition, blood parameters and preference for lipids in controls and mice subjected to a diet-induced obesity (DIO) for 4 and 23 weeks.

A- Evolution of body and fat mass in controls and DIO mice. Means \pm SEM, (n=40). $P < 0.001$ (***) .

B- Plasma glucose and insulin levels in overnight fasted controls and DIO mice. Means \pm SEM (n=20). $P < 0.01$ (**) and $P < 0.001$ (***) .

C- Long-term (12 h) two-bottle preference tests performed in controls and DIO mice. Animals were simultaneously subjected for 12 h to a control solution (0.3% Xanthan gum in water, w/v) and to a test solution containing rapeseed oil (0.02 or 2.0%, w/v) in the control solution. Xanthan gum was used to minimize textural cues and to emulsify rapeseed oil. Dotted line represents the absence of preference. Means \pm SEM (n=10-12), $P < 0.05$ (*), $P < 0.01$ (**) and $P < 0.001$ (***) .

Fig. 2: Effects of the fat mass on the preference for lipids in the mouse.

A- Evolution of body mass and fat mass in controls, diet-induced obese (DIO) and energy-restricted DIO mice. Body fat mass was determined at 8 weeks using a quantitative echo-MRI. Means \pm SEM, (n=10). $P < 0.001$ (***) .

B- Long-term (12 h) two-bottle preference tests performed after 8 weeks of experiment in control, DIO and energy-restricted DIO mice. Animals were simultaneously subjected, for 12 h, to a control solution (0.3% Xanthan gum in water w/v) and a test solution containing rapeseed oil (0.02 , 0.2 or 2.0%, w/v) in the control solution. Xanthan gum was used to minimize textural cues and to emulsify rapeseed oil. Dotted line represents the absence of preference. Means \pm SEM (n=9-10), $P < 0.05$ (*), $P < 0.01$ (**) and $P < 0.001$ (***) .

C- Correlation between fat mass (in % of body mass) and preference for rapeseed oil (%) determined by using the two-bottle preference tests performed in controls, DIO and energy-restricted DIO mice. Dotted line represents the absence of preference.

D- Short-term (1 min) licking tests in controls and DIO (HFHS diet) mice. Animals were subjected successively in a randomized manner to a control solution (mineral

oil) or to 0.5% oleic acid (OLA) in the control solution. Dotted line represents the absence of taste preference. Means \pm SEM (n=7-6), P<0.05 (*). A correlation between the fat mass (in % of body mass) and the preference for OLA (%) determined using licking tests is also represented. Dotted line represents the absence of preference.

Fig. 3: Correlation between plasma insulin levels and preference for fat.

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

Fig. 4: Effect of a diet-induced obesity (DIO) on the lipid-mediated regulation of CD36 protein levels in gustatory papillae in mice

A- Immunohistochemistry analysis of CD36 expression in circumvallate papillae (CVP) from overnight fasted controls and DIO mice subjected to HF diet for 4 wks. Dotted circles show one of taste buds in CVP. Arrows point examples of apical location of CD36 in taste buds. No fluorescent staining was observed when the primary antibody was omitted.

B- Relative CD36 protein levels determined by Western blotting in CVP from overnight fasted controls and DIO mice subjected to HF diet for 4 and 23 wks. Each point corresponds to a pool of total proteins from 3 mice CVP.

C- Relative CD36 protein levels determined by Western blotting in CVP from controls and DIO (HF diet for 4 weeks) mice fasted overnight or refed *ad libitum* the HF diet for 1 h. Each point corresponds to a pool of total proteins from 5 mice CVP. Means \pm SEM (n=3), P<0.1 (#), ns: non-significant.

Fig. 5: Effects of a diet-induced obesity (DIO) on the lipid-mediated regulation of the calcium signaling in CD36-positive taste bud cells.

Ca²⁺ imaging studies were performed in Ca²⁺-free (0% Ca²⁺) or in calcium-containing (100% Ca²⁺) media. The changes in intracellular Ca²⁺ (F340/F380) were monitored under the Nikon microscope (TiU) by using S-fluor 40x oil immersion objectives, as described in the Materials and Methods section. Colored time-lapse changes show the kinetics of the rise in [Ca²⁺]_i levels in a CD36-positive taste bud cell freshly isolated from circumvallate papillae (CVP) from controls and DIO (HF for 4 weeks) mice following addition of 20 μM linoleic acid (LA) or oleic acid (OLA) in the medium. The arrows indicate when LA or OLA were added into the cuvette without interruptions in the recording. Representative data found in controls (A) and DIO mice (B). **C-** Bar graphs showing the changes in [Ca²⁺]_i obtained by pooling data from separated 3 experiments. Means ± SEM, (n=7), P<0.01 (**) and P<0.001 (***).

Fig. 6: Working hypothesis.

A- The following scenario might explain the relationship between lingual CD36 and preference for lipids in control animals. At the beginning of a meal, the LCFA/CD36 complex into the lipid-rafts (1) activates the lipid-dependent signaling cascade in taste bud cells (2). This event is followed by a progressive endocytosis (3) and the degradation of CD36 by the ubiquitin/proteasome pathway (4). This down-regulation is responsible for a gradual enhancement of the orosensory detection threshold of lipids leading to a progressive decrease of the preference for fat during a meal.

B- Obesity might impair this regulatory cascade by limiting CD36 amount in lipid rafts and, thus the subsequent signaling and degradation of CD36. In consequence, the CD36 levels in the plasma membrane and the related signaling cascade remain relatively stable during a meal in obese mice, as the lipid detection threshold and preference for fat, in contrast to what occurs in lean animals.

Table 1: Diet compositions.

HF: High Fat, HFHS: High Fat High Sucrose, FA: Fatty Acids.

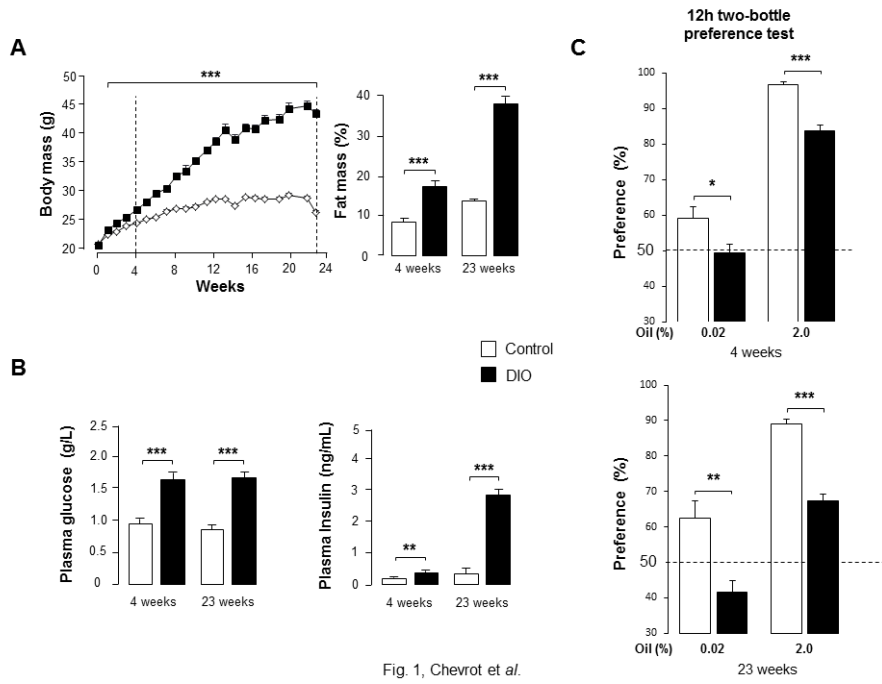


Fig. 1, Chevrot et al.

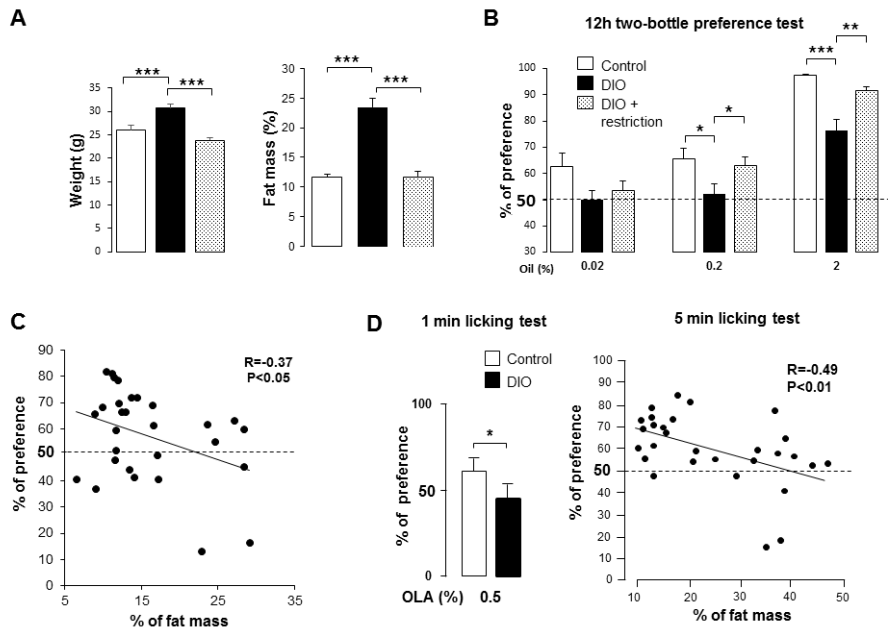


Fig. 2, Chevrot et al.

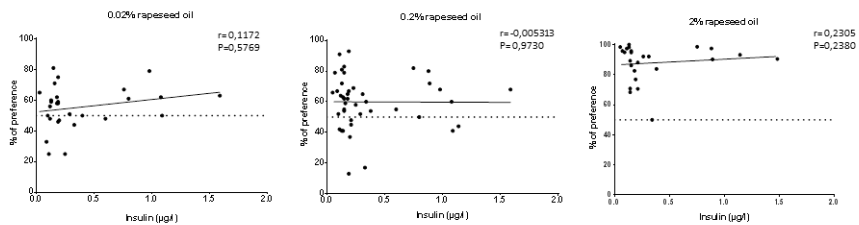


Fig. 3, Chevrot et al.

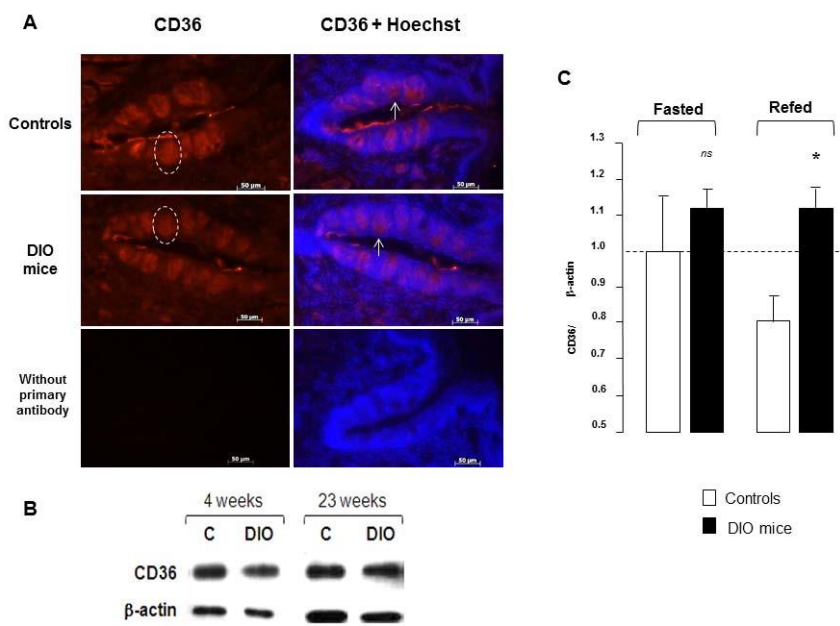


Fig. 4, Chevrot et al.

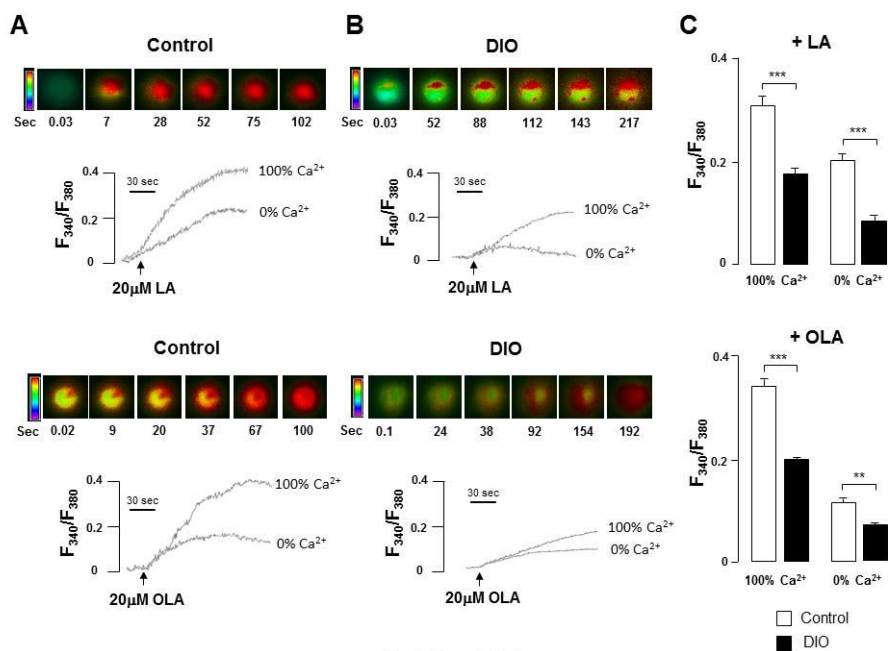


Fig. 5, Chevrot et al.

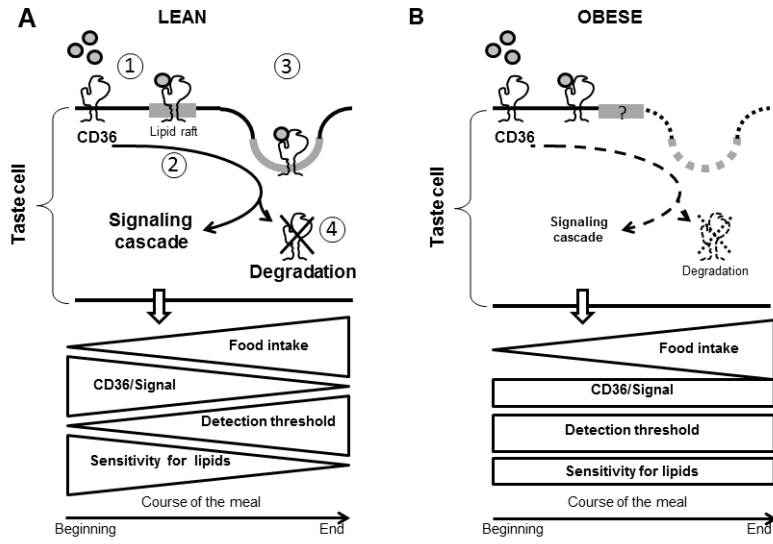
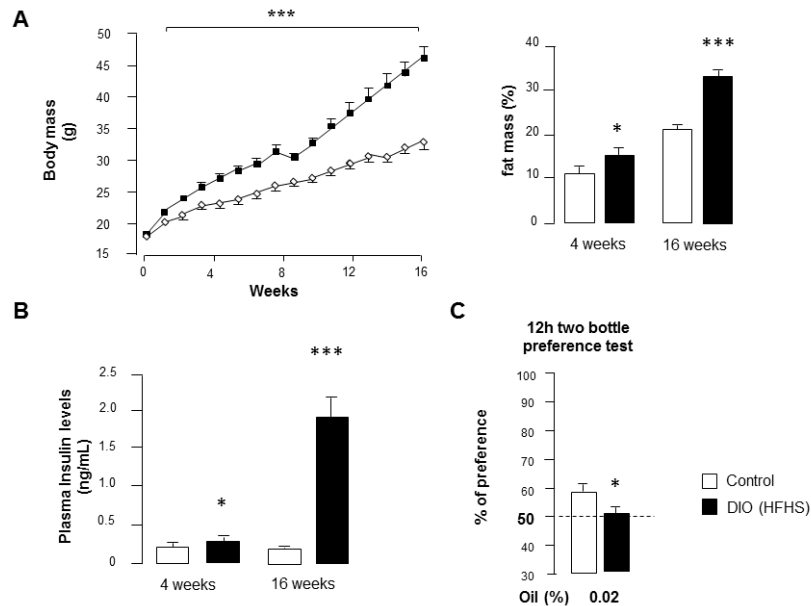


Fig. 6, Chevrot et al.

Table 1: Composition of the diets

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

Table 1, Chevrot et al.



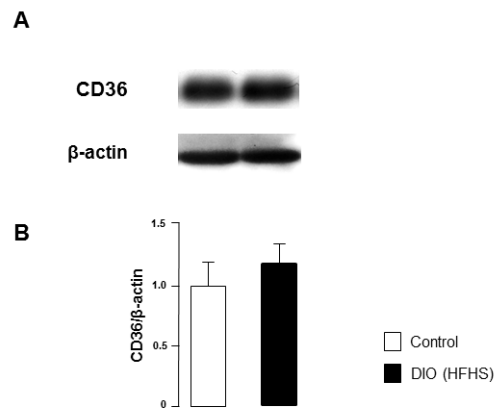
SD 1, Chevrot et al.

SD Fig.1: Comparison of body composition, plasma insulin and preference for lipids in controls and mice chronically subjected to a High Fat High Sucrose- (HFHS) diet.

A- Evolution of body and fat mass in controls and obese mice. Means \pm SEM, (n=20). $P < 0.001$ (***)).

B- Plasma insulin levels in overnight fasted controls and obese mice. Means \pm SEM (n=20). $P < 0.05$ (*) and $P < 0.001$ (***)).

C- Long-term (12 h) two-bottle preference tests performed in control and obese mice. Animals were simultaneously subjected for 12 h to a control solution (0.3% Xanthan gum in water, w/v) and to a test solution containing rapeseed oil (0.02%, w/v, in the control solution). Xanthan gum was used to minimize textural cues and to emulsify rapeseed oil. Dotted line represents the absence of preference. Means \pm SEM (n=12), $P < 0.05$ (*).



SD 2, Chevrot *et al.*

SD Fig. II: Effects of a High Fat-High Sucrose (HFHS) diet on the CD36 protein levels in gustatory papillae in mice

A- Representative data of relative CD36 protein levels determined by Western blotting in circumvallate papillae (CVP) from overnight fasted control and obese mice.

B- Bar graph representation of the relative CD36 protein levels in CVP from overnight fasted mice (n=3, each point corresponds to a pool of total proteins from 3 mice CVP).

Discussion

L'épidémie d'obésité actuelle semble pouvoir affecter la détection gustative des saveurs sucrée, salée, amère, acide et *umami*. En effet, une étude récente indique une diminution de la sensibilité gustative pour ces saveurs chez des adolescents obèses comparé à des adolescents de poids normal (Overberg et al. 2012). De plus nos travaux chez l'Homme indiquent un impact de l'obésité sur la détection oro-sensorielle des lipides alimentaires. Les travaux réalisés dans l'article n°2 de cette thèse ont été mis en œuvre afin de déterminer si l'obésité pouvait également être responsable d'une diminution de la détection orale des lipides alimentaires chez la souris. En effet, cette question est très importante puisque l'on peut facilement imaginer des modifications du comportement alimentaire en cas de mauvaise détection orale des lipides. Deux hypothèses peuvent être émises à ce sujet. D'une part, une diminution de la sensibilité gustative pourrait être à l'origine d'une diminution de la consommation d'aliments riches en lipides. En effet, on peut penser qu'une détection orale des lipides alimentaires altérée peut être à l'origine d'une absence d'attraction pour les aliments riches en lipides et donc d'une consommation diminuée de ces aliments. D'autre part, une perturbation de la détection orale des lipides pourrait être à l'origine d'une consommation accrue d'aliments riches en lipides. Ce comportement pourrait s'expliquer par la recherche d'une satisfaction hédonique. En effet, cette augmentation de consommation d'aliments riches en lipides permettrait d'atteindre un stade de plaisir alimentaire dont le seuil a été modifié. A l'heure actuelle, la deuxième hypothèse est privilégiée dans la littérature. A titre d'exemple, les auteurs d'un article récent suggèrent qu'une diminution de la détection gustative des AGLC serait à l'origine d'une consommation excessive d'aliments riches en lipides (J E Stewart and Keast 2012). Si ce scénario est confirmé, cette régulation poserait un réel problème de santé publique puisqu'une augmentation de la consommation d'aliments riches en lipides entraînerait à son tour une augmentation de l'obésité, laquelle serait responsable d'une diminution de la détection orale des lipides, conduisant, ainsi, à l'installation d'un cercle vicieux.

Dans l'article n°2, nos résultats indiquent que lorsque l'on soumet les souris en régime obésogène à un test à double choix long-terme, on observe pour ces souris une diminution de la préférence pour des solutions enrichies en huile de colza. Des études précédentes du Laboratoire avaient montré que 1°/ il existait une chute lipide-dépendante

de l'expression protéique de CD36 au niveau des CV d'animaux renourris suite à un jeûne et que 2°/ la sensibilité de cette régulation était très élevée car elle était observée même en présence d'une infime quantité de lipides dans l'alimentation (Céline Martin, Passilly-Degrace, et al. 2011). De façon intéressante, lorsque ces mêmes expérimentations ont été réalisées chez des souris rendues obèses, nous n'observons pas de chute de CD36 dans la CV. Ainsi, l'obésité semble également perturber la dynamique cellulaire de CD36. Des résultats similaires ont été obtenus chez des souris dépourvues de récepteur au GLP-1, dont la préférence pour les lipides est également diminuée (Celine Martin et al. 2012). Donc une perturbation de la « dynamique » d'expression du CD36 dans la CV semble avoir un impact majeur sur la perception oro-sensorielle des lipides alimentaires et, probablement, le comportement alimentaire qui en résulte. Chez la souris obèse, l'origine de ce phénomène reste à établir. Nos résultats indiquent que cette diminution de préférence est la conséquence d'une perturbation de la signalisation cellulaire CD36-dépendante des cellules gustatives. En effet, des expériences de signalisation calcique réalisées sur des cellules gustatives CD36-positives de CV de souris en régime obésogène ont démontré une diminution du signal intracellulaire lorsque ces cellules sont stimulées avec un AGLC.

En bref, l'obésité induite par le régime alimentaire est responsable d'une diminution de la préférence pour les lipides chez la souris, les mécanismes cellulaires impliqués étant en partie élucidés. Des résultats complémentaires obtenus chez ces mêmes souris en régime permettent d'étayer nos résultats (**Figure 35**). Des mesures de préférence en test à double choix long terme sur des souris à jeun, ou bien nourries avec un régime standard ou hyperlipidique ont été réalisées. Dans cette expérience, l'hypothèse d'une diminution progressive de la préférence pour une solution enrichie en huile de colza en fonction de la teneur en lipides du régime a été émise (hypothèse de rassasiement sensoriel spécifique). En effet, l'augmentation de la quantité de lipides dans le régime pourrait être associée à une diminution de plus en plus importante de l'expression du CD36 membranaire et donc à une diminution progressive de la préférence de ces animaux pour les lipides (Céline Martin, Passilly-Degrace, et al. 2011). Les résultats obtenus montrent qu'en effet, plus le régime donné à la souris est riche en lipides et plus la préférence pour une solution d'huile de colza à 2% est diminuée chez la souris mince. La **Figure 35** permet de resituer cette hypothèse au sein du modèle développé dans l'article n°2. Dans ce modèle, la quantité de lipides contenus

dans le régime est inversement proportionnelle à la quantité de CD36 membranaire dans la CV. La diminution de l'expression de CD36 serait alors responsable d'une augmentation des seuils de détection, associée à une diminution de la préférence pour les lipides alimentaires, à l'origine de l'arrêt de la prise alimentaire. D'une manière intéressante, les mêmes tests réalisés chez les souris obèses font état d'une absence de modification de la préférence de ces souris pour une solution enrichie en huile de colza, en fonction de la quantité de lipides dans le régime (**Figure 35**). Ces résultats viennent renforcer les données de l'article concernant les défauts de régulation du CD36 chez les souris rendues obèses à l'aide d'un régime alimentaire riche en AGS.

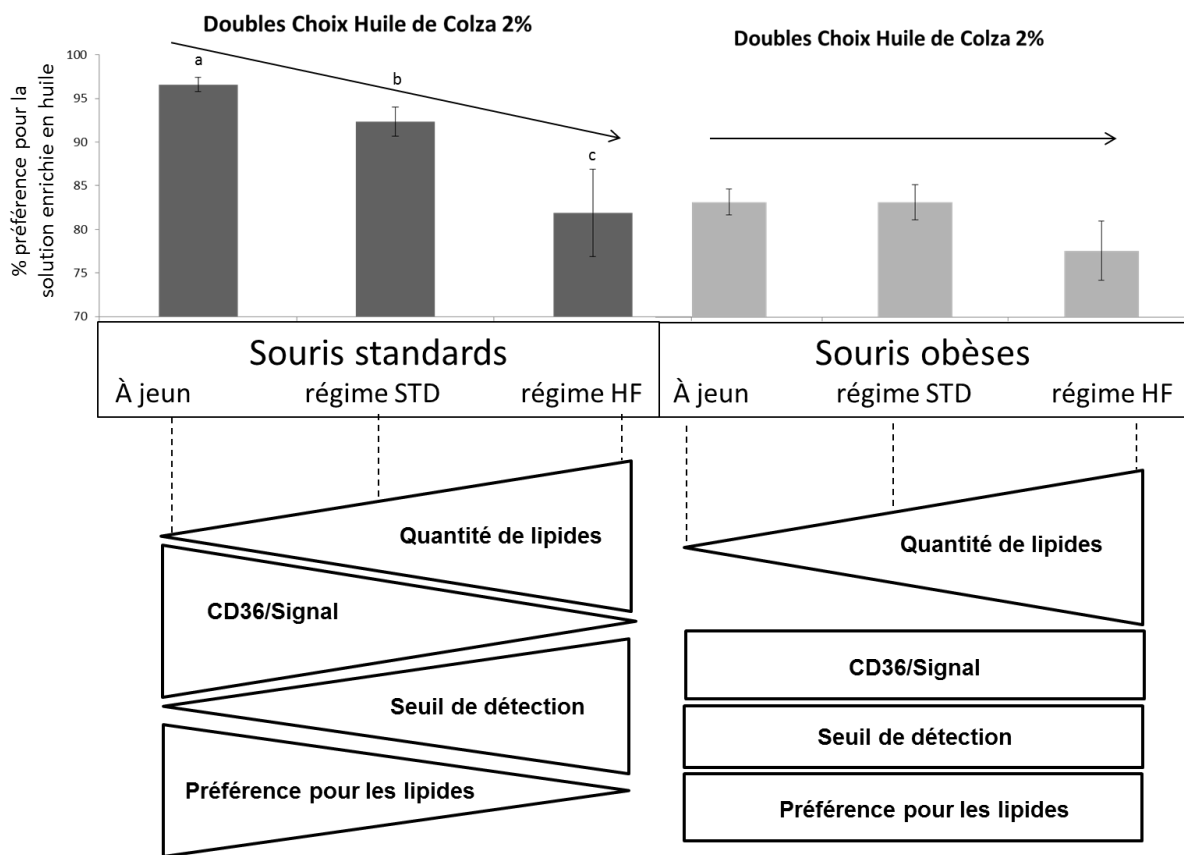


Figure 35 : Mesure de la préférence pour une solution de xanthane enrichie avec 2% d'huile de colza en test à double choix long-terme en fonction du régime alimentaire chez des souris standards ou obèses.

STD : standard ; HF : high fat. Deux lettres différentes indiquent une différence significative ($p < 0.5$).

La principale question soulevée par les résultats obtenus est pourquoi le niveau d'expression du CD36 n'est plus diminué chez la souris obèse renourrie après un jeûne.

Quels sont les paramètres qui peuvent être impliqués dans la perturbation de la dynamique du CD36 observée ? Au moins deux hypothèses peuvent être avancées.

En premier lieu, ceci pourrait être dû à une modification de la nature des lipides au sein de la bicouche lipidique qui forme les membranes cellulaires. En effet, la composition en lipides des membranes est le reflet de l'alimentation de l'individu. Ainsi, chez des souris dont le régime alimentaire a été fortement enrichi en AGS et dans une moindre mesure en cholestérol, une rigidité des membranes n'est pas à exclure. Dans ce contexte, le recrutement de CD36 au sein des radeaux lipidiques suite à sa liaison avec un AGLC pourrait être compromis. Or cette étape est indispensable pour l'existence d'un recrutement des protéines impliquées dans la signalisation (srcPTK) (Thorne et al. 2006) et sa future internalisation.

La deuxième piste à considérer est le changement de statut endocrine induit par le régime obésogène. En effet, l'insuline pourrait être responsable de cette absence de disparition de CD36 dans les cellules gustatives chez la souris obèse. En effet, il a été montré au niveau musculaire que l'insuline, de manière opposée aux AGLC, maintient CD36 au niveau de la membrane plasmique (J. Smith et al. 2008). De manière intéressante, les souris de l'article n°2, soumises à un régime alimentaire enrichi en lipides, présentent une légère hyperinsulinémie. Ainsi, cette augmentation de sécrétion d'insuline pourrait être à l'origine d'une absence de régulation de CD36 chez les souris obèses. Le GLP-1 peut également être mis en cause. En effet, il a été montré chez l'Homme une diminution du taux de GLP-1 plasmatique en cas d'obésité (Ranganath et al. 1996). De plus, GLP-1 intervient dans la modulation de la perception de la saveur sucrée (Shin et al. 2008). Des travaux récents au Laboratoire ont permis d'identifier GPR120 comme étant un lipido-récepteur lingual à l'origine d'une sécrétion de GLP-1 au niveau local. Or le GLP-1 est impliqué dans la dynamique de l'expression de CD36 lors d'une stimulation orale avec des lipides (Celine Martin et al. 2012). Ainsi, une diminution de l'expression de GPR120, entraînant une diminution de sécrétion de GLP-1, pourrait provoquer une absence de régulation de CD36 au niveau des cellules gustatives de souris obèses. Une analyse par western-blot de l'expression de GPR120 chez des souris obèses indique que le niveau d'expression de cette protéine est identique à celui des souris contrôles (**Figure 36**). Ainsi, l'absence de régulation de CD36 ne semble pas pouvoir s'expliquer de cette manière.

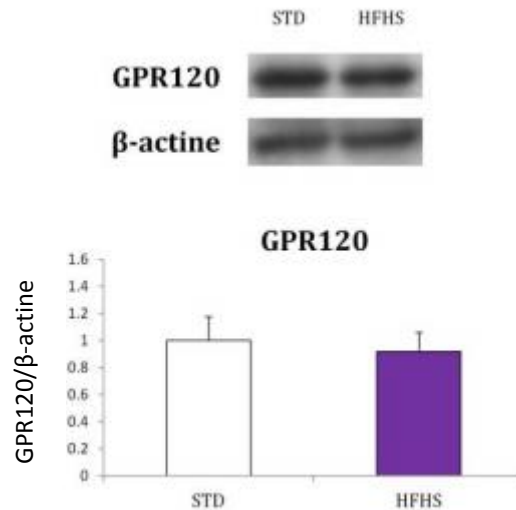


Figure 36 : Analyse par western-blot de l'expression de GPR120 chez des souris en régime contrôle ou en régime obésogène.

STD : standard ; HFHS : *high fat high sucrose*.

Cependant, il a été rapporté dans la littérature que des GPCR peuvent être retrouvés au sein des radeaux lipidiques (Patel, Murray, and Insel 2008). On peut donc imaginer que GPR120 doit également être retrouvé au niveau de ces structures membranaires pour permettre la sécrétion de GLP-1. Ainsi, une rigidité membranaire chez les souris en régime riche en acides gras saturés pourrait être à l'origine d'un défaut de recrutement de GPR120 au niveau des radeaux lipidiques, empêchant ainsi la sécrétion de GLP-1 par les bourgeons du goût et donc favorisant le maintien de CD36 au niveau membranaire. Finalement, même si elle n'est pas encore décrite dans la littérature, on pourrait imaginer l'existence, en cas d'obésité, d'une résistance au GLP-1, comme cela a déjà été décrit pour l'insuline ou bien encore pour la leptine. Une dernière hypothèse permettant d'expliquer l'absence de dynamique de CD36 chez les souris dont l'obésité a été induite est, justement, l'implication de la leptine dans ce phénomène. En effet, de nombreuses études ont montré que la leptine joue un rôle important dans la modulation des saveurs, notamment de la saveur sucrée (Shigemura et al. 2004). Ainsi, le rôle de cette hormone sur la détection orale des lipides chez des souris obèses, et donc hyperleptinémique, n'est pas à négliger. L'ensemble de ces hypothèses permettrait d'expliquer de manière intégrée pourquoi on constate, chez les souris obèses, une absence de régulation du lipido-récepteur CD36 au cours de la prise alimentaire.

Les résultats obtenus dans cet article apportent également les preuves d'une diminution de la signalisation calcique dans les cellules gustatives CD36 positives de la CV de

souris obèses lors d'une stimulation avec un AGLC. Cependant, l'expression de CD36 est stable chez ces souris obèses lors d'un repas, avec un niveau basal identique à celui des souris standards. Ainsi, le lien entre l'expression constante de CD36 et la diminution du signal calcique chez les souris rendues obèses paraît paradoxal. En effet, on peut aisément imaginer qu'une persistance de CD36 à la membrane pourrait être responsable d'une stimulation et d'un signal continu en présence d'AGLC. Or l'ensemble de nos données suggèrent l'existence d'un lien entre la disparition du CD36 de la membrane et la transduction du signal dans les cellules gustatives. Ainsi, l'absence d'internalisation de CD36 chez les souris obèses serait associée à une diminution du signal intracellulaire. Ces résultats sont en accord avec des résultats obtenus au laboratoire au niveau intestinal. En effet, il a été montré sur ce tissu que, lors d'une stimulation de la muqueuse intestinale avec des AGLC, le niveau de CD36 est diminué et que cette diminution, qui s'explique par une dégradation de la protéine *via* le système ubiquitine-protéasome, est responsable de la signalisation cellulaire CD36-dépendante (Tran et al. 2011). Ainsi, dans notre modèle, c'est une absence de dégradation de la protéine et, par analogie, la diminution du signal intracellulaire CD36-dépendant qui en découle qui pourrait expliquer la diminution de la préférence pour les lipides chez la souris obèse.

En conclusion, ces travaux réalisés au Laboratoire sur un modèle de souris rendues obèses à l'aide d'un régime alimentaire riche en AGS apportent la preuve directe que l'obésité peut influencer la détection orale des lipides alimentaires. Ce phénomène peut s'expliquer par une perturbation de la « dynamique » de l'expression de CD36 au niveau de la CV, associée à une diminution du signal calcique CD36-dépendant. Cette absence de régulation aurait pour conséquence une augmentation du seuil de perception des lipides (c'est-à-dire une diminution de leur sensibilité) chez les souris obèses. Si cette modification est associée à une augmentation de la consommation d'aliments riches en lipides afin de satisfaire un besoin hédonique n'est pas actuellement démontré dans cette thèse. Si tel est le cas, l'obésité pourrait entraîner une surconsommation de lipides, constituant ainsi un cercle vicieux à l'origine d'un renforcement de l'obésité.

III. Quel est l'impact du « sensing »
hypothalamique des lipides sur le comportement
alimentaire chez la souris ?

Afin de lutter efficacement contre l'épidémie d'obésité, une compréhension des mécanismes de détection des lipides par l'organisme est nécessaire. Des systèmes de détections des lipides ont été décrits au niveau oral mais aussi aux niveaux intestinal et central. La partie gustative de la détection des lipides a déjà été largement décrite et étudiée dans ce manuscrit, mais il ne s'agit que d'un volet d'un système beaucoup plus complexe. Dans l'article n°3, la détection orale mais également post-orale des lipides est décrite en détail.

Parmi les différents niveaux de détection, le « sensing » lipidique au niveau hypothalamique semble être une étape cruciale dans la régulation de la prise alimentaire. C'est pourquoi des études comportementales chez la souris ont été menées afin de déterminer l'impact de la détection hypothalamique des lipides circulants sur la prise alimentaire chez la souris. D'autres études comportementales ont été réalisées afin de décrypter les mécanismes impliqués.

Matériels et méthodes

Les méthodes utilisées pour les expériences complémentaires présentées après l'article sont décrites ci-dessous :

- *Pose à demeure du cathéter et soins post-opératoires*

Des souris C57Bl6/J ont été anesthésiées, puis un cathéter a été posé à demeure dans la carotide de la souris, en direction du cerveau. L'extrémité du cathéter débouche sur le haut de la tête de l'animal afin d'y avoir accès facilement, permettant ainsi l'injection de molécules d'intérêt directement vers l'hypothalamus. Dès la fin de l'opération, une injection intra-péritonéale de Kétofen (10%) dilué au 1/100 dans du sérum physiologique hépariné à 4‰ (10µL dans 990µL de serum physiologique) est réalisée (Volume à injecter (µL) = poids de l'animal(g) x 5). Du Kétofen (10%) est également ajouté dans l'eau du biberon à raison de 50µL pour 100mL d'eau. Dès le lendemain de l'opération, une injection d'antibiotique (Gentalline 160mg/2mL) est réalisé. Pour une souris de 25g, l'injection est de 50µL d'une solution d'antibiotique préparée à partir de 14µL d'antibiotique diluée dans 1.5mL de sérum physiologique hépariné à 4‰. Ce traitement est appliqué pendant 2 jours. Un entretien régulier du cathéter (quotidiennement au début, puis espacé de 1 ou 2 jours) est enfin réalisé avec 50µL de sérum physiologique hépariné à 4‰.

- *Mesure de la reprise alimentaire*

Après une période de jeûne de 5h pendant la période de jour, les animaux ont été perfusés dès la tombée de la nuit avec la solution contrôle (Sérum physiologique hépariné à 0.4%) ou la solution expérimentale (Intralipide (Sigma-Aldrich, USA) hépariné à 0.4%) à un débit de 1µL/min pendant 10 minutes. Dès la fin de cette perfusion, les animaux ont eu libre accès à la nourriture et leur prise alimentaire a été mesurée après 30min, 1h, 2h, 3h et 4h. Dans le cas de perfusions préalables, les animaux ont reçu soit une solution de pyrrolidone (Sigma-Aldrich, USA) soit une solution de SSO (400µM) dilué dans la pyrrolidone à une vitesse de 1µL/min. Dès la fin de cette perfusion, les perfusions avec les solutions contrôle et expérimentale sont réalisées comme décrit précédemment puis la cinétique de reprise alimentaire a lieu. Les solutions ont été héparinées dans le but d'activer la lipoprotéine lipase présente au niveau de l'endothélium de la barrière hémato-encéphalique et ainsi

d'augmenter la biodisponibilité en acides gras libres. La concentration et le débit des perfusions d'IL ont été choisis de telle manière que son injection ne s'accompagne pas d'une augmentation du taux de TG plasmatiques.

- Statistiques

Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM. La significativité des différences observées entre les groupes a été mesurée à l'aide de XLSTAT (Addinsoft, France). Nous avons d'abord vérifié la distribution normale des échantillons et l'égalité des variances puis effectué un two-tailed Student's t test.

Article n° 3

Role of CD36 in Oral and Post-oral Sensing of Lipids

Chevrot *et al.*, (2012) *Handb Exp Pharmacol.*; (209):295-307

Role of CD36 in Oral and Postoral Sensing of Lipids

M. Chevrot, C. Martin, P. Passilly-Degrace, and P. Besnard

Contents

1	Introduction	296
2	Oral Sensing of Lipids	297
2.1	CD36 Displays Features of a Gustatory Lipid Sensor	297
2.2	Physiological Consequences	298
3	Postoral Sensing of Lipids	299
3.1	In the Small Intestine	299
3.2	In the Brain	302
4	Conclusions and Future Directions	303
	References	305

Abstract Obesity and associated plethora of diseases constitute a major public health challenge worldwide. The conjunction of profound changes in our lifestyle and a thrifty genetic that evolved in an environment of food scarcity largely explains this epidemic situation. Food abundance promotes our specific appetite for the more palatable food generally rich in lipids. It is noteworthy that this attraction for fatty food is not specific to humans. Rats and mice also spontaneously prefer lipid-rich food in a free-choice situation. Detection of lipids in food requires the presence of specific sensors located in strategic places (e.g., oral cavity, small intestine, brain) whose activation results in a modulation of the eating behavior. Recent data strongly suggest that the glycoprotein CD36 plays a significant role in this sensing system.

Keywords Central nervous system • Dietary lipids • Eating behavior • Endocannabinoids • Health • Lipid receptors • Obesity risk • Sense of taste • Small intestine

M. Chevrot • C. Martin • P. Passilly-Degrace • P. Besnard (✉)
 Physiologie de la Nutrition, UMR U866 INSERM/Université de Bourgogne, AgroSup Dijon,
 1, Esplanade Erasme, 21000 Dijon, France
 e-mail: pbsnard@u-bourgogne.fr

H.-G. Joost (ed.), *Appetite Control*, Handbook of Experimental Pharmacology 209, 295
 DOI 10.1007/978-3-642-24716-3_13, © Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2012

Abbreviations

BBB	Blood–brain barrier
BMI	Body mass index
CART	Cocaine-amphetamine-related peptide
CCK	Cholecystokinin
FATP	Fatty acid transport proteins
GLP-1	Glucagon-like peptide-1
GPCR	G protein-coupled receptors
HBMEC	Human brain microvessel endothelial cells
LCFA	Long-chain fatty acid
LPL	Lipoprotein lipase
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MTP	Microsomal triglyceride transfer protein
NPY	Neuropeptide Y
NST	Nucleus of solitary tract
OEA	Oleylethanolamine
PTK	Protein tyrosine kinase
TBC	Taste bud cells
TG	Triglyceride
T1R	Taste 1 receptors
SSO	Sulfo-N-succinimidyl oleate ester

1 Introduction

Dietary fat consists mainly of long-chain triglycerides (TG). Because they cannot cross membranes of cells, TG must be hydrolyzed before utilization. This process takes place during digestion which releases long-chain fatty acids (LCFA, number of carbons ≥ 16) from TG. LCFA exert basic functions in the cell mainly as membrane components, metabolic fuel, and precursors of lipid mediators. They also modulate the expression of genes involved in the regulation of energy balance through the binding and activation of nuclear receptors (e.g., PPAR). In addition to this intracellular lipid sensing, the existence of plasma membrane lipid receptors responsible for the extracellular detection of LCFA was recently reported. Located in strategic places of the body (e.g., oral cavity, small intestine, central nervous system), these lipid sensors participate in the control of different sequences of the feeding behavior from the choice of food to eat to the satiety by providing real-time information about the lipid content of the diet and their subsequent metabolic use. The progressive deciphering of this oral and postoral lipid-sensing system is of a great interest since it might open new insights to limit the consumption of fat-rich food and decrease risk of obesity and associated diseases (non-insulin-dependent diabetes, atherosclerosis, hypertension, cancers). A growing body of evidence suggests that the plasma membrane lipid-binding protein CD36 (cluster of

differentiation 36), which has been specifically identified in the gustatory papillae, enterocytes, and hypothalamic neurons, appears to be a good candidate for this function. The purpose of this minireview is to summarize and discuss the recent data in this new field of investigations.

2 Oral Sensing of Lipids

The first step of dietary fat detection takes place in the oral cavity. For a long time, it was thought that only textural and olfactory cues were responsible for the orosensory perception of lipids. Recent compelling evidences support that sense of taste also plays a role in this detection system in rodents (rats and mice) (Takeda et al. 2000, 2001; Fukuwatari et al. 2003) and probably also in humans (Chale-Rush et al. 2007). Oro-sensory perception of dietary lipids is dependent from LCFA (Tsuruta et al. 1999; Fukuwatari et al. 2003). As for other tastants, LCFA are detected by specific receptors located on the apical side of the taste bud cells (TBC) clustered in the taste buds of the gustatory papillae.

2.1 *CD36 Displays Features of a Gustatory Lipid Sensor*

The glycoprotein CD36 belongs to the scavenger receptor family. It is found in tissues involved in lipid absorption, storage, and utilization (e.g., small intestine, adipose tissue, skeletal and cardiac muscles, mammary glands) and in several hematopoietic cells (e.g., monocytes/macrophages, platelets). It is a plasma membrane protein which can bind a large number of ligands, which explains its multifunctional roles (for review see (Martin et al. 2011)). CD36 increases the uptake of LCFA by cardiomyocytes and adipocytes (Coburn et al. 2000; Hajri et al. 2001) and that of oxidized LDL by macrophages (Endemann et al. 1993), modifies platelet aggregation by binding to thrombospondin and collagen (Chen et al. 1997), facilitates the phagocytosis of apoptotic cells by macrophages (Ren et al. 1995), and increases the cytoadhesion of erythrocytes infected with *Plasmodium falciparum* (Oquendo et al. 1989; Febbraio et al. 2001). In addition, CD36 has also recently been shown to play a role in the taste reception of dietary lipids on the tongue (Laugurette et al. 2005; Gaillard et al. 2008). This last finding was surprising since the expression of taste receptors was previously thought to be restricted to TBC. Nevertheless, this dogma has been challenged recently by the identification of sweet and umami taste receptors (T1R) in various tissues including the small intestine, pancreas, liver, kidney, testis, or brain (Dyer et al. 2005; Bezencon et al. 2007; Mace et al. 2009; Nakagawa et al. 2009; Hass et al. 2010; Iwatsuki et al. 2010). Moreover, CD36 displays several features required to be a gustatory lipid sensor. First, it binds saturated and unsaturated LCFA with an affinity in the nanomolar range (Baillie et al. 1996). Second, CD36 expression appears to be

strictly restricted to the apical side of some TBC lining the pore of gustatory papillae in the lingual epithelium of rodents (Fukuwatari et al. 1997; Laugerette et al. 2005) and humans (Simons et al. 2010). Third, it displays a receptor-like structure, with a large extracellular binding pocket (Rac et al. 2007) and a C-terminal cytoplasmic tail able to interact with cell signaling proteins of the Src protein-tyrosine kinase (PTK) family (Huang et al. 1991). This complex is capable of activating cell signaling in TBC in a lipid-dependent manner. Consistent with this assumption, experiments with CD36-positive TBC isolated by immuno-magnetism from mouse circumvallate papillae show that activation of CD36 by LCFA leads to the recruitment and activation of Src-PTK (El-Yassimi et al. 2008). This event triggered a prompt and huge rise in intracellular ionized calcium levels ($[Ca^{2+}]_i$) (Gaillard et al. 2008), leading to the release of serotonin and norepinephrine, neurotransmitters known to activate afferent gustatory nerve fibers (El-Yassimi et al. 2008). It is noteworthy that all steps of this cascade are strictly CD36 dependent since they do not occur in CD36-negative TBC or in CD36-positive TBC pretreated with the pharmacological CD36-binding inhibitor, sulfo-N-succinimidyl oleate ester (SSO) (El-Yassimi et al. 2008). The nucleus of the solitary tract (NST) is the first synaptic relay of gustatory pathway in the brain stem. We have shown that an LCFA deposition onto the tongue induces the neuronal activation of NST areas known to receive afferent fibers from gustatory nerves (i.e., chorda tympani and glossopharyngeal nerves). Interestingly, this activation appears to be CD36 dependent since it is not reproduced in CD36-null mice subjected to an oral LCFA stimulation (Gaillard et al. 2008).

2.2 *Physiological Consequences*

Collectively, these data are in agreement with the role of CD36 as a lipid sensor in the gustatory papillae. This unexpected finding is supported by the fact that the lack of CD36 in oral cavity affects the spontaneous preference for lipids and cephalic phase of the digestion.

2.2.1 **Preference for Fat**

The two-bottle preference test is used for studying the spontaneous preference of animals in a free-choice situation. The use of this simple behavioral paradigm has been at the origin of the first demonstration that the sense of taste is also involved in the oro-sensory detection of dietary lipids. Indeed, rats and mice maintained a strong preference for LCFA-enriched solutions even when olfactory (Takeda et al. 2001; Fukuwatari et al. 2003), somesthetic (Smith et al. 2000; Takeda et al. 2000), and postingestive signals (Tsuruta et al. 1999; Smith et al. 2000; McCormack et al. 2006) were simultaneously minimized. Interestingly, CD36 gene inactivation fully abolishes the spontaneous fat preference in mice subjected

to long-term (i.e., 0.5- and 48-h) two-bottle preference tests (Laugerette et al. 2005). Similar data were reproduced when behavioral tests were performed in conditions minimizing postingestive influences (i.e., preference test during 5 min after the first lick using computer-controlled lickometers) and textural cues (i.e., use of mineral oil as vehicle, unpublished data).

2.2.2 Digestive Anticipation

Oral lipid detection might also provide a physiological advantage by preparing the digestive tract to the incoming dietary lipids. Consistent to this assumption, it has been shown that a fatty acid load in oral cavity is sufficient to enhance protein levels in the pancreatic juice in esophagostomized rats, avoiding postingestive influence (Hiraoka et al. 2003). This change, due to the release of digestive enzymes, appears to be tightly dependent on the type of fatty acids used. Indeed, it was only found with LCFA (Laugerette et al. 2005) known to bind CD36 with a high affinity (Baillie et al. 1996). While similar data were obtained in wild-type mice, this digestive effect was markedly blunted in CD36-null mice (Laugerette et al. 2005). This finding provided the first evidence for an involvement of lingual CD36 in the cephalic phase of digestion. This regulatory reflex loop operates through an activation of NST by the CD36-mediated sensing of dietary lipids in the oral cavity, subsequently stimulating the digestive secretion via the efferent vagus projections.

3 Postoral Sensing of Lipids

Collectively, these data demonstrate that CD36 is a lipid sensor involved in the regulation of eating behavior in the tongue. This finding raises the possibility that CD36 might also play a similar role in other places of the body, as small intestine and brain.

3.1 *In the Small Intestine*

In contrast to other lipid-utilizing cells, enterocytes are subjected to dramatic changes in the fat supply daily. However, in healthy humans, fecal lipid loss remains low even during high-fat challenges (Ross 1993). Specific adaptations explain the efficiency of intestinal fat absorption. The unstirred water layer lining the enterocytes constitutes a unique microclimate characterized by a low pH gradient which induces the protonation of LCFA, facilitating their subsequent membrane permeation. Indeed, neutral LCFA diffuse more easily through a phospholipid bilayer than their corresponding ionized species (Kamp et al. 1993, 1995).

Consistent with this assumption, pharmacological inhibition of proton channels found in the apical side of enterocytes induced a dose-dependent decrease of LCFA uptake in rabbit and rat jejunal sheets (Schoeller et al. 1995). Moreover, the small membrane curvature found in the top of microvilli is favorable for a fast LCFA flip-flop in the phospholipid bilayer (Kleinfeld and Storch 1993; Kleinfeld et al. 1997; Kampf et al. 2006). These specificities explain why passive diffusion plays a significant role in LCFA uptake in the small intestine (for review see (Niot et al. 2009)). This conclusion raises the question of the physiological role played by the plasma membrane lipid-binding proteins found in enterocytes like CD36.

3.1.1 CD36: Lipid Transporter or Lipid Sensor?

CD36 function in the small intestine remains a matter of debate. Because it is involved in the lipid transfer in adipose tissue and heart (for review see (Ibrahimi and Abumrad 2002)) and highly expressed in the duodeno-jejunum, known to be the major site of fat absorption (Poirier et al. 1996), CD36 is generally thought to be a lipid transporter in the gut. However, this conclusion is not consistent with several physiological observations. First, no intestinal malabsorption of LCFA is found in CD36-null mice (Nauli et al. 2006). Second, CD36 gene disruption does not affect LCFA uptake by in situ isolated jejunal loops, an in vivo technical approach known to respect intestinal environment (i.e., intact unstirred water layer, blood and lymph flow, and enteric nervous system) (Tran et al. 2011). Third, there is a rapid lipid-mediated disappearance of CD36 from the brush border membrane of enterocytes (Tran et al. 2011). This process is reminiscent of the progressive desensitization of receptors subjected to permanent ligand stimulation. Fourth, like numerous receptors (Miranda and Sorokin 2007), lipid-induced internalization of CD36 is followed by an ubiquitin/proteasome-mediated degradation in the enterocyte (Tran et al. 2011). Altogether, these observations seem to be more consistent with a role of CD36 as a lipid receptor, as reported in the taste buds, rather than as an efficient lipid transporter.

As a lipid sensor, CD36 might provide real-time information about the presence of lipids in the intestinal lumen, leading to local adaptation of absorption efficiency and providing central information contributing to the regulation of the eating behavior.

3.1.2 Physiological Consequences of the Intestinal Lipid Sensing

During the postprandial period, the presence of energy nutrients in the intestinal lumen triggers various regulatory responses optimizing their absorption and signaling their availability for utilization. It is a complex control not fully known which mobilizes both endocrine and nervous pathways, and requires the presence of specific nutrient receptors in the intestinal mucosa. It has been shown recently that the presence of glucose in the intestinal tube is detected by the heterodimer

T1R2/T1R3, known to be responsible for perception of the sweet taste in gustatory papillae (Mace et al. 2007; Margolskee et al. 2007). In the small intestine, this gluco-reception induces the release of the glucagon-like peptide-1 (GLP-1) by the entero-endocrine L cells, leading to the enhancement of the glucose uptake by the enterocytes and to the inhibition of the eating behavior (Brubaker and Anini 2003; Drucker 2006). It is likely that a similar scenario also exists for the dietary lipids.

Role of Intestinal CD36 in Fat Absorption

An adaptation of the intestinal absorption capacity to the lipid content of the diet has been recently demonstrated (Petit et al. 2007). Food rich in unsaturated fatty acids induces both an increase of intestinal absorptive area, due to a rise in cell proliferation, and a coordinated induction of genes involved in the lipoprotein synthesis. These changes facilitate the production of large chylomicrons rapidly cleared in the blood by the lipoprotein lipase (LPL). They improve the absorption of dietary lipids and their subsequent peripheral use. Such a regulation requires the existence of specific sensors able to detect the presence of lipids in the intestinal lumen. The fact that CD36 gene ablation affects the efficiency of lipoprotein synthesis by the small intestine in the mouse suggests that this lipid receptor plays a significant role in this phenomenon (Nassir et al. 2007). A cytoplasmic accumulation of TG and production of small chylomicrons have been reported during the postprandial period in the CD36-null mice (Drover et al. 2005; Nauli et al. 2006; Masuda et al. 2009). Since chylomicrons of small size are poorly hydrolyzed by the LPL, a blood accumulation of TG is found both in mice and humans deficient in CD36, increasing the atherogenic risk. The molecular mechanism linking luminal lipid sensing by CD36 to lipoprotein synthesis is progressively deciphered. We have recently reported that the lipid-dependent disappearance of CD36 from the brush border membrane of enterocytes is associated with a signaling cascade inducing the expression of genes involved in the lipidation of chylomicrons such as the microsomal triglyceride transfer protein (MTP) and ApoB48 (Tran et al. 2011).

CD36, OEA, and Eating Behavior

Intestinal CD36 is also thought to play a role in the postprandial regulation of eating behavior. Infusion of lipid emulsion into the intestinal lumen is associated with a decrease in the meal frequency (satiety) without change in the meal size (satiation) (Schwartz et al. 2008). Compelling evidence supports the conclusion that this anorexic effect is mediated by the oleoylethanolamine (OEA), an endocannabinoid-like molecule enzymatically released from the plasma membrane precursor phosphatidylethanolamine during the postprandial period (Serrano et al. 2011). In the proximal small intestine, OEA production by enterocytes is stimulated by dietary fat, whereas fasting exerts the opposite effect. Oral and parenteral OEA administration induces an inhibition of the food intake in a dose- and time-dependent manner (Rodriguez de Fonseca

et al. 2001). Targeted overproduction of OEA in the small intestine by luminal infusion of an adenoviral vector driving the OEA synthesis leads to a prolongation of feeding latency (Fu et al. 2008). OEA appears to be a local satiety signal rather than a blood-borne hormone. Indeed, central administration of OEA does affect feeding behavior. By contrast, surgical or pharmacological ablation of vagal afferences in the gut abolishes the effect of OEA on food intake (Rodriguez de Fonseca et al. 2001). The OEA-mediated signal is next relayed by NST in the brain stem. Subsequently, it induces the production of the anorexigenic peptide CART (cocaine-amphetamine-related peptide) in the paraventricular nucleus of hypothalamus and enhances memory consolidation by stimulating neurons in the basolateral complex of amygdala (Serrano et al. 2011). Interestingly, CD36 plays a crucial role in the postprandial production of OEA by the small intestine since it is dramatically decreased in CD36-null mice (Schwartz et al. 2008; Guijarro et al. 2010). The molecular mechanism by which this regulation takes place remains elusive. A role of CD36 in uptake of the OEA precursor oleic acid by intestinal mucosa was suggested. However, it has recently been demonstrated by an *in vivo* experiment that CD36 gene ablation does not affect LCFA uptake (Tran et al. 2011). By contrast, LCFA trigger a CD36-dependent activation of the MAPK^{erk} (mitogen-activated protein kinase) pathway in intestinal mucosa (Tran et al. 2011). These data suggest a role of intestinal CD36 in OEA-mediated satiety as a lipid sensor linking lipid ingestion to eating behavior, rather than as a lipid transporter. How the OEA satiety effect is modulated by the downstream signaling events induced by CD36 is not yet known.

3.2 *In the Brain*

When minute quantities of a lipid emulsion are offered to the brain by a direct infusion into the carotid flow, a decrease in food intake is observed in previously fasted mice (unpublished data). Since blood lipid levels remain unchanged in the experimental conditions used, this finding raises the possibility that a lipid-sensing system also exists in the brain. To directly modulate the feeding behavior, lipids must first cross the blood–brain barrier (BBB) before they are detected by specific lipid-sensitive neurons involved in control of the feeding behavior.

3.2.1 **Role of the Blood–brain Barrier**

The BBB is constituted by high-density capillary endothelial cells linked by tight junctions, pericytes, and astrocyte cell projections which serve of support. It is a selective barrier limiting the transfer of molecules from the bloodstream to the brain. How blood lipids cross the BBB is progressively deciphered. An endothelial lipase generating LCFA from blood, TG has been identified in the BBB (Sovic et al. 2005). Their subsequent transfer toward deeper regions of the brain might be ensured by a set of plasma membrane lipid-binding proteins including fatty acid

transport proteins (FATP) 1 and 4 and CD36 (Mitchell et al. 2011). However, the molecular mechanism by which this vectorial transfer takes place remains elusive. FATP1 and FATP4 share several structural features with acyl-CoA synthetases (ACS) (i.e., high amino acid sequence identity and a comparable predicted structure mainly located at the intracellular side of the plasma membrane) and functional properties (i.e., fatty acid acylation activity), suggesting that these FATP are plasma membrane ACS. Since membranes are impermeable to fatty acyl-CoA, it has been proposed that FATP1 and 4 contribute to the net influx of LCFA into the cells by trapping them as CoA derivatives. If such an ACS function might also contribute to the net transfer of LCFA from blood to the brain through the BBB is not yet known. The fact that FATP1 and 4 gene ablation reduces LCFA transport across human brain microvessel endothelial cells (HBMEC) is consistent with this assumption (Mitchell et al. 2011). However, the precise location of these FATP in BBB remains to be established. CD36 gene is also weakly expressed in HBMEC. Specific siRNA knockdown of CD36 reduces transport of short-, medium-, long-, and very-long-chain fatty acids in HBMEC (Mitchell et al. 2011). These data are unexpected since the binding specificity of CD36 is known to be restricted to fatty acids with a number of carbons ≥ 16 . It suggests a more global role of CD36 in the provision of lipids for the brain than what was reported for FATP. The mechanism by which this CD36-mediated effect takes place remains elusive.

3.2.2 CD36 in the Central Nervous System

Once they have crossed the BBB, fatty acids can act as a satiety signal. Indeed, a direct intracerebroventricular administration of an LCFA leads to a decrease in food intake and in expression of an orexigenic molecule like neuropeptide Y (NPY) in the rat (Obici et al. 2002). This physiological impact takes place through modifications in the firing rate of specific neurons located in hypothalamic areas like the arcuate nucleus (Wang et al. 2006), known to play a crucial role in regulation of eating behavior and energy balance. Electrophysiological approaches have showed that activity of LCFA-sensitive hypothalamic neurons was positively or negatively affected by LCFA (Oomura et al. 1975). One part of these effects appears to be dependent on CD36. Indeed, pharmacological inhibition of CD36-binding activity by SSO leads to a twofold reduction of the excitatory and inhibitory neuronal effects of LCFA in the ventromedial hypothalamic nucleus (Le Foll et al. 2009). How CD36 plays this role remains to be determined.

4 Conclusions and Future Directions

A growing body of evidences supports the conclusion that the multifunctional glycoprotein CD36 plays the role of a lipid sensor involved in the different aspects of eating behavior (i.e., selection of food to eat, memorization of food sources, regulation of food intake). Nevertheless, this oral and postoral lipid-sensing system

appears to be more complex than what was initially thought. Indeed, other putative lipid sensors displaying an affinity for LCFA have recently been identified along the oro-intestinal tract. For instance, the members of the G protein-coupled receptors (GPCR) family, GPR40 and GPR120, raise new questions. Why are different lipid sensors expressed in the body? Do they play complementary or specific roles in the regulation of eating behavior?

The physiological role of this lipid-sensing system might be to build fat stores in times of nutritional abundance to survive periods of food scarcity. Paradoxically, this adaptation, presumably developed during evolution, appears to be especially maladaptive to environment of permanent food plethora and likely contributes to the present epidemic of obesity throughout the world. Alternatively, an inappropriate sensing of dietary lipids might also lead to obesity by altered feeding behavior. Consistent with this hypothesis, it has been reported that obese patients display a higher preference for fatty food than lean subjects (Drewnowski et al. 1984; Mela 1988). Recently, experiments performed in healthy humans have highlighted the relationship between oro-sensory lipid detection and body mass index (BMI). Hypersensitivity to lipids was associated with lower energy consumption, fat intake, and BMI (Stewart et al. 2010). Whether there is a threshold of sensitivity to dietary lipids in humans which is dependent on CD36 and/or GPCR remains to be determined.

Several functional convergences between cells from taste buds and intestinal mucosa have also been highlighted by this new field of investigations, namely, the existence of (1) a common detection system devoted to the sensing of energy nutrients (not only lipids as reported herein but also carbohydrates and amino acid receptors), (2) production of similar hormones (e.g., GLP-1, cholecystokinin (CCK), and others) and expression of their respective receptors, and (3) connection to afferent nerve fibers involved in feeding behavior (i.e., gustatory and vagus nerves). This observation suggests the existence of a “*functional continuum*” along the oro-intestinal tract responsible for the permanent analysis and regulation of ingestion, digestion, absorption, and metabolic fate of energy nutrients. Efficiency of such a detection system requires a local coordination between cells through paracrine and autocrine regulations associated with a permanent dialogue with the brain via neuroendocrine pathways. A continuum being “*a set of elements such that it is possible to pass from one to another continuously,*” we propose that fundamental knowledge derived, for instance, from the oro-sensory tract can be replicable to the small intestine and likely to the brain and reciprocally. There are limitations due to functional specificity of lingual gustatory epithelium, intestinal mucosa, and central nervous system. However, this concept opens new ways of investigations of the early molecular mechanisms responsible for the oro-sensory perception of lipids and their intestinal fate, with consequences for feeding behavior and health.

Acknowledgements This work was supported by the French Research Agency (ANR, sensoFAT project to P.B.) and the Burgundy Council and the Centre National Interprofessionnel de l’Economie Laitière (CNIEL) through the HumanFATaste program (to P.B.).

References

- 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
- Bezencon C, le Coutre J, Damak S (2007) Taste-signaling proteins are coexpressed in solitary intestinal epithelial cells. *Chem Senses* 32:41–49
- Brubaker PL, Anini Y (2003) Direct and indirect mechanisms regulating secretion of glucagon-like peptide-1 and glucagon-like peptide-2. *Can J Physiol Pharmacol* 81:1005–1012
- Chale-Rush A, Burgess JR, Mattes RD (2007) Evidence for human orosensory (taste?) sensitivity to free fatty acids. *Chem Senses* 32:423–431
- Chen CH, Cartwright J Jr, Li Z, Lou S, Nguyen HH, Gotto AM Jr, Henry PD (1997) Inhibitory effects of hypercholesterolemia and ox-LDL on angiogenesis-like endothelial growth in rabbit aortic explants Essential role of basic fibroblast growth factor. *Arteriosclerosis Thrombosis Vasc Biol* 17:1303–1312
- Coburn CT, Knapp FF Jr, Febbraio M, Beets AL, Silverstein RL, Abumrad NA (2000) Defective uptake and utilization of long chain fatty acids in muscle and adipose tissues of CD36 knockout mice. *J Biol Chem* 275:32523–32529
- Drewnowski A, Cohen AE, Faust IM, Grinker JA (1984) Meal-taking behavior is related to predisposition to dietary obesity in the rat. *Physiol Behav* 32:61–67
- Drover VA, Ajmal M, Nassir F, Davidson NO, Nauli AM, Sahoo D, Tso P, Abumrad NA (2005) CD36 deficiency impairs intestinal lipid secretion and clearance of chylomicrons from the blood. *J Clin Invest* 115:1290–1297
- Drucker DJ (2006) The biology of incretin hormones. *Cell Metab* 3:153–165
- Dyer J, Salmon KS, Zibrik L, Shirazi-Beechey SP (2005) Expression of sweet taste receptors of the T1R family in the intestinal tract and enteroendocrine cells. *Biochem Soc Trans* 33:302–305
- 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
- Endemann G, Stanton LW, Madden KS, Bryant CM, White RT, Protter AA (1993) CD36 is a receptor for oxidized low density lipoprotein. *J Biol Chem* 268:11811–11816
- Febbraio M, Hajjar DP, Silverstein RL (2001) CD36: a class B scavenger receptor involved in angiogenesis, atherosclerosis, inflammation, and lipid metabolism. *J Clin Invest* 108:785–791
- Fu J, Kim J, Oveisi F, Astarita G, Piomelli D (2008) Targeted enhancement of oleoylethanolamide production in proximal small intestine induces across-meal satiety in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 295:R45–50
- 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* 414:461–464
- 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* 78:579–583
- 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* 22:1458–1468
- Guijarro A, Fu J, Astarita G, Piomelli D (2010) CD36 gene deletion decreases oleoylethanolamide levels in small intestine of free-feeding mice. *Pharmacol Res* 61:27–33
- Hajri T, Ibrahim A, Coburn CT, Knapp FF Jr, Kurtz T, Pravenec M, Abumrad NA (2001) Defective fatty acid uptake in the spontaneously hypertensive rat is a primary determinant of altered glucose metabolism, hyperinsulinemia, and myocardial hypertrophy. *J Biol Chem* 276:23661–23666
- Hass N, Schwarzenbacher K, Breer H (2010) T1R3 is expressed in brush cells and ghrelin-producing cells of murine stomach. *Cell Tissue Res* 339:493–504
- Hiraoka T, Fukuwatari T, Imaizumi M, Fushiki T (2003) Effects of oral stimulation with fats on the cephalic phase of pancreatic enzyme secretion in esophagostomized rats. *Physiol Behav* 79:713–717

- 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 USA* 88:7844–7848
- Ibrahimi A, Abumrad NA (2002) Role of CD36 in membrane transport of long-chain fatty acids. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 5:139–145
- Iwatsuki K, Nomura M, Shibata A, Ichikawa R, Enciso PL, Wang L, Takayanagi R, Torii K, Uneyama H (2010) Generation and characterization of T1R2-LacZ knock-in mouse. *Biochem Biophys Res Commun* 402:495–499
- Kamp F, Westterhoff HV, Hamilton JA (1993) Movement of fatty acids, fatty acid analogues and bile acids across phospholipid bilayers. *Biochemistry* 32:11074–11086
- Kamp F, Zakim D, Zhang F, Noy N, Hamilton JA (1995) Fatty acid flip-flop in phospholipid bilayers is extremely fast. *Biochemistry* 34:11928–11937
- Kampf JP, Cupp D, Kleinfeld AM (2006) Different mechanisms of free fatty acid flip-flop and dissociation revealed by temperature and molecular species dependence of transport across lipid vesicles. *J Biol Chem* 281:21566–21574
- Kleinfeld AM, Chu P, Romero C (1997) Transport of long-chain native fatty acids across lipid bilayer membranes indicates that transbilayer flip-flop is rate limiting. *Biochemistry* 36:14146–14158
- Kleinfeld AM, Storch J (1993) Transfer of long-chain fluorescent fatty acids between small and large unilamellar vesicles. *Biochemistry* 32:2053–2061
- 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* 115:3177–3184
- Le Foll C, Irani BG, Magnan C, Dunn-Meynell AA, Levin BE (2009) Characteristics and mechanisms of hypothalamic neuronal fatty acid sensing. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 297:R655–664
- Mace OJ, Affleck J, Patel N, Kellett GL (2007) Sweet taste receptors in rat small intestine stimulate glucose absorption through apical GLUT2. *J Physiol* 582:379–392
- Mace OJ, Lister N, Morgan E, Shepherd E, Affleck J, Helliwell P, Bronk JR, Kellett GL, Meredith D, Boyd R, Pieri M, Bailey PD, Pettcrew R, Foley D (2009) An energy supply network of nutrient absorption coordinated by calcium and T1R taste receptors in rat small intestine. *J Physiol* 587:195–210
- Margolskee RF, Dyer J, Kokrashvili Z, Salmon KS, Ilegems E, Daly K, Maillet EL, Ninomiya Y, Mosinger B, Shirazi-Beechey SP (2007) T1R3 and gustducin in gut sense sugars to regulate expression of Na⁺–glucose cotransporter 1. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:15075–15080
- Martin C, Chevrot M, Poirier H, Passilly-Degrace P, Niot I, Besnard P (2011) CD36 as a lipid sensor. *Physiol Behav* 105(1):36–42
- Masuda D, Hirano K, Oku H, Sandoval JC, Kawase R, Yuasa-Kawase M, Yamashita Y, Takada M, Tsubakio-Yamamoto K, Tochino Y, Koseki M, Matsuura F, Nishida M, Kawamoto T, Ishigami M, Hori M, Shimomura I, Yamashita S (2009) Chylomicron remnants are increased in the postprandial state in CD36 deficiency. *J Lipid Res* 50:999–1011
- McCormack DN, Clyburn VL, Pittman DW (2006) Detection of free fatty acids following a conditioned taste aversion in rats. *Physiol Behav* 87:582–594
- Mela DJ (1988) Sensory assessment of fat content in fluid dairy products. *Appetite* 10:37–44
- Miranda M, Sorkin A (2007) Regulation of receptors and transporters by ubiquitination: new insights into surprisingly similar mechanisms. *Mol Interv* 7:157–167
- Mitchell RW, On NH, Del Bigio MR, Miller DW, Hatch GM (2011) Fatty acid transport protein expression in human brain and potential role in fatty acid transport across human brain microvessel endothelial cells. *J Neurochem* 117:735–746
- Nakagawa Y, Nagasawa M, Yamada S, Hara A, Mogami H, Nikolaev VO, Lohse MJ, Shigemura N, Ninomiya Y, Kojima I (2009) Sweet taste receptor expressed in pancreatic beta-cells activates the calcium and cyclic AMP signaling systems and stimulates insulin secretion. *PLoS One* 4:e5106

- Nassir F, Wilson B, Han X, Gross RW, Abumrad NA (2007) CD36 is important for fatty acid and cholesterol uptake by the proximal but not distal intestine. *J Biol Chem* 282:19493–19501
- Nauli AM, Nassir F, Zheng S, Yang Q, Lo CM, Vonlehmden SB, Lee D, Jandacek RJ, Abumrad NA, Tso P (2006) CD36 is important for chylomicron formation and secretion and may mediate cholesterol uptake in the proximal intestine. *Gastroenterology* 131:1197–1207
- Niot I, Poirier H, Tran TT, Besnard P (2009) Intestinal absorption of long-chain fatty acids: evidence and uncertainties. *Prog Lipid Res* 48:101–115
- Obici S, Feng Z, Morgan K, Stein D, Karkaniyas G, Rossetti L (2002) Central administration of oleic acid inhibits glucose production and food intake. *Diabetes* 51:271–275
- Oomura Y, Nakamura T, Sugimori M, Yamada Y (1975) Effect of free fatty acid on the rat lateral hypothalamic neurons. *Physiol Behav* 14:483–486
- Oquendo P, Hundt E, Lawler J, Seed B (1989) CD36 directly mediates cytoadherence of *Plasmodium falciparum* parasitized erythrocytes. *Cell* 58:95–101
- Petit V, Arnould L, Martin P, Monnot MC, Pineau T, Besnard P, Niot I (2007) Chronic high-fat diet affects intestinal fat absorption and postprandial triglyceride levels in the mouse. *J Lipid Res* 48:278–287
- Poirier H, Degrace P, Niot I, Bernard A, Besnard P (1996) Localization and regulation of the putative membrane fatty-acid transporter (FAT) in the small intestine. Comparison with fatty acid-binding proteins (FABP). *Eur J Biochem* 238:368–373
- Rac ME, Safranow K, Poncyljusz W (2007) Molecular basis of human CD36 gene mutations. *Mol Med* 13:288–296
- Ren Y, Silverstein RL, Allen J, Savill J (1995) CD36 gene transfer confers capacity for phagocytosis of cells undergoing apoptosis. *J Exp Med* 181:1857–1862
- Rodriguez de Fonseca F, Navarro M, Gomez R, Escuredo L, Nava F, Fu J, Murillo-Rodriguez E, Giuffrida A, LoVerme J, Gaetani S, Kathuria S, Gall C, Piomelli D (2001) An anorexic lipid mediator regulated by feeding. *Nature* 414:209–212
- Ross AC (1993) Overview of retinoid metabolism. *J Nutr* 123:346–350
- Schoeller C, Keelan M, Mulvey G, Stremmel W, Thomson AB (1995) Oleic acid uptake into rat and rabbit jejunal brush border membrane. *Biochim Biophys Acta* 1236:51–64
- Schwartz GJ, Fu J, Astarita G, Li X, Gaetani S, Campolongo P, Cuomo V, Piomelli D (2008) The lipid messenger OEA links dietary fat intake to satiety. *Cell Metab* 8:281–288
- Serrano A, Pavon FJ, Tovar S, Casanueva F, Senaris R, Dieguez C, de Fonseca FR (2011) Oleoylethanolamide: effects on hypothalamic transmitters and gut peptides regulating food intake. *Neuropharmacology* 60:593–601
- 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(8):839–43
- Smith JC, Fisher EM, Maleszewski V, McClain B (2000) Orosensory factors in the ingestion of corn oil/sucrose mixtures by the rat. *Physiol Behav* 69:135–146
- Sovic A, Panzenboeck U, Wintersperger A, Kratzer I, Hammer A, Levak-Frank S, Frank S, Rader DJ, Malle E, Sattler W (2005) Regulated expression of endothelial lipase by porcine brain capillary endothelial cells constituting the blood–brain barrier. *J Neurochem* 94:109–119
- 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* 104:145–152
- Takeda M, Imaizumi M, Fushiki T (2000) Preference for vegetable oils in the two-bottle choice test in mice. *Life Sci* 67:197–204
- Takeda M, Sawano S, Imaizumi M, Fushiki T (2001) Preference for corn oil in olfactory-blocked mice in the conditioned place preference test and the two-bottle choice test. *Life Sci* 69:847–854
- Tran TT, Poirier H, Clement L, Nassir F, Pelsers MM, Petit V, Degrace P, Monnot MC, Glatz JF, Abumrad NA, Besnard P, Niot I (2011) Luminal lipid regulates CD36 levels and downstream signaling to stimulate chylomicron synthesis. *J Biol Chem* 286(28):25201–10
- Tsuruta M, Kawada T, Fukuwatari T, Fushiki T (1999) The orosensory recognition of long-chain fatty acids in rats. *Physiol Behav* 66:285–288
- Wang R, Cruciani-Guglielmacci C, Migrenne S, Magnan C, Cotero VE, Routh VH (2006) Effects of oleic acid on distinct populations of neurons in the hypothalamic arcuate nucleus are dependent on extracellular glucose levels. *J Neurophysiol* 95:1491–1498

Discussion

L'ensemble des données exposées dans cet article indique qu'il existe de nombreux systèmes de détection des lipides au sein de l'organisme. En effet, en plus de la détection au niveau oral, il existe également une détection aux niveaux intestinal et central. L'hypothalamus est un organe clé dans la régulation de la prise alimentaire, il nous est donc apparu intéressant de regarder quel pourrait être l'impact d'une détection hypothalamique des lipides circulants sur la régulation de la prise alimentaire chez la souris. Des travaux précédents ont montré qu'une injection intracérébroventriculaire pendant 6h d'acide oléique était responsable de la diminution de la prise alimentaire chez la souris (Obici et al. 2002). De plus, il a été démontré que les AGPI étaient capables de traverser la barrière hémato-encéphalique (Q. R. Smith and Nagura 2001). Cependant, l'existence d'une régulation hypothalamique directe de la prise alimentaire par les lipides circulants n'est pas connue. Dans ce but, des expériences comportementales concernant la reprise alimentaire suite à une perfusion carotidienne de TG chez la souris ont été réalisées. Ce travail a été conduit en collaboration avec Serge Luquet et Christophe Magnan (Université Paris Diderot-CNRS EAC 4413) dans le cadre de l'ANR SensoFAT, coordonnée par notre équipe.

Tout d'abord, des souris C57BL6/J ont été opérées afin de leur poser un cathétérisme permanent dans la carotide, en direction du cerveau (**Figure 37**). Après une période de convalescence pendant laquelle les animaux ont reçu des antibiotiques et des anti-douleurs, les expériences ont débuté.

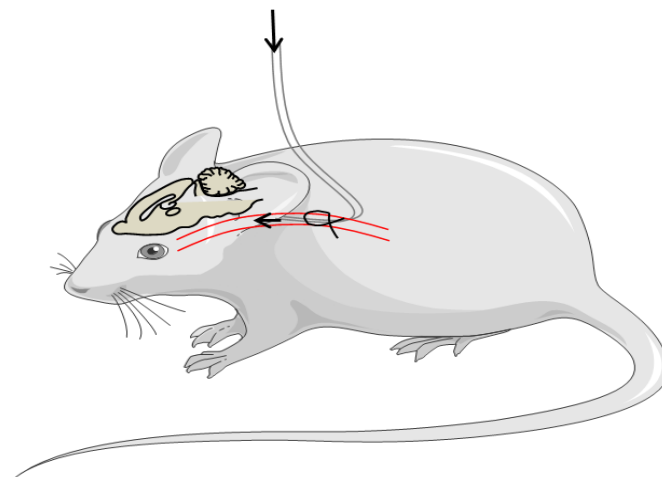


Figure 37 : Illustration du cathétérisme permanent posé dans la carotide, en direction du cerveau d'une souris C57Bl6/J.

Le protocole utilisé pour les expériences est le suivant : après une période de jeûne de 5h pendant la journée, les animaux ont été perfusés dès la tombée de la nuit avec les solutions expérimentales à un débit de $1\mu\text{L}/\text{min}$ pendant 10 minutes. Dès la fin de cette perfusion, les animaux ont eu libre accès à la nourriture et leur prise alimentaire a été mesurée après 30min, 1h, 2h, 3h et 4h (**Figure 38**). Pour les souris témoins, la solution injectée est du sérum physiologique hépariné à 0.4%. Pour les souris traitées, on a injecté de l'intralipide (IL) hépariné à 0.4%. Les solutions ont été héparinées dans le but d'activer la lipoprotéine lipase (LPL) présente au niveau de l'endothélium de la barrière hémato-encéphalique et ainsi d'augmenter la biodisponibilité en AG libres. La concentration et le débit des perfusions d'IL ont été choisis de telle manière que son injection ne s'accompagne pas d'une augmentation du taux de TG plasmatiques.

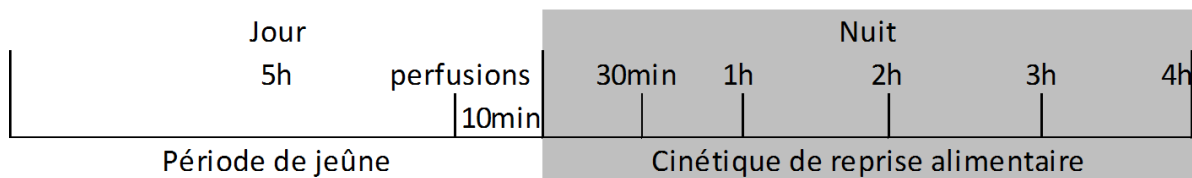


Figure 38 : Protocole de mesure de la reprise alimentaire appliqué chez des souris perfusées avec du sérum physiologique ou de l'intralipide.

Les résultats obtenus indiquent qu'il existe une chute significative de la prise alimentaire chez les souris perfusées avec l'IL dès 1h après l'arrêt de la perfusion, puis cet écart se creuse au fil du temps jusqu'à la fin de l'expérience (**Figure 39**).

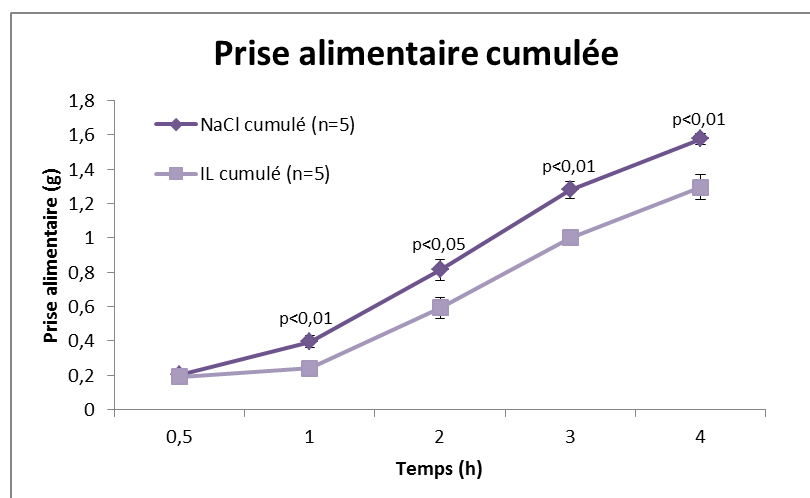


Figure 39 : Cinétique de mesure de la reprise alimentaire pendant 4h chez des souris perfusées avec du sérum physiologique (NaCl) ou de l'intralipide (IL).

Ainsi, ces résultats apportent la preuve directe qu'une régulation de la prise alimentaire par les lipides circulant de l'organisme peut exister. Cependant, les mécanismes impliqués restent méconnus. Des études complémentaires sont nécessaires afin de déterminer si la diminution de la prise alimentaire observée chez les souris suite à une détection hypothalamique des lipides alimentaires est un phénomène entrant en jeu dans le rassasiement et/ou la satiété.

Afin d'approfondir nos recherches sur les mécanismes moléculaires impliqués, des expériences similaires ont été réalisées chez des souris qui ont été perfusées préalablement par un inhibiteur de liaison des AGLC sur le CD36, le SSO ou son véhicule (la pyrrolidone) selon le protocole exposé sur la **Figure 40**.

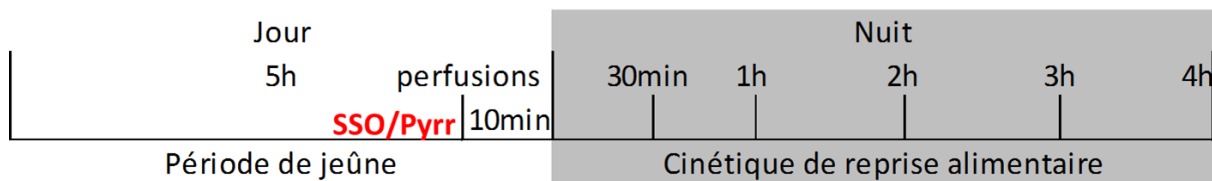


Figure 40 : Protocole de mesure de la reprise alimentaire appliqué chez des souris perfusées, dans un premier temps, avec de la pyrrolidone (Pyrr) ou du SSO, puis dans un second temps, avec du sérum physiologique ou de l'intralipide.

La perfusion de SSO a lieu juste avant la perfusion d'IL ou de sérum physiologique. Le SSO (400 μ M) ou la pyrrolidone ont été perfusés à une vitesse de 1 μ L/min pendant 10 minutes. Dès la fin de cette première perfusion, la seconde perfusion est réalisée. Au final, on obtient 4 groupes expérimentaux dont les résultats sont représentés sur le graphique suivant (**Figure 41**).

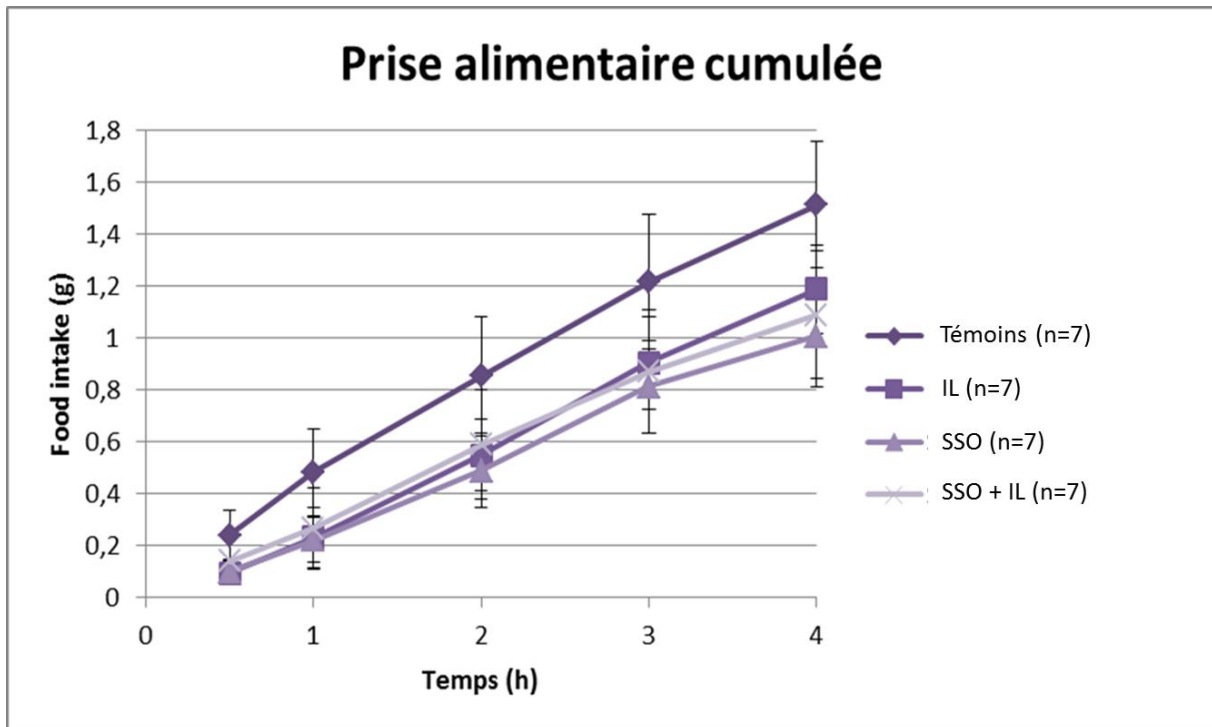


Figure 41 : Cinétique de mesure de la reprise alimentaire pendant 4h chez des souris perfusées, dans un premier temps, avec de la pyrrolidone ou du SSO, puis avec du sérum physiologique ou de l'intralipide (IL).

Les résultats, qui représentent la prise alimentaire cumulée pendant toute l'expérience, font apparaître deux groupes distincts parmi les 4 groupes expérimentaux. Les témoins, perfusés par le véhicule puis le sérum physiologique seul ont une consommation bien supérieure aux 3 autres groupes qui ont reçu soit le SSO seul, soit l'IL seul ou bien les deux. Ainsi, le SSO en tant que tel semble avoir le même effet que l'IL et semble donc diminué la prise alimentaire chez la souris cathétérisée. Ces résultats permettent de montrer de manière indirecte que CD36 semble être impliqué dans ce processus d'inhibition de la prise alimentaire par les lipides circulants. Afin d'approfondir nos résultats, il serait intéressant de réaliser ces mêmes expériences sur des animaux dont le gène codant pour le CD36 a été invalidé. Au regard de la littérature, le rôle joué par CD36 dans ce phénomène pourrait avoir lieu à plusieurs niveaux.

Tout d'abord il a été suggéré que le récepteur membranaire CD36 pourrait jouer un rôle dans le transport des AGL à travers la barrière hémato-encéphalique (Mitchell et al. 2011). Ensuite, des études récentes rapportent que CD36 serait impliqué dans une partie des réponses neuronales observées suite à une stimulation de l'hypothalamus par une injection intracérébroventriculaire directe d'AGLC chez la souris. Dans ces expériences, le site de

liaison des AGLC du CD36 a été bloqué par le SSO en injection directe dans le noyau ventromédian de l'hypothalamus chez le rat, ce qui provoque une inhibition de 50% environ des réponses observées chez des animaux contrôles suite à une stimulation par des AGLC (Le Foll et al. 2009). Enfin, CD36 pourrait également être impliqué au niveau de la signalisation cellulaire. En effet, d'autres résultats rapportés dans ce même article indiquent une mobilisation du calcium intracellulaire et une dépolarisation cellulaire suite à la stimulation des neurones par des AGLC. Ces mécanismes cellulaires, retrouvés également au niveau lingual chez la souris (Dramane et al. 2012; El-Yassimi et al. 2008), sont abolis en partie quand le SSO est utilisé, indiquant l'existence d'une signalisation cellulaire CD36-dépendant au niveau hypothalamique (Le Foll et al. 2009).

Si l'on considère ces données dans leur ensemble, il existe une détection post-absorptive des lipides alimentaires (notamment aux niveaux intestinal et central), impliquant en particulier l'hypothalamus, organe clé de la régulation de la prise alimentaire. Nos résultats inédits apportent la preuve de l'existence d'une détection hypothalamique sensible à des variations très modestes de la triglycémie, provoquant une diminution de la prise alimentaire chez la souris. De plus, ces données suggèrent une implication du lipido-récepteur CD36 dans ce phénomène. Cependant, ces données préliminaires ne permettent pas d'identifier le rôle exact joué par CD36 dans ce mécanisme. Au regard de nos résultats oraux, il est légitime de se demander si l'obésité pourrait également affecter le fonctionnement de ce « sensing » lipidique central, modifiant ainsi le comportement alimentaire (diminution, par exemple, du rassasiement et/ou de la satiété), et favorisant ainsi la surcharge calorique quotidienne des sujets obèses.

Discussion Générale

Au cours de cette thèse, des études ont été menées pour déterminer quels sont les impacts de l'obésité sur la détection oro-sensorielle des lipides à la fois chez l'Homme et chez la souris. Nos résultats obtenus chez l'Homme indiquent que :

1°/ Il n'existe pas de corrélation entre le seuil de détection des AGLC et l'IMC des sujets, contrairement à ce qui avait été suggéré précédemment (Jessica E Stewart et al. 2010).

2°/ Contrairement au sujets sains, il existe au sein de notre cohorte d'obèses des sujets LA non-tasters. Des études de leurs habitudes alimentaires indiquent que ces sujets surconsomment des aliments gras, et notamment des aliments riches en AGS.

3°/ L'augmentation de la triglycéridémie induite par une stimulation orale avec un AGLC n'est pas retrouvée chez les sujets obèses alors qu'elle est considérée comme un marqueur biologique de la lipido-détection orale (Richard D Mattes 2011a).

Afin d'explorer les mécanismes mis en jeu, des études ont été réalisées chez la souris et rapportent que :

4°/ L'obésité induite par l'alimentation entraîne une diminution de la sensibilité pour les lipides chez la souris.

5°/ Ce phénomène semble être dû à une perturbation de la signalisation CD36-dépendante au niveau des cellules gustatives.

6°/ Une faible variation de la triglycéridémie est responsable d'une diminution de la prise alimentaire.

Cette double approche Homme/souris nous a permis d'approfondir et de compléter les données de la littérature avec des résultats inédits suggérant que la détection orale des lipides passe par des mécanismes moléculaires et des effets physiologiques qui sont communs aux deux espèces. Ce point est important pour au moins deux raisons complémentaires. Il indique que 1°/ la détection oro-sensorielle des lipides alimentaires est un système conservé entre des espèces aussi différentes que l'Homme et la souris et que 2°/ le choix de ce modèle souris pour étudier les mécanismes régissant « le goût du gras » est

pertinent. De plus l'approche humaine à l'avantage de positionner ce thème de recherche au cœur d'une problématique cruciale en terme de santé publique en explorant l'impact de l'obésité sur les perturbations oro-sensorielles. Cependant, le travail avec des sujets humains présente ses limites. En effet, il n'y a pas de standardisation alimentaire entre les sujets, lesquels ne sont pas génétiquement équivalents et sont soumis à des influences environnementales très importantes (culturelles, socio-professionnelles, etc...). L'approche « souris » permet de dépasser ces limites, avec une alimentation et un fond génétique qui sont standardisés, constituant ainsi un avantage indéniable pour appréhender des effets physiologiques et comportementaux de faible amplitude, mais dont l'impact cumulé sur la santé peut être important. Les études chez la souris nous ont également permis d'explorer les mécanismes cellulaires et moléculaires mis en jeu, dont l'étude chez l'Homme est impossible.

Un regard critique sur nos résultats suscite plusieurs questionnements, dont les principaux ont été évoqués dans chacune des discussions intermédiaires. En ce qui concerne les expérimentations menées chez l'Homme, il apparaît légitime de se demander, d'une part, pourquoi il existe des résultats différents concernant l'impact de l'obésité sur la détection orale des lipides entre l'approche psycho-physique et l'approche physiologique. Une explication serait que, contrairement à l'approche physiologique qui fait appel à un arc réflexe, le test de mesure de seuils (approche psycho-physique) est soumis à des influences extérieures. D'autre part, pour expliquer l'existence de sujets obèses LA non-tasters, nous avons émis l'hypothèse que ces sujets sont en phase dynamique d'installation de leur obésité. Ces hypothèses sont détaillées p.105 et p.103, respectivement. La principale interrogation sur les travaux menés chez la souris concerne l'explication de la perturbation de la dynamique cellulaire du récepteur CD36 et de la diminution de la signalisation qui en découle. Nos explications à ce sujet concerne notamment une régulation hormono-dépendante où l'insuline, le GLP-1 ou encore la leptine pourraient être impliquées. Cette hypothèse sont développées dans la discussion intermédiaire de l'article n°2, à la p.138. Nous avons donc choisi de développer dans cette discussion générale un point essentiel non encore commenté dans cette thèse, concernant l'intérêt physiologique du pic de TG plasmatiques observé lors d'une stimulation orale avec un AGLC, à la fois chez l'Homme et chez la souris.

Afin d'identifier l'origine de ces TG, nous pouvons nous appuyer sur des études réalisées par R. Mattes sur des sujets humains qui indiquent qu'une stimulation orale avec des lipides alimentaires est responsable d'une augmentation de la sécrétion de TG plasmatiques (R D Mattes 1996; Richard D Mattes 2009b), et que ces TG sont issus en partie des réserves entérocytaires constituées par le repas précédent (Chavez-Jauregui, Mattes, and Parks 2010). Seulement, ces modifications de sécrétions plasmatiques de TG interviennent à long-terme, c'est à dire au bout de quelques heures. Ainsi, les résultats que nous obtenons ne sont pas comparables avec ce qui a été démontré précédemment. En effet, la survenue de l'augmentation du taux de TG circulant seulement quelques minutes après la stimulation orale ne permet pas d'identifier l'intestin comme organe responsable de cette sécrétion. En effet, le temps nécessaire au processus de synthèse des chylomicrons intestinaux puis à leur sécrétion dans la lymphe et enfin de le sang, qui se situe aux alentours de 3 heures (Zhu et al. 2009), n'est pas du tout cohérent avec nos observations. De plus, aucune preuve de la sécrétion directe de TG dans le sang depuis l'intestin n'existe à l'heure actuelle. En revanche, il a été montré précédemment qu'une stimulation orale avec des aliments riches en lipides était responsable, via la boucle céphalique de la digestion, d'une augmentation de la sécrétion hépatique de VLDL dès une heure après la stimulation (Robertson, Mason, and Frayn 2002). Ainsi la piste la plus probable pour expliquer l'augmentation de TG plasmatiques observée dans nos conditions est celle de la sécrétion hépatique de TG *via* des VLDL, suite à une stimulation orale avec des lipides alimentaires.

Il est important de noter que nous ne retrouvons pas ces variations de TG plasmatiques chez les sujets obèses lors de nos expériences. De manière intéressante, ce phénomène est reproduit chez la souris. En effet, des résultats préliminaires suggèrent que les sécrétions précoces de TG observées chez les souris minces ne sont plus retrouvées chez les souris rendues obèses par un régime alimentaire enrichi en AGS (**Figure 42**).

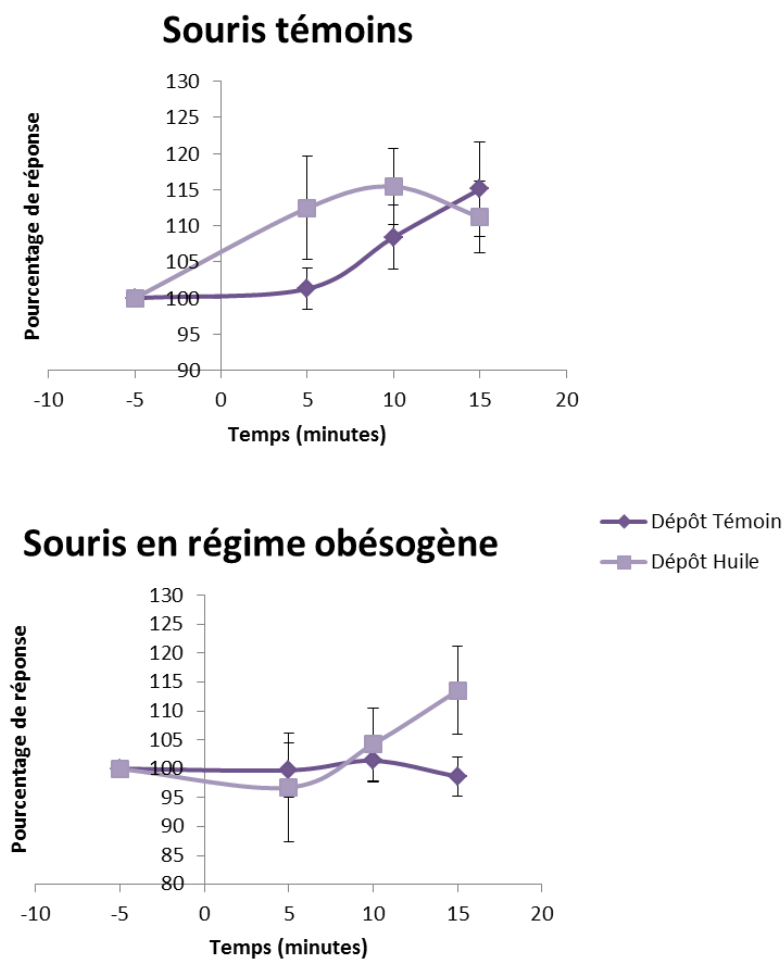


Figure 42 : Cinétique de sécrétion de TG plasmatiques suite à une stimulation orale avec une solution témoin ou contenant 2% d'huile de colza chez des souris minces ou rendues obèses par un régime alimentaire riche en AGS.

Le pic de sécrétion de TG observé chez les souris minces dès 5 minutes après leurs stimulations orales avec une émulsion contenant 2% d'huile de colza est absent chez les souris obèses, confirmant l'impact perturbateur de l'obésité dans ce phénomène.

Quel pourrait être l'intérêt physiologique de cette sécrétion précoce ? Pour cela, il faut mettre en relation les différentes données collectées lors de cette thèse : 1°/ les résultats obtenus chez la souris indiquent que l'injection carotidienne ponctuelle (10min) d'une faible quantité d'Intralipide (solution à 20%, 1µL/min) est à l'origine d'un effet satiétogène (impact sur le rassasiement). Il est très probable que cet effet ait une origine centrale car l'injection carotidienne cible préférentiellement la zone hypothalamique et le protocole utilisé n'entraîne pas de modification périphérique de la triglycéridémie. 2°/ si l'on met en relation la faible augmentation des TG circulants obtenus suite à une perfusion

d'Intralipide et celle observée suite à une stimulation orale avec des lipides alimentaires, on peut émettre l'hypothèse que la lipido-détection orale pourrait contribuer à limiter la taille du repas en cours. Pour évaluer cette hypothèse, des expériences sur de souris C57Bl6/J à jeun depuis la veille ont permis de montrer que le dépôt oral d'une solution contenant de l'huile de colza à 2% dans de la gomme de xanthane s'accompagne d'une diminution de la consommation alimentaire chez ces souris (**Figure 43**). Ainsi, ces résultats laissent à penser que l'augmentation des TG circulants observée suite à une lipido-détection orale chez la souris et chez l'Homme pourrait être à l'origine d'un signal satiétogène précoce, contribuant à réduire la taille du repas en cours. Il est notable que ce schéma régulateur inédit semble ne pas exister chez la souris obèse. Si tel est le cas, on peut penser que l'obésité serait d'autant plus renforcée qu'elle inhibe un mécanisme régulant la limitation de la prise alimentaire. Cette conclusion doit être étayée par des expériences complémentaires.

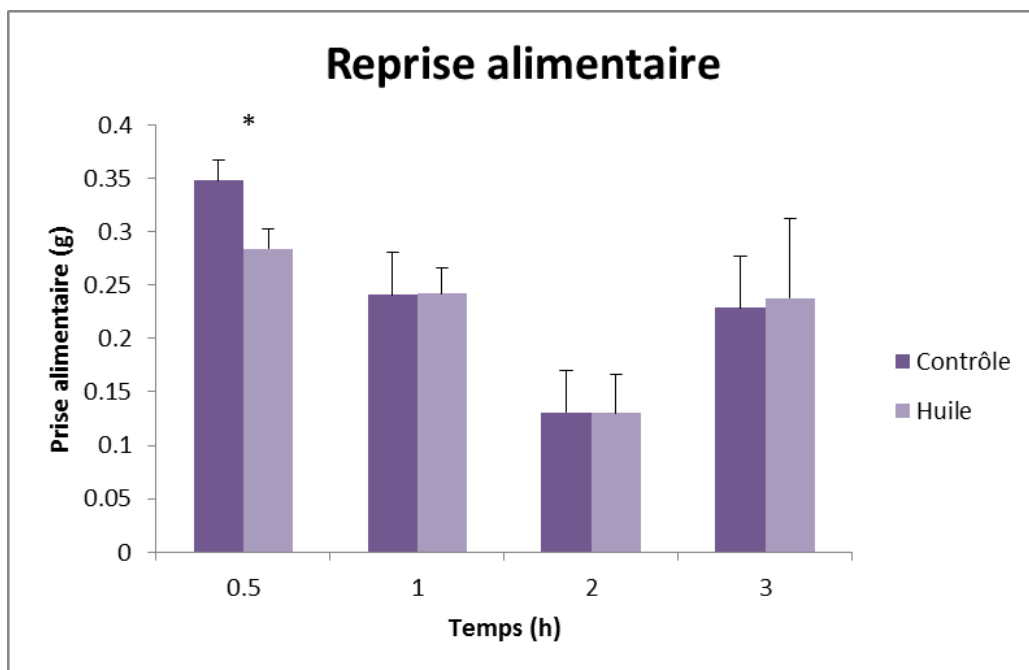


Figure 43 : Mesure de la reprise alimentaire chez la souris suite à un dépôt oral de solution contrôle (gomme de xanthane 0.3%) ou de solution lipidique (contrôle + 2% d'huile de colza).
(*) $p < 0.05$

Nos données chez la souris suggèrent que le récepteur CD36 est impliqué dans l'augmentation de la triglycéridémie suite à un dépôt oral lipidique. De plus, des expériences récentes réalisées sur des souris contrôles ou chez des souris CD36^{-/-} suggèrent que le CD36 lingual chez la souris pourrait également être impliqué dans la régulation de la prise

alimentaire suite à un dépôt oral de lipides. De manière intéressante, le CD36 est une glycoprotéine membranaire hautement conservée au sein du règne animal. Ces données laissent à penser que le CD36 pourrait également être impliqué dans ce phénomène chez l'Homme et des études sur des sujets porteurs du SNP rs1761667 s'avèrent donc nécessaires.

Dans le cadre de cette thèse, il est indispensable de replacer ce mécanisme régulateur affectant le pic précoce de TG plasmatiques dans un schéma régulateur plus global, incluant l'impact de l'obésité sur ce système (**Figure 44**).

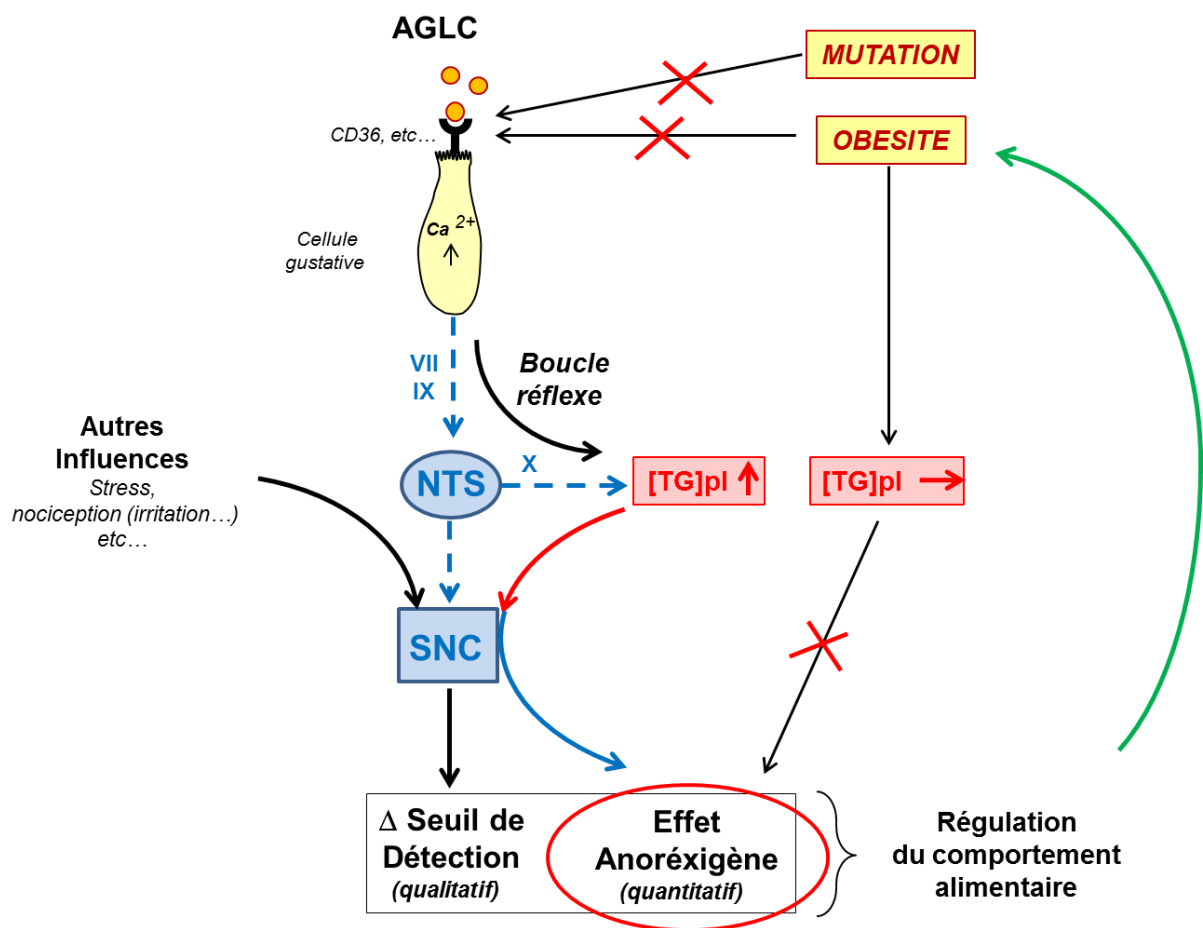


Figure 44 : Représentation schématique des perturbations liées à l'obésité ou aux mutations génétiques sur les mécanismes impliqués dans la lipido-détection orale.

AGLC : acides gras à longues chaînes ; VII, IX, X : nerfs crâniens ; NST : noyau du tractus solitaire ; SNC : système nerveux central ; TG : triglycérides ; HT : hypothalamus (Source : P. Besnard)

La liaison entre un AGLC et son récepteur (CD36 ou autres...) au niveau des cellules gustatives entraîne un signal calcique à l'origine d'une libération de neurotransmetteurs et d'un signal nerveux périphérique, activant des zones gustatives du NTS. Ce message va alors être projeté au niveau central où il sera intégré avec d'autres signaux extérieurs conditionnant ainsi un choix alimentaire (aspect qualitatif). En parallèle, un retour vagal vers la périphérie est à l'origine d'une sécrétion de TG plasmatiques *via* un arc réflexe. La détection de cette petite variation de TG plasmatiques au niveau central contribue, avec d'autres signaux hormonaux et nerveux, à une régulation par anticipation de la taille du repas en cours (aspect quantitatif). L'obésité semble affecter cette double régulation (qualitative et quantitative), perturbant ainsi la prise alimentaire. En effet, on constate 1°/ une augmentation du seuil de détection (chez l'Homme) et une diminution de la sensibilité (chez la souris) pour les lipides, ce qui semble se traduire par l'orientation du choix alimentaire et une augmentation de la consommation d'aliments riches en lipides (chez l'Homme), sans doute pour atteindre un seuil contribuant à un plaisir alimentaire et, 2°/ une disparition du pic précoce de TG plasmatiques, lequel contribuerait au rassasiement. Ces régulations du comportement alimentaire conduisent alors à la création ou au renforcement de l'obésité, créant ainsi un cercle vicieux : obésité → perte de sensibilité aux lipides → consommation accrue de lipides → obésité.

Conclusion et Perspectives

L'ensemble de ces travaux contribue à renforcer l'idée qu'il existe une sixième modalité gustative consacrée à la détection des lipides alimentaires chez la souris et très probablement chez l'Homme. En effet, les résultats inédits obtenus lors de cette thèse démontrent l'existence, pour les deux espèces, d'une détection orale des lipides alimentaires, accompagnée de sécrétions *via* la boucle céphalique de la digestion. Au vue de ces résultats, nous pouvons affirmer l'existence d'un lien entre la lipido-détection orale, la préférence pour les aliments riches en lipides et l'obésité. D'un point de vue de santé publique, il semble alors primordial de s'intéresser à cette relation. D'une part, une perturbation de la lipido-détection orale pourrait être à l'origine d'une obésité. Cet aspect, essentiellement dépendante du profil génétique, concerne très peu de sujets, mais semble avoir des impacts sur l'obésité très dramatiques sur les sujets porteurs. La relation inverse, qui concerne une plus large population, semble plus importante à considérer. En effet, l'apparition d'une obésité chez l'Homme, en raison de multiples causes, touche une part importante et grandissante de la population. Cette obésité semble pouvoir jouer un rôle sur la lipido-détection orale, conduisant une augmentation de la consommation d'aliments riches en énergie et favorisant par la suite le développement et l'entretien de l'obésité. Compte-tenu de notre connaissance encore limitée des mécanismes moléculaires et de régulation de la lipido-détection orale, il semble prématuré d'envisager des approches nutritionnelles et/ou pharmacologiques visant à moduler cette fonction à des fins thérapeutiques. Cependant, l'intérêt croissant pour cet axe de recherche laisse entrevoir que cette étape pourrait être franchie dans un proche avenir.

Bibliographie

- Ackroff, K, M Vigorito, and A Sclafani. 1990. "Fat Appetite in Rats: The Response of Infant and Adult Rats to Nutritive and Non-nutritive Oil Emulsions." *Appetite* 15 (3) (December): 171–188.
- Adler, E, M A Hoon, K L Mueller, J Chandrashekar, N J Ryba, and C S Zuker. 2000. "A Novel Family of Mammalian Taste Receptors." *Cell* 100 (6) (March 17): 693–702.
- Alberti, K. G. M. M., Robert H. Eckel, Scott M. Grundy, Paul Z. Zimmet, James I. Cleeman, Karen A. Donato, Jean-Charles Fruchart, W. Philip T. James, Catherine M. Loria, and Sidney C. Smith. 2009. "Harmonizing the Metabolic Syndrome A Joint Interim Statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity." *Circulation* 120 (16) (October 20): 1640–1645. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.109.192644.
- Bäckhed, Fredrik, Hao Ding, Ting Wang, Lora V Hooper, Gou Young Koh, Andras Nagy, Clay F Semenkovich, and Jeffrey I Gordon. 2004. "The Gut Microbiota as an Environmental Factor That Regulates Fat Storage." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (44) (November 2): 15718–15723. doi:10.1073/pnas.0407076101.
- Baggio, Laurie L, and Daniel J Drucker. 2007. "Biology of Incretins: GLP-1 and GIP." *Gastroenterology* 132 (6) (May): 2131–2157. doi:10.1053/j.gastro.2007.03.054.
- Baillie, A G, C T Coburn, and N A Abumrad. 1996. "Reversible Binding of Long-chain Fatty Acids to Purified FAT, the Adipose CD36 Homolog." *The Journal of Membrane Biology* 153 (1) (September): 75–81.
- Bartel, Dianna L, Susan L Sullivan, Elise G Lavoie, Jean Sévigny, and Thomas E Finger. 2006. "Nucleoside Triphosphate Diphosphohydrolase-2 Is the ecto-ATPase of Type I Cells in Taste Buds." *The Journal of Comparative Neurology* 497 (1) (July 1): 1–12. doi:10.1002/cne.20954.
- Beidler, L M, and R L Smallman. 1965. "Renewal of Cells Within Taste Buds." *The Journal of Cell Biology* 27 (2) (November): 263–272.
- Benoit, Stephen C, Deborah J Clegg, Randy J Seeley, and Stephen C Woods. 2004. "Insulin and Leptin as Adiposity Signals." *Recent Progress in Hormone Research* 59: 267–285.
- Benton, Richard, Kirsten S Vannice, and Leslie B Vosshall. 2007. "An Essential Role for a CD36-related Receptor in Pheromone Detection in *Drosophila*." *Nature* 450 (7167) (November 8): 289–293. doi:10.1038/nature06328.
- Bigiani, A. 2001. "Mouse Taste Cells with Glialike Membrane Properties." *Journal of Neurophysiology* 85 (4) (April): 1552–1560.
- Bigiani, Albertino, Valeria Ghiaroni, and Francesca Fieni. 2003. "Channels as Taste Receptors in Vertebrates." *Progress in Biophysics and Molecular Biology* 83 (3) (November): 193–225.
- Bo, X, A Alavi, Z Xiang, I Oglesby, A Ford, and G Burnstock. 1999. "Localization of ATP-gated P2X2 and P2X3 Receptor Immunoreactive Nerves in Rat Taste Buds." *Neuroreport* 10 (5) (April 6): 1107–1111.
- Bokor, Szilvia, Vanessa Legry, Aline Meirhaeghe, Jonatan R Ruiz, Beatrice Mauro, Kurt Widhalm, Yannis Manios, et al. 2010. "Single-nucleotide Polymorphism of CD36 Locus and Obesity in European Adolescents." *Obesity (Silver Spring, Md.)* 18 (7) (July): 1398–1403. doi:10.1038/oby.2009.412.
- Boucher, Yves, Christopher T Simons, Annick Faurion, Jean Azérad, and E Carstens. 2003. "Trigeminal Modulation of Gustatory Neurons in the Nucleus of the Solitary Tract." *Brain Research* 973 (2) (May 30): 265–274.
- Boughter, J D, Jr, and T A Gilbertson. 1999. "From Channels to Behavior: An Integrative Model of NaCl Taste." *Neuron* 22 (2) (February): 213–215.
- Boughter, J D, Jr, D W Pumplun, C Yu, R C Christy, and D V Smith. 1997. "Differential Expression of Alpha-gustducin in Taste Bud Populations of the Rat and Hamster." *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 17 (8) (April 15): 2852–2858.
- Briscoe, Celia P, Mohammad Tadayyon, John L Andrews, William G Benson, Jon K Chambers, Michelle M Eilert, Catherine Ellis, et al. 2003. "The Orphan G Protein-coupled Receptor GPR40 Is

- Activated by Medium and Long Chain Fatty Acids." *The Journal of Biological Chemistry* 278 (13) (March 28): 11303–11311. doi:10.1074/jbc.M211495200.
- Bruneau, C, C Staedel-Flaig, G Crémel, C Leray, J P Beck, and P Hubert. 1987. "Influence of Lipid Environment on Insulin Binding in Cultured Hepatoma Cells." *Biochimica et Biophysica Acta* 928 (3) (May 18): 287–296.
- Cabanac, M. 1971. "Physiological Role of Pleasure." *Science (New York, N.Y.)* 173 (4002) (September 17): 1103–1107.
- Cartoni, Cristina, Keiko Yasumatsu, Tadahiro Ohkuri, Noriatsu Shigemura, Ryusuke Yoshida, Nicolas Godinot, Johannes le Coutre, Yuzo Ninomiya, and Sami Damak. 2010. "Taste Preference for Fatty Acids Is Mediated by GPR40 and GPR120." *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 30 (25) (June 23): 8376–8382. doi:10.1523/JNEUROSCI.0496-10.2010.
- Chalé-Rush, Angela, John R Burgess, and Richard D Mattes. 2007. "Evidence for Human Orosensory (taste?) Sensitivity to Free Fatty Acids." *Chemical Senses* 32 (5) (June): 423–431. doi:10.1093/chemse/bjm007.
- Chandrashekar, J, K L Mueller, M A Hoon, E Adler, L Feng, W Guo, C S Zuker, and N J Ryba. 2000. "T2Rs Function as Bitter Taste Receptors." *Cell* 100 (6) (March 17): 703–711.
- Chandrashekar, Jayaram, Mark A Hoon, Nicholas J P Ryba, and Charles S Zuker. 2006. "The Receptors and Cells for Mammalian Taste." *Nature* 444 (7117) (November 16): 288–294. doi:10.1038/nature05401.
- Chandrashekar, Jayaram, Christina Kuhn, Yuki Oka, David A Yarmolinsky, Edith Hummler, Nicholas J P Ryba, and Charles S Zuker. 2010. "The Cells and Peripheral Representation of Sodium Taste in Mice." *Nature* 464 (7286) (March 11): 297–301. doi:10.1038/nature08783.
- Chang, G-Q, O Karatayev, R Ahsan, V Gaysinskaya, Z Marwil, and S F Leibowitz. 2007. "Dietary Fat Stimulates Endogenous Enkephalin and Dynorphin in the Paraventricular Nucleus: Role of Circulating Triglycerides." *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism* 292 (2) (February): E561–570. doi:10.1152/ajpendo.00087.2006.
- Chaudhari, N, A M Landin, and S D Roper. 2000. "A Metabotropic Glutamate Receptor Variant Functions as a Taste Receptor." *Nature Neuroscience* 3 (2) (February): 113–119. doi:10.1038/72053.
- Chaudhari, N, and S D Roper. 2010. "The Cell Biology of Taste." *J Cell Biol* (190): 285–296.
- Chavez-Jauregui, Rosa N, Richard D Mattes, and Elizabeth J Parks. 2010. "Dynamics of Fat Absorption and Effect of Sham Feeding on Postprandial Lipema." *Gastroenterology* 139 (5) (November): 1538–1548. doi:10.1053/j.gastro.2010.05.002.
- Choquet, Hélène, Yann Labrune, Franck De Graeve, Anke Hinney, Johannes Hebebrand, André Scherag, Cécile Lecoeur, et al. 2011. "Lack of Association of CD36 SNPs with Early Onset Obesity: a Meta-analysis in 9,973 European Subjects." *Obesity (Silver Spring, Md.)* 19 (4) (April): 833–839. doi:10.1038/oby.2010.226.
- Clapp, T R, L M Stone, R F Margolskee, and S C Kinnamon. 2001. "Immunocytochemical Evidence for Co-expression of Type III IP3 Receptor with Signaling Components of Bitter Taste Transduction." *BMC Neuroscience* 2: 6.
- Clapp, Tod R, Ruibiao Yang, Cristi L Stoick, Sue C Kinnamon, and John C Kinnamon. 2004. "Morphologic Characterization of Rat Taste Receptor Cells That Express Components of the Phospholipase C Signaling Pathway." *The Journal of Comparative Neurology* 468 (3) (January 12): 311–321. doi:10.1002/cne.10963.
- Clément, K, C Vaisse, N Lahlou, S Cabrol, V Pelloux, D Cassuto, M Gormelen, et al. 1998. "A Mutation in the Human Leptin Receptor Gene Causes Obesity and Pituitary Dysfunction." *Nature* 392 (6674) (March 26): 398–401. doi:10.1038/32911.
- Clément, Lionel, Hélène Poirier, Isabelle Niot, Virginie Bocher, Michèle Guerre-Millo, Stéphane Krief, Bart Staels, and Philippe Besnard. 2002. "Dietary Trans-10,cis-12 Conjugated Linoleic Acid Induces Hyperinsulinemia and Fatty Liver in the Mouse." *Journal of Lipid Research* 43 (9) (September): 1400–1409.

- Considine, R V, M K Sinha, M L Heiman, A Kriauciunas, T W Stephens, M R Nyce, J P Ohannesian, C C Marco, L J McKee, and T L Bauer. 1996. "Serum Immunoreactive-leptin Concentrations in Normal-weight and Obese Humans." *The New England Journal of Medicine* 334 (5) (February 1): 292–295. doi:10.1056/NEJM199602013340503.
- Crystal, Susan R, and Karen L Teff. 2006. "Tasting Fat: Cephalic Phase Hormonal Responses and Food Intake in Restrained and Unrestrained Eaters." *Physiology & Behavior* 89 (2) (September 30): 213–220. doi:10.1016/j.physbeh.2006.06.013.
- De Araujo, Ivan E, and Edmund T Rolls. 2004. "Representation in the Human Brain of Food Texture and Oral Fat." *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 24 (12) (March 24): 3086–3093. doi:10.1523/JNEUROSCI.0130-04.2004.
- De Saint Pol, Thibaut. 2007. "Comment Mesurer La Corpulence et Le Poids 'Idéal' ? Histoire, Intérêts et Limites de L'indice de Masse Corporelle" 2007-01, Paris, OSC. Notes & Documents.
- Debas, H T, O Farooq, and M I Grossman. 1975. "Inhibition of Gastric Emptying Is a Physiological Action of Cholecystokinin." *Gastroenterology* 68 (5 Pt 1) (May): 1211–1217.
- DeFazio, Richard A, Gennady Dvoryanchikov, Yutaka Maruyama, Joung Woul Kim, Elizabeth Pereira, Stephen D Roper, and Nirupa Chaudhari. 2006. "Separate Populations of Receptor Cells and Presynaptic Cells in Mouse Taste Buds." *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 26 (15) (April 12): 3971–3980. doi:10.1523/JNEUROSCI.0515-06.2006.
- DeSimone, John A, and Vijay Lyall. 2006. "Taste Receptors in the Gastrointestinal Tract III. Salty and Sour Taste: Sensing of Sodium and Protons by the Tongue." *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology* 291 (6) (December): G1005–1010. doi:10.1152/ajpgi.00235.2006.
- Doi, T, M Liu, R J Seeley, S C Woods, and P Tso. 2001. "Effect of Leptin on Intestinal Apolipoprotein AIV in Response to Lipid Feeding." *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 281 (3) (September): R753–759.
- Dramane, Gado, Souleymane Abdoul-Azize, Aziz Hichami, Timo Vögtle, Simon Akpona, Christophe Chouabe, Hassimi Sadou, Bernhard Nieswandt, Philippe Besnard, and Naim Akhtar Khan. 2012. "STIM1 Regulates Calcium Signaling in Taste Bud Cells and Preference for Fat in Mice." *The Journal of Clinical Investigation* 122 (6) (June 1): 2267–2282. doi:10.1172/JCI59953.
- Dubern, Beatrice, Cecile Lubrano-Berthelier, Monica Mencarelli, Baran Ersoy, Marie-Laure Frelut, Dominique Bouglé, Bruno Costes, et al. 2008. "Mutational Analysis of the Pro-opiomelanocortin Gene in French Obese Children Led to the Identification of a Novel Deleterious Heterozygous Mutation Located in the Alpha-melanocyte Stimulating Hormone Domain." *Pediatric Research* 63 (2) (February): 211–216. doi:10.1203/PDR.0b013e31815ed62b.
- Dvoryanchikov, Gennady, Michael S Sinclair, Isabel Perea-Martinez, Tong Wang, and Nirupa Chaudhari. 2009. "Inward Rectifier Channel, ROMK, Is Localized to the Apical Tips of Glial-like Cells in Mouse Taste Buds." *The Journal of Comparative Neurology* 517 (1) (November 1): 1–14. doi:10.1002/cne.22152.
- Dvoryanchikov, Gennady, Seth M Tomchik, and Nirupa Chaudhari. 2007. "Biogenic Amine Synthesis and Uptake in Rodent Taste Buds." *The Journal of Comparative Neurology* 505 (3) (November 20): 302–313. doi:10.1002/cne.21494.
- Edfalk, Sara, Pär Steneberg, and Helena Edlund. 2008. "Gpr40 Is Expressed in Enteroendocrine Cells and Mediates Free Fatty Acid Stimulation of Incretin Secretion." *Diabetes* 57 (9) (September): 2280–2287. doi:10.2337/db08-0307.
- Elson, Amanda E T, Cedrick D Dotson, Josephine M Egan, and Steven D Munger. 2010. "Glucagon Signaling Modulates Sweet Taste Responsiveness." *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 24 (10) (October): 3960–3969. doi:10.1096/fj.10-158105.
- El-Yassimi, Abdelghani, Aziz Hichami, Philippe Besnard, and Naim Akhtar Khan. 2008. "Linoleic Acid Induces Calcium Signaling, Src Kinase Phosphorylation, and Neurotransmitter Release in

- Mouse CD36-positive Gustatory Cells." *The Journal of Biological Chemistry* 283 (19) (May 9): 12949–12959. doi:10.1074/jbc.M707478200.
- Febbraio, M, D P Hajjar, and R L Silverstein. 2001. "CD36: a Class B Scavenger Receptor Involved in Angiogenesis, Atherosclerosis, Inflammation, and Lipid Metabolism." *The Journal of Clinical Investigation* 108 (6) (September): 785–791. doi:10.1172/JCI14006.
- Finger, Thomas E. 2005. "Cell Types and Lineages in Taste Buds." *Chemical Senses* 30 Suppl 1 (January): i54–55. doi:10.1093/chemse/bjh110.
- Finger, Thomas E, Vicktoria Danilova, Jennell Barrows, Dianna L Bartel, Alison J Vigers, Leslie Stone, Goran Hellekant, and Sue C Kinnamon. 2005. "ATP Signaling Is Crucial for Communication from Taste Buds to Gustatory Nerves." *Science (New York, N.Y.)* 310 (5753) (December 2): 1495–1499. doi:10.1126/science.1118435.
- Finkelstein, Eric A, Justin G Trogdon, Joel W Cohen, and William Dietz. 2009. "Annual Medical Spending Attributable to Obesity: Payer- and Service-specific Estimates." *Health Affairs (Project Hope)* 28 (5) (October): w822–831. doi:10.1377/hlthaff.28.5.w822.
- Frayling, T. M., N. J. Timpson, M. N. Weedon, E. Zeggini, R. M. Freathy, C. M. Lindgren, J. R. B. Perry, et al. 2007. "A Common Variant in the FTO Gene Is Associated with Body Mass Index and Predisposes to Childhood and Adult Obesity." *Science* 316 (5826) (May 11): 889–894. doi:10.1126/science.1141634.
- Friedman, J M, and J L Halaas. 1998. "Leptin and the Regulation of Body Weight in Mammals." *Nature* 395 (6704) (October 22): 763–770. doi:10.1038/27376.
- Fukuwatari, Tsutomu, Katsumi Shibata, Kaori Iguchi, Tomoko Saeki, Akiko Iwata, Kaori Tani, Etsuro Sugimoto, and Tohru Fushiki. 2003. "Role of Gustation in the Recognition of Oleate and Triolein in Anosmic Rats." *Physiology & Behavior* 78 (4-5) (April): 579–583.
- Gaillard, Dany, Fabienne Laugerette, Nicolas Darcel, Abdelghani El-Yassimi, Patricia Passilly-Degrace, Aziz Hichami, Naim Akhtar Khan, Jean-Pierre Montmayeur, and Philippe Besnard. 2008. "The Gustatory Pathway Is Involved in CD36-mediated Orosensory Perception of Long-chain Fatty Acids in the Mouse." *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 22 (5) (May): 1458–1468. doi:10.1096/fj.07-8415com.
- Galal, Osman M. 2002. "The Nutrition Transition in Egypt: Obesity, Undernutrition and the Food Consumption Context." *Public Health Nutrition* 5 (1A) (February): 141–148. doi:10.1079/PHN2001286.
- Galindo, Maria Mercedes, Nadine Voigt, Julia Stein, Jessica van Lengerich, Jan-Dirk Raguse, Thomas Hofmann, Wolfgang Meyerhof, and Maik Behrens. 2012. "G Protein-coupled Receptors in Human Fat Taste Perception." *Chemical Senses* 37 (2) (February): 123–139. doi:10.1093/chemse/bjr069.
- Gao, Na, Min Lu, Fernando Echeverri, Bianca Laita, Dalia Kalabat, Mark E Williams, Peter Hevezi, Albert Zlotnik, and Bryan D Moyer. 2009. "Voltage-gated Sodium Channels in Taste Bud Cells." *BMC Neuroscience* 10: 20. doi:10.1186/1471-2202-10-20.
- Gilbertson, T A, D T Fontenot, L Liu, H Zhang, and W T Monroe. 1997. "Fatty Acid Modulation of K⁺ Channels in Taste Receptor Cells: Gustatory Cues for Dietary Fat." *The American Journal of Physiology* 272 (4 Pt 1) (April): C1203–1210.
- Gilbertson, T A, Tian Yu, and Bhavik P Shah. 2010. "Gustatory Mechanisms for Fat Detection." *Fat Detection: Taste, Texture, and Post Ingestive Effects. Montmayeur JP, Le Coutre J, Editors. Boca Raton (FL): CRC Press. Chapter 3.*
- Gilbertson, Timothy A, and John D Boughter Jr. 2003. "Taste Transduction: Appetizing Times in Gustation." *Neuroreport* 14 (7) (May 23): 905–911. doi:10.1097/01.wnr.0000074346.81633.76.
- Grün, Felix, and Bruce Blumberg. 2009. "Endocrine Disruptors as Obesogens." *Molecular and Cellular Endocrinology* 304 (1-2) (May 25): 19–29. doi:10.1016/j.mce.2009.02.018.
- Guesnet, Philippe, Jean-Marc Alessandri, Pierre Astorg, Fabien Pifferi, and Monique Lavalie. 2005. "Les Rôles Physiologiques Majeurs Exercés Par Les Acides Gras Polyinsaturés (AGPI)." *Oléagineux Corps Gras Lipides* 12: 333–343.

- Hamosh, M, and W A Burns. 1977. "Lipolytic Activity of Human Lingual Glands (Ebner)." *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology* 37 (6) (December): 603–608.
- Harmon, C M, and N A Abumrad. 1993. "Binding of Sulfosuccinimidyl Fatty Acids to Adipocyte Membrane Proteins: Isolation and Amino-terminal Sequence of an 88-kD Protein Implicated in Transport of Long-chain Fatty Acids." *The Journal of Membrane Biology* 133 (1) (April): 43–49.
- Harmon, C M, P Luce, A H Beth, and N A Abumrad. 1991. "Labeling of Adipocyte Membranes by sulfo-N-succinimidyl Derivatives of Long-chain Fatty Acids: Inhibition of Fatty Acid Transport." *The Journal of Membrane Biology* 121 (3) (May): 261–268.
- Heath, R B, R Jones, K N Frayn, and M D Robertson. 2004. "Vagal Stimulation Exaggerates the Inhibitory Ghrelin Response to Oral Fat in Humans." *The Journal of Endocrinology* 180 (2) (February): 273–281.
- Herness, Scott, and Fang-Li Zhao. 2009. "The Neuropeptides CCK and NPY and the Changing View of Cell-to-cell Communication in the Taste Bud." *Physiology & Behavior* 97 (5) (July 14): 581–591. doi:10.1016/j.physbeh.2009.02.043.
- Hiraoka, Takenori, Tsutomu Fukuwatari, Masahiro Imaizumi, and Tohru Fushiki. 2003. "Effects of Oral Stimulation with Fats on the Cephalic Phase of Pancreatic Enzyme Secretion in Esophagostomized Rats." *Physiology & Behavior* 79 (4-5) (September): 713–717.
- Hirasawa, Akira, Takafumi Hara, Susumu Katsuma, Tetsuya Adachi, and Gozoh Tsujimoto. 2008. "Free Fatty Acid Receptors and Drug Discovery." *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 31 (10) (October): 1847–1851.
- Hirasawa, Akira, Keiko Tsumaya, Takeo Awaji, Susumu Katsuma, Tetsuya Adachi, Masateru Yamada, Yukihiko Sugimoto, Shunichi Miyazaki, and Gozoh Tsujimoto. 2005. "Free Fatty Acids Regulate Gut Incretin Glucagon-like Peptide-1 Secretion through GPR120." *Nature Medicine* 11 (1) (January): 90–94. doi:10.1038/nm1168.
- Hoebe, Kasper, Philippe Georgel, Sophie Rutschmann, Xin Du, Suzanne Mudd, Karine Crozat, Sosathya Sovath, et al. 2005. "CD36 Is a Sensor of Diacylglycerides." *Nature* 433 (7025) (February 3): 523–527. doi:10.1038/nature03253.
- Huang, Angela L, Xiaoke Chen, Mark A Hoon, Jayaram Chandrashekar, Wei Guo, Dimitri Tränkner, Nicholas J P Ryba, and Charles S Zuker. 2006. "The Cells and Logic for Mammalian Sour Taste Detection." *Nature* 442 (7105) (August 24): 934–938. doi:10.1038/nature05084.
- Huang, M M, J B Bolen, J W Barnwell, S J Shattil, and J S Brugge. 1991. "Membrane Glycoprotein IV (CD36) Is Physically Associated with the Fyn, Lyn, and Yes Protein-tyrosine Kinases in Human Platelets." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88 (17) (September 1): 7844–7848.
- Huang, Yijen A, Yutaka Maruyama, Robert Stimac, and Stephen D Roper. 2008. "Presynaptic (Type III) Cells in Mouse Taste Buds Sense Sour (acid) Taste." *The Journal of Physiology* 586 (Pt 12) (June 15): 2903–2912. doi:10.1113/jphysiol.2008.151233.
- Huang, Yi-Jen, Yutaka Maruyama, Gennady Dvoryanchikov, Elizabeth Pereira, Nirupa Chaudhari, and Stephen D Roper. 2007. "The Role of Pannexin 1 Hemichannels in ATP Release and Cell-cell Communication in Mouse Taste Buds." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 (15) (April 10): 6436–6441. doi:10.1073/pnas.0611280104.
- Ichimura, Atsuhiko, Akira Hirasawa, Odile Poulain-Godefroy, Amélie Bonnefond, Takafumi Hara, Loïc Yengo, Ikuo Kimura, et al. 2012. "Dysfunction of Lipid Sensor GPR120 Leads to Obesity in Both Mouse and Human." *Nature* 483 (7389) (March 15): 350–354. doi:10.1038/nature10798.
- Imaizumi, M, M Takeda, and T Fushiki. 2000. "Effects of Oil Intake in the Conditioned Place Preference Test in Mice." *Brain Research* 870 (1-2) (July 7): 150–156.
- Ishimaru, Yoshiro, Hitoshi Inada, Momoka Kubota, Hanyi Zhuang, Makoto Tominaga, and Hiroaki Matsunami. 2006. "Transient Receptor Potential Family Members PKD1L3 and PKD2L1 Form a Candidate Sour Taste Receptor." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (33) (August 15): 12569–12574. doi:10.1073/pnas.0602702103.

- Itoh, Yasuaki, Yuji Kawamata, Masataka Harada, Makoto Kobayashi, Ryo Fujii, Shoji Fukusumi, Kazuhiro Ogi, et al. 2003. "Free Fatty Acids Regulate Insulin Secretion from Pancreatic Beta Cells through GPR40." *Nature* 422 (6928) (March 13): 173–176. doi:10.1038/nature01478.
- Jiang, P, M Cui, Q Ji, L Snyder, Z Liu, L Benard, R F Margolskee, R Osman, and M Max. 2005. "Molecular Mechanisms of Sweet Receptor Function." *Chemical Senses* 30 Suppl 1 (January): i17–18. doi:10.1093/chemse/bjh091.
- Junien, Claudine, Catherine Gallou-Kabani, Alexandre Vigé, and Marie-Sylvie Gross. 2005. "[Nutritional Epigenomics of Metabolic Syndrome]." *Médecine Sciences: M/S* 21 Spec No (December): 44–52.
- Katz, Donald B, Miguel A L Nicolelis, and Sidney A Simon. 2002. "Gustatory Processing Is Dynamic and Distributed." *Current Opinion in Neurobiology* 12 (4) (August): 448–454.
- Kawai, Takayuki, and Tohru Fushiki. 2003. "Importance of Lipolysis in Oral Cavity for Orosensory Detection of Fat." *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 285 (2) (August): R447–454. doi:10.1152/ajpregu.00729.2002.
- Kaya, Namik, Tiansheng Shen, Shao-Gang Lu, Fang-Li Zhao, and Scott Herness. 2004. "A Paracrine Signaling Role for Serotonin in Rat Taste Buds: Expression and Localization of Serotonin Receptor Subtypes." *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 286 (4) (April): R649–658. doi:10.1152/ajpregu.00572.2003.
- Keller, Kathleen L, Lisa C H Liang, Johannah Sakimura, Daniel May, Christopher van Belle, Cameron Breen, Elissa Driggin, et al. 2012. "Common Variants in the CD36 Gene Are Associated with Oral Fat Perception, Fat Preferences, and Obesity in African Americans." *Obesity (Silver Spring, Md.)* 20 (5) (May): 1066–1073. doi:10.1038/oby.2011.374.
- Kim, Mi-Ryung, Yuko Kusakabe, Hirohito Miura, Yoichiro Shindo, Yuzo Ninomiya, and Akihiro Hino. 2003. "Regional Expression Patterns of Taste Receptors and Gustducin in the Mouse Tongue." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 312 (2) (December 12): 500–506.
- Kinney, N E, and R W Antill. 1996. "Role of Olfaction in the Formation of Preference for High-fat Foods in Mice." *Physiology & Behavior* 59 (3) (March): 475–478.
- Kliwer, S A, S S Sundseth, S A Jones, P J Brown, G B Wisely, C S Koble, P Devchand, et al. 1997. "Fatty Acids and Eicosanoids Regulate Gene Expression through Direct Interactions with Peroxisome Proliferator-activated Receptors Alpha and Gamma." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94 (9) (April 29): 4318–4323.
- Laugerette, Fabienne, Patricia Passilly-Degrace, Bruno Patris, Isabelle Niot, Maria Febbraio, Jean-Pierre Montmayeur, and Philippe Besnard. 2005. "CD36 Involvement in Orosensory Detection of Dietary Lipids, Spontaneous Fat Preference, and Digestive Secretions." *The Journal of Clinical Investigation* 115 (11) (November): 3177–3184. doi:10.1172/JCI25299.
- Lawton, D M, D N Furness, B Lindemann, and C M Hackney. 2000. "Localization of the Glutamate-aspartate Transporter, GLAST, in Rat Taste Buds." *The European Journal of Neuroscience* 12 (9) (September): 3163–3171.
- Le Foll, Christelle, Boman G Irani, Christophe Magnan, Ambrose A Dunn-Meynell, and Barry E Levin. 2009. "Characteristics and Mechanisms of Hypothalamic Neuronal Fatty Acid Sensing." *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 297 (3) (September): R655–664. doi:10.1152/ajpregu.00223.2009.
- Ley, Ruth E, Fredrik Bäckhed, Peter Turnbaugh, Catherine A Lozupone, Robin D Knight, and Jeffrey I Gordon. 2005. "Obesity Alters Gut Microbial Ecology." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (31) (August 2): 11070–11075. doi:10.1073/pnas.0504978102.
- Liou, Alice P, Xiping Lu, Yoshitatsu Sei, Xilin Zhao, Susanne Pechhold, Ricardo J Carrero, Helen E Raybould, and Stephen Wank. 2011. "The G-protein-coupled Receptor GPR40 Directly Mediates Long-chain Fatty Acid-induced Secretion of Cholecystokinin." *Gastroenterology* 140 (3) (March): 903–912. doi:10.1053/j.gastro.2010.10.012.

- Liu, Lidong, Dane R Hansen, Insook Kim, and Timothy A Gilbertson. 2005. "Expression and Characterization of Delayed Rectifying K⁺ Channels in Anterior Rat Taste Buds." *American Journal of Physiology. Cell Physiology* 289 (4) (October): C868–880. doi:10.1152/ajpcell.00115.2005.
- Liu, Pin, Bhavik P Shah, Stephanie Croasdell, and Timothy A Gilbertson. 2011. "Transient Receptor Potential Channel Type M5 Is Essential for Fat Taste." *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 31 (23) (June 8): 8634–8642. doi:10.1523/JNEUROSCI.6273-10.2011.
- Malendowicz, Ludwik K, Raffaella Spinazzi, Mariola Majchrzak, Magdalena Nowak, Gastone G Nussdorfer, Agnieszka Ziolkowska, Carlo Macchi, and Marcin Trejter. 2003. "Effects of Prolonged Cholecystokinin Administration on Rat Pituitary-adrenocortical Axis: Role of the CCK Receptor Subtypes 1 and 2." *International Journal of Molecular Medicine* 12 (6) (December): 903–909.
- Martin, Bronwen, Yu-Kyong Shin, Caitlin M White, Sunggoan Ji, Wook Kim, Olga D Carlson, Joshua K Napora, et al. 2010. "Vasoactive Intestinal Peptide-null Mice Demonstrate Enhanced Sweet Taste Preference, Dysglycemia, and Reduced Taste Bud Leptin Receptor Expression." *Diabetes* 59 (5) (May): 1143–1152. doi:10.2337/db09-0807.
- Martin, C, M Chevrot, P Passilly-Degrace, and P Besnard. 2010. "Détection Oro-sensorielle Des Lipides Alimentaires : Impacts Sur Le Comportement Alimentaire et La Santé." *Innovations Agronomiques* (10): 81–93.
- Martin, Céline, Michael Chevrot, Hélène Poirier, Patricia Passilly-Degrace, Isabelle Niot, and Philippe Besnard. 2011. "CD36 as a Lipid Sensor." *Physiology & Behavior* 105 (1) (November 30): 36–42. doi:10.1016/j.physbeh.2011.02.029.
- Martin, Celine, Patricia Passilly-Degrace, Michael Chevrot, Deborah Ancel, Steven M Sparks, Daniel J Drucker, and Philippe Besnard. 2012. "Lipid-mediated Release of GLP-1 by Mouse Taste Buds from Circumvallate Papillae: Putative Involvement of GPR120 and Impact on Taste Sensitivity." *Journal of Lipid Research* (August 19). doi:10.1194/jlr.M025874. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22904345>.
- Martin, Céline, Patricia Passilly-Degrace, Dany Gaillard, Jean-François Merlin, Michaël Chevrot, and Philippe Besnard. 2011. "The Lipid-sensor Candidates CD36 and GPR120 Are Differentially Regulated by Dietary Lipids in Mouse Taste Buds: Impact on Spontaneous Fat Preference." *PLoS One* 6 (8): e24014. doi:10.1371/journal.pone.0024014.
- Matsumura, Shigenobu, Ai Eguchi, Takafumi Mizushige, Nobuhide Kitabayashi, Satoshi Tsuzuki, Kazuo Inoue, and Tohru Fushiki. 2009. "Colocalization of GPR120 with phospholipase-Cbeta2 and Alpha-gustducin in the Taste Bud Cells in Mice." *Neuroscience Letters* 450 (2) (January 30): 186–190. doi:10.1016/j.neulet.2008.11.056.
- Matsumura, Shigenobu, Takafumi Mizushige, Takeshi Yoneda, Toshihiko Iwanaga, Satoshi Tsuzuki, Kazuo Inoue, and Tohru Fushiki. 2007. "GPR Expression in the Rat Taste Bud Relating to Fatty Acid Sensing." *Biomedical Research (Tokyo, Japan)* 28 (1) (February): 49–55.
- Matsunami, H, J P Montmayeur, and L B Buck. 2000. "A Family of Candidate Taste Receptors in Human and Mouse." *Nature* 404 (6778) (April 6): 601–604. doi:10.1038/35007072.
- Mattes, R D. 1996. "Oral Fat Exposure Alters Postprandial Lipid Metabolism in Humans." *The American Journal of Clinical Nutrition* 63 (6) (June): 911–917.
- . 2001a. "Oral Exposure to Butter, but Not Fat Replacers Elevates Postprandial Triacylglycerol Concentration in Humans." *The Journal of Nutrition* 131 (5) (May): 1491–1496.
- . 2001b. "The Taste of Fat Elevates Postprandial Triacylglycerol." *Physiology & Behavior* 74 (3) (October): 343–348.
- Mattes, Richard D. 2005. "Fat Taste and Lipid Metabolism in Humans." *Physiology & Behavior* 86 (5) (December 15): 691–697. doi:10.1016/j.physbeh.2005.08.058.
- . 2009a. "Oral Detection of Short-, Medium-, and Long-chain Free Fatty Acids in Humans." *Chemical Senses* 34 (2) (February): 145–150. doi:10.1093/chemse/bjn072.

- . 2009b. "Brief Oral Stimulation, but Especially Oral Fat Exposure, Elevates Serum Triglycerides in Humans." *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology* 296 (2) (February): G365–371. doi:10.1152/ajpgi.90591.2008.
- . 2009c. "Oral Fat Exposure Pattern and Lipid Loading Effects on the Serum Triacylglycerol Concentration of Humans." *Chemosensory Perception* 2 (4) (December 1): 180–185. doi:10.1007/s12078-009-9062-4.
- . 2011a. "Accumulating Evidence Supports a Taste Component for Free Fatty Acids in Humans." *Physiology & Behavior* 104 (4) (September 26): 624–631. doi:10.1016/j.physbeh.2011.05.002.
- . 2011b. "Oral Fatty Acid Signaling and Intestinal Lipid Processing: Support and Supposition." *Physiology & Behavior* 105 (1) (November 30): 27–35. doi:10.1016/j.physbeh.2011.02.016.
- McCormack, Danielle N, Virginia L Clyburn, and David W Pittman. 2006. "Detection of Free Fatty Acids Following a Conditioned Taste Aversion in Rats." *Physiology & Behavior* 87 (3) (March 30): 582–594. doi:10.1016/j.physbeh.2005.12.004.
- Medler, Kathryn F, Robert F Margolskee, and Sue C Kinnamon. 2003. "Electrophysiological Characterization of Voltage-gated Currents in Defined Taste Cell Types of Mice." *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 23 (7) (April 1): 2608–2617.
- Mela, D J. 1988. "Sensory Assessment of Fat Content in Fluid Dairy Products." *Appetite* 10 (1) (February): 37–44.
- Mela, D J, K R Langley, and A Martin. 1994a. "Sensory Assessment of Fat Content: Effect of Emulsion and Subject Characteristics." *Appetite* 22 (1) (February): 67–81. doi:10.1006/appe.1994.1006.
- . 1994b. "No Effect of Oral or Sample Temperature on Sensory Assessment of Fat Content." *Physiology & Behavior* 56 (4) (October): 655–658.
- Meyre, David, Jérôme Delplanque, Jean-Claude Chèvre, Cécile Lecoœur, Stéphane Lobbens, Sophie Gallina, Emmanuelle Durand, et al. 2009. "Genome-wide Association Study for Early-onset and Morbid Adult Obesity Identifies Three New Risk Loci in European Populations." *Nature Genetics* 41 (2) (February): 157–159. doi:10.1038/ng.301.
- Miras, Alexander D, Robert N Jackson, Sabrina N Jackson, Anthony P Goldstone, Torsten Olbers, Timothy Hackenberg, Alan C Spector, and Carel W le Roux. 2012. "Gastric Bypass Surgery for Obesity Decreases the Reward Value of a Sweet-fat Stimulus as Assessed in a Progressive Ratio Task." *The American Journal of Clinical Nutrition* 96 (3) (September): 467–473. doi:10.3945/ajcn.112.036921.
- Mitchell, Ryan W, Ngoc H On, Marc R Del Bigio, Donald W Miller, and Grant M Hatch. 2011. "Fatty Acid Transport Protein Expression in Human Brain and Potential Role in Fatty Acid Transport Across Human Brain Microvessel Endothelial Cells." *Journal of Neurochemistry* 117 (4) (May): 735–746. doi:10.1111/j.1471-4159.2011.07245.x.
- Miura, H, Y Kusakabe, C Sugiyama, M Kawamatsu, Y Ninomiya, J Motoyama, and A Hino. 2001. "Shh and Ptc Are Associated with Taste Bud Maintenance in the Adult Mouse." *Mechanisms of Development* 106 (1-2) (August): 143–145.
- Miura, Hirohito, Yuko Kusakabe, and Shuitsu Harada. 2006. "Cell Lineage and Differentiation in Taste Buds." *Archives of Histology and Cytology* 69 (4) (December): 209–225.
- Miyauchi, Satoshi, Akira Hirasawa, Tomoyo Iga, Ning Liu, Chisato Itsubo, Keiko Sadakane, Takafumi Hara, and Gozoh Tsujimoto. 2009. "Distribution and Regulation of Protein Expression of the Free Fatty Acid Receptor GPR120." *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 379 (4) (April): 427–434. doi:10.1007/s00210-008-0390-8.
- Mizushige, Takafumi, Takayuki Kawai, Shigenobu Matsumura, Takeshi Yoneda, Teruo Kawada, Satoshi Tsuzuki, Kazuo Inoue, and Tohru Fushiki. 2006. "POMC and Orexin mRNA Expressions Induced by Anticipation of a Corn-oil Emulsion Feeding Are Maintained at the High Levels Until Oil Ingestion." *Biomedical Research (Tokyo, Japan)* 27 (5) (October): 227–232.

- Mo, Xiu-Lei, Hong-Kui Wei, Jian Peng, and Ya-Xiong Tao. 2013. "Free Fatty Acid Receptor GPR120 and Pathogenesis of Obesity and Type 2 Diabetes Mellitus." *Progress in Molecular Biology and Translational Science* 114: 251–276. doi:10.1016/B978-0-12-386933-3.00007-8.
- Montague, C T, I S Farooqi, J P Whitehead, M A Soos, H Rau, N J Wareham, C P Sewter, et al. 1997. "Congenital Leptin Deficiency Is Associated with Severe Early-onset Obesity in Humans." *Nature* 387 (6636) (June 26): 903–908. doi:10.1038/43185.
- Montmayeur, J P, C Fenech, S Kusumakshi, Fabienne Laugere, Z Liu, A Wiencis, and U Boehm. 2011. "Screening for G-protein-coupled Receptors Expressed in Mouse Taste Papillae." *Flavour and Fragrance Journal* 26: 223–230.
- Montmayeur, J P, S D Liberles, H Matsunami, and L B Buck. 2001. "A Candidate Taste Receptor Gene Near a Sweet Taste Locus." *Nature Neuroscience* 4 (5) (May): 492–498. doi:10.1038/87440.
- Moran, Timothy H, and Kimberly P Kinzig. 2004. "Gastrointestinal Satiety Signals II. Cholecystokinin." *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology* 286 (2) (February): G183–188. doi:10.1152/ajpgi.00434.2003.
- Nakayama, Ayumi, Hirohito Miura, Yoichiro Shindo, Yuko Kusakabe, Hiroshi Tomonari, and Shuitsu Harada. 2008. "Expression of the Basal Cell Markers of Taste Buds in the Anterior Tongue and Soft Palate of the Mouse Embryo." *The Journal of Comparative Neurology* 509 (2) (July 10): 211–224. doi:10.1002/cne.21738.
- Naor, Z. 1991. "Is Arachidonic Acid a Second Messenger in Signal Transduction?" *Molecular and Cellular Endocrinology* 80 (1-3) (September): C181–186.
- Neel, J V. 1962. "Diabetes Mellitus: a 'Thrifty' Genotype Rendered Detrimental by 'Progress'?" *American Journal of Human Genetics* 14 (December): 353–362.
- Nelson, G M. 1998. "Biology of Taste Buds and the Clinical Problem of Taste Loss." *The Anatomical Record* 253 (3) (June): 70–78.
- Nelson, G M, and T E Finger. 1993. "Immunolocalization of Different Forms of Neural Cell Adhesion Molecule (NCAM) in Rat Taste Buds." *The Journal of Comparative Neurology* 336 (4) (October 22): 507–516. doi:10.1002/cne.903360404.
- Nelson, Greg, Jayaram Chandrashekar, Mark A Hoon, Luxin Feng, Grace Zhao, Nicholas J P Ryba, and Charles S Zuker. 2002. "An Amino-acid Taste Receptor." *Nature* 416 (6877) (March 14): 199–202. doi:10.1038/nature726.
- Neyraud, Eric, Olivier Palicki, Camille Schwartz, Sophie Nicklaus, and Gilles Feron. 2012. "Variability of Human Saliva Composition: Possible Relationships with Fat Perception and Liking." *Archives of Oral Biology* 57 (5) (May): 556–566. doi:10.1016/j.archoralbio.2011.09.016.
- Nishizuka, Y. 1988. "Studies and Prospectives of Protein Kinase C in Signal Transduction." *Nihon Ketsueki Gakkai Zasshi: Journal of Japan Haematological Society* 51 (8) (December): 1321–1326.
- Obici, Silvana, Zhaohui Feng, Kimyata Morgan, Daniel Stein, George Karkanas, and Luciano Rossetti. 2002. "Central Administration of Oleic Acid Inhibits Glucose Production and Food Intake." *Diabetes* 51 (2) (February): 271–275.
- Oh, Da Young, Saswata Talukdar, Eun Ju Bae, Takeshi Imamura, Hidetaka Morinaga, WuQiang Fan, Pingping Li, Wendell J Lu, Steven M Watkins, and Jerrold M Olefsky. 2010. "GPR120 Is an Omega-3 Fatty Acid Receptor Mediating Potent Anti-inflammatory and Insulin-sensitizing Effects." *Cell* 142 (5) (September 3): 687–698. doi:10.1016/j.cell.2010.07.041.
- Otten, W, P A laizzo, and H M Eichinger. 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." *Journal of Lipid Research* 38 (10) (October): 2023–2034.
- Otten, W, C Wirth, P A laizzo, and H M Eichinger. 1993. "A High Omega 3 Fatty Acid Diet Alters Fatty Acid Composition of Heart, Liver, Kidney, Adipose Tissue and Skeletal Muscle in Swine." *Annals of Nutrition & Metabolism* 37 (3): 134–141.
- Overberg, Johanna, Thomas Hummel, Heiko Krude, and Susanna Wiegand. 2012. "Differences in Taste Sensitivity Between Obese and Non-obese Children and Adolescents." *Archives of*

- Disease in Childhood* 97 (12) (December): 1048–1052. doi:10.1136/archdischild-2011-301189.
- Parker, H E, A M Habib, G J Rogers, F M Gribble, and F Reimann. 2009. "Nutrient-dependent Secretion of Glucose-dependent Insulinotropic Polypeptide from Primary Murine K Cells." *Diabetologia* 52 (2) (February): 289–298. doi:10.1007/s00125-008-1202-x.
- Patel, H H, F Murray, and P A Insel. 2008. "G-protein-coupled Receptor-signaling Components in Membrane Raft and Caveolae Microdomains." *Handbook of Experimental Pharmacology* (186): 167–184. doi:10.1007/978-3-540-72843-6_7.
- Pepino, Marta Yanina, Latisha Love-Gregory, Samuel Klein, and Nada A Abumrad. 2012. "The Fatty Acid Translocase Gene CD36 and Lingual Lipase Influence Oral Sensitivity to Fat in Obese Subjects." *Journal of Lipid Research* 53 (3) (March): 561–566. doi:10.1194/jlr.M021873.
- Pérez, Cristian A, Liquan Huang, Mingqing Rong, J Ashot Kozak, Axel K Preuss, Hailin Zhang, Marianna Max, and Robert F Margolskee. 2002. "A Transient Receptor Potential Channel Expressed in Taste Receptor Cells." *Nature Neuroscience* 5 (11) (November): 1169–1176. doi:10.1038/nn952.
- Phillips, M S, Q Liu, H A Hammond, V Dugan, P J Hey, C J Caskey, and J F Hess. 1996. "Leptin Receptor Missense Mutation in the Fatty Zucker Rat." *Nature Genetics* 13 (1) (May): 18–19. doi:10.1038/ng0596-18.
- Pittman, David, Meaghan E Crawley, Cameron H Corbin, and Kimberly R Smith. 2007. "Chorda Tympani Nerve Transection Impairs the Gustatory Detection of Free Fatty Acids in Male and Female Rats." *Brain Research* 1151 (June 2): 74–83. doi:10.1016/j.brainres.2007.03.027.
- Poirier, H, P Degrace, I Niot, A Bernard, and P Besnard. 1996. "Localization and Regulation of the Putative Membrane Fatty-acid Transporter (FAT) in the Small Intestine. Comparison with Fatty Acid-binding Proteins (FABP)." *European Journal of Biochemistry / FEBS* 238 (2) (June 1): 368–373.
- Poirier, Héliène, Jennifer S Shapiro, Roy J Kim, and Mitchell A Lazar. 2006. "Nutritional Supplementation with Trans-10, Cis-12-conjugated Linoleic Acid Induces Inflammation of White Adipose Tissue." *Diabetes* 55 (6) (June): 1634–1641. doi:10.2337/db06-0036.
- Ramirez, I. 1985. "Oral Stimulation Alters Digestion of Intra-gastric Oil Meals in Rats." *The American Journal of Physiology* 248 (4 Pt 2) (April): R459–463.
- Ranganath, L R, J M Beety, L M Morgan, J W Wright, R Howland, and V Marks. 1996. "Attenuated GLP-1 Secretion in Obesity: Cause or Consequence?" *Gut* 38 (6) (June): 916–919.
- Rankinen, Tuomo, Aamir Zuberi, Yvon C Chagnon, S John Weisnagel, George Argyropoulos, Brandon Walts, Louis Pérusse, and Claude Bouchard. 2006. "The Human Obesity Gene Map: The 2005 Update." *Obesity (Silver Spring, Md.)* 14 (4) (April): 529–644. doi:10.1038/oby.2006.71.
- Raybould, Helen E. 2007. "Mechanisms of CCK Signaling from Gut to Brain." *Current Opinion in Pharmacology* 7 (6) (December): 570–574. doi:10.1016/j.coph.2007.09.006.
- Robertson, M Denise, Andrew O Mason, and Keith N Frayn. 2002. "Timing of Vagal Stimulation Affects Postprandial Lipid Metabolism in Humans." *The American Journal of Clinical Nutrition* 76 (1) (July): 71–77.
- Rodríguez de Fonseca, F, M Navarro, R Gómez, L Escuredo, F Nava, J Fu, E Murillo-Rodríguez, et al. 2001. "An Anorexic Lipid Mediator Regulated by Feeding." *Nature* 414 (6860) (November 8): 209–212. doi:10.1038/35102582.
- Savill, J, N Hogg, Y Ren, and C Haslett. 1992. "Thrombospondin Cooperates with CD36 and the Vitronectin Receptor in Macrophage Recognition of Neutrophils Undergoing Apoptosis." *The Journal of Clinical Investigation* 90 (4) (October): 1513–1522. doi:10.1172/JCI116019.
- Schnell, Susanne, Michael Schaefer, and Christof Schöfl. 2007. "Free Fatty Acids Increase Cytosolic Free Calcium and Stimulate Insulin Secretion from Beta-cells through Activation of GPR40." *Molecular and Cellular Endocrinology* 263 (1-2) (January 15): 173–180. doi:10.1016/j.mce.2006.09.013.
- Schneyer, Alan. 2011. "Getting Big on BPA: Role for BPA in Obesity?" *Endocrinology* 152 (9) (September): 3301–3303. doi:10.1210/en.2011-1301.

- Sclafani, Anthony, Steven Zukerman, John I Glendinning, and Robert F Margolskee. 2007. "Fat and Carbohydrate Preferences in Mice: The Contribution of Alpha-gustducin and Trpm5 Taste-signaling Proteins." *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 293 (4) (October): R1504–1513. doi:10.1152/ajpregu.00364.2007.
- Seki, Yoshinori, Lyda Williams, Patricia M Vuguin, and Maureen J Charron. 2012. "Minireview: Epigenetic Programming of Diabetes and Obesity: Animal Models." *Endocrinology* 153 (3) (March): 1031–1038. doi:10.1210/en.2011-1805.
- Serrano, Antonia, Francisco Javier Pavón, Sulay Tovar, Felipe Casanueva, Rosa Señaris, Carlos Diéguez, and Fernando Rodríguez de Fonseca. 2011. "Oleylethanolamide: Effects on Hypothalamic Transmitters and Gut Peptides Regulating Food Intake." *Neuropharmacology* 60 (4) (March): 593–601. doi:10.1016/j.neuropharm.2010.12.007.
- Shah, Bhavik P, Pin Liu, Tian Yu, Dane R Hansen, and Timothy A Gilbertson. 2012. "TRPM5 Is Critical for Linoleic Acid-induced CCK Secretion from the Enteroendocrine Cell Line, STC-1." *American Journal of Physiology. Cell Physiology* 302 (1) (January): C210–219. doi:10.1152/ajpcell.00209.2011.
- Shen, T, N Kaya, F-L Zhao, S-G Lu, Y Cao, and S Herness. 2005. "Co-expression Patterns of the Neuropeptides Vasoactive Intestinal Peptide and Cholecystokinin with the Transduction Molecules Alpha-gustducin and T1R2 in Rat Taste Receptor Cells." *Neuroscience* 130 (1): 229–238. doi:10.1016/j.neuroscience.2004.09.017.
- Shigemura, Noriatsu, Hirohito Miura, Yuko Kusakabe, Akihiro Hino, and Yuzo Ninomiya. 2003. "Expression of Leptin Receptor (Ob-R) Isoforms and Signal Transducers and Activators of Transcription (STATs) mRNAs in the Mouse Taste Buds." *Archives of Histology and Cytology* 66 (3) (August): 253–260.
- Shigemura, Noriatsu, Rie Ohta, Yuko Kusakabe, Hirohito Miura, Akihiro Hino, Kiyoshi Koyano, Kiyohito Nakashima, and Yuzo Ninomiya. 2004. "Leptin Modulates Behavioral Responses to Sweet Substances by Influencing Peripheral Taste Structures." *Endocrinology* 145 (2) (February): 839–847. doi:10.1210/en.2003-0602.
- Shin, Yu-Kyong, Bronwen Martin, Erin Golden, Cedrick D Dotson, Stuart Maudsley, Wook Kim, Hyeung-Jin Jang, et al. 2008. "Modulation of Taste Sensitivity by GLP-1 Signaling." *Journal of Neurochemistry* 106 (1) (July): 455–463. doi:10.1111/j.1471-4159.2008.05397.x.
- Shin, Yu-Kyong, Bronwen Martin, Wook Kim, Caitlin M White, Sunggoan Ji, Yuxiang Sun, Roy G Smith, et al. 2010. "Ghrelin Is Produced in Taste Cells and Ghrelin Receptor Null Mice Show Reduced Taste Responsivity to Salty (NaCl) and Sour (citric Acid) Tastants." *PloS One* 5 (9): e12729. doi:10.1371/journal.pone.0012729.
- Silverstein, Roy L, and Maria Febbraio. 2009. "CD36, a Scavenger Receptor Involved in Immunity, Metabolism, Angiogenesis, and Behavior." *Science Signaling* 2 (72): re3. doi:10.1126/scisignal.272re3.
- Simons, Peter J, J Alain Kummer, Joost J F P Luiken, and Louis Boon. 2011. "Apical CD36 Immunolocalization in Human and Porcine Taste Buds from Circumvallate and Foliate Papillae." *Acta Histochemica* 113 (8) (December): 839–843. doi:10.1016/j.acthis.2010.08.006.
- Simopoulos, Artemis P. 2008. "The Importance of the Omega-6/omega-3 Fatty Acid Ratio in Cardiovascular Disease and Other Chronic Diseases." *Experimental Biology and Medicine (Maywood, N.J.)* 233 (6) (June): 674–688. doi:10.3181/0711-MR-311.
- Smeets, Astrid J P G, and Margriet S Westerterp-Plantenga. 2006. "Satiety and Substrate Mobilization after Oral Fat Stimulation." *The British Journal of Nutrition* 95 (4) (April): 795–801.
- Smith, Jill, Xiong Su, Raafat El-Maghrabi, Philip D Stahl, and Nada A Abumrad. 2008. "Opposite Regulation of CD36 Ubiquitination by Fatty Acids and Insulin: Effects on Fatty Acid Uptake." *The Journal of Biological Chemistry* 283 (20) (May 16): 13578–13585. doi:10.1074/jbc.M800008200.
- Smith, Q R, and H Nagura. 2001. "Fatty Acid Uptake and Incorporation in Brain: Studies with the Perfusion Model." *Journal of Molecular Neuroscience: MN* 16 (2-3) (June): 167–172; discussion 215–221. doi:10.1385/JMN:16:2-3:167.

- Spielman, A I, S D'Abundo, R B Field, and H Schmale. 1993. "Protein Analysis of Human von Ebner Saliva and a Method for Its Collection from the Foliate Papillae." *Journal of Dental Research* 72 (9) (September): 1331–1335.
- Stewart, J E, and R S J Keast. 2012. "Recent Fat Intake Modulates Fat Taste Sensitivity in Lean and Overweight Subjects." *International Journal of Obesity (2005)* 36 (6) (June): 834–842. doi:10.1038/ijo.2011.155.
- Stewart, Jessica E, Christine Feinle-Bisset, Matthew Golding, Conor Delahunty, Peter M Clifton, and Russell S J Keast. 2010. "Oral Sensitivity to Fatty Acids, Food Consumption and BMI in Human Subjects." *The British Journal of Nutrition* 104 (1) (July): 145–152. doi:10.1017/S0007114510000267.
- Stewart, Jessica E, Christine Feinle-Bisset, and Russell S J Keast. 2011. "Fatty Acid Detection During Food Consumption and Digestion: Associations with Ingestive Behavior and Obesity." *Progress in Lipid Research* 50 (3) (July): 225–233. doi:10.1016/j.plipres.2011.02.002.
- Stratford, Jennifer M, Kathleen S Curtis, and Robert J Contreras. 2006. "Chorda Tympani Nerve Transection Alters Linoleic Acid Taste Discrimination by Male and Female Rats." *Physiology & Behavior* 89 (3) (October 30): 311–319. doi:10.1016/j.physbeh.2006.06.009.
- Strobel, A, T Issad, L Camoin, M Ozata, and A D Strosberg. 1998. "A Leptin Missense Mutation Associated with Hypogonadism and Morbid Obesity." *Nature Genetics* 18 (3) (March): 213–215. doi:10.1038/ng0398-213.
- Sumida, C, R Graber, and E Nunez. 1993. "Role of Fatty Acids in Signal Transduction: Modulators and Messengers." *Prostaglandins, Leukotrienes, and Essential Fatty Acids* 48 (1) (January): 117–122.
- Takeda, M, S Sawano, M Imaizumi, and T Fushiki. 2001. "Preference for Corn Oil in Olfactory-blocked Mice in the Conditioned Place Preference Test and the Two-bottle Choice Test." *Life Sciences* 69 (7) (July 6): 847–854.
- Tartaglia, L A, M Dembski, X Weng, N Deng, J Culpepper, R Devos, G J Richards, et al. 1995. "Identification and Expression Cloning of a Leptin Receptor, OB-R." *Cell* 83 (7) (December 29): 1263–1271.
- Thorne, Rick F, Estelle G Law, Craig A Elith, Kylie J Ralston, Richard C Bates, and Gordon F Burns. 2006. "The Association Between CD36 and Lyn Protein Tyrosine Kinase Is Mediated by Lipid." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 351 (1) (December 8): 51–56. doi:10.1016/j.bbrc.2006.09.156.
- Tittelbach, T J, and R D Mattes. 2001. "Oral Stimulation Influences Postprandial Triacylglycerol Concentrations in Humans: Nutrient Specificity." *Journal of the American College of Nutrition* 20 (5) (October): 485–493.
- Tran, Thi Thu Trang, Hélène Poirier, Lionel Clément, Fatiha Nassir, Maurice M A L Pelsers, Valérie Petit, Pascal Degrace, et al. 2011. "Luminal Lipid Regulates CD36 Levels and Downstream Signaling to Stimulate Chylomicron Synthesis." *The Journal of Biological Chemistry* 286 (28) (July 15): 25201–25210. doi:10.1074/jbc.M111.233551.
- Treesukosol, Yada, Ginger D Blonde, Enshe Jiang, Dani Gonzalez, James C Smith, and Alan C Spector. 2010. "Necessity of the Glossopharyngeal Nerve in the Maintenance of Normal Intake and Ingestive Bout Size of Corn Oil by Rats." *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 299 (4) (October): R1050–1058. doi:10.1152/ajpregu.00763.2009.
- Tso, Patrick, and Min Liu. 2004. "Ingested Fat and Satiety." *Physiology & Behavior* 81 (2) (April): 275–287. doi:10.1016/j.physbeh.2004.02.024.
- Tsuruta, M, T Kawada, T Fukuwatari, and T Fushiki. 1999. "The Orosensory Recognition of Long-chain Fatty Acids in Rats." *Physiology & Behavior* 66 (2) (April): 285–288.
- Vaisse, C, K Clement, E Durand, S Herberg, B Guy-Grand, and P Froguel. 2000. "Melanocortin-4 Receptor Mutations Are a Frequent and Heterogeneous Cause of Morbid Obesity." *The Journal of Clinical Investigation* 106 (2) (July): 253–262. doi:10.1172/JCI9238.

- Vaisse, C, K Clement, B Guy-Grand, and P Froguel. 1998. "A Frameshift Mutation in Human MC4R Is Associated with a Dominant Form of Obesity." *Nature Genetics* 20 (2) (October): 113–114. doi:10.1038/2407.
- Van Nieuwenhoven, F A, C P Verstijnen, N A Abumrad, P H Willemsen, G J Van Eys, G J Van der Vusse, and J F Glatz. 1995. "Putative Membrane Fatty Acid Translocase and Cytoplasmic Fatty Acid-binding Protein Are Co-expressed in Rat Heart and Skeletal Muscles." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 207 (2) (February 15): 747–752.
- Vandenbeuch, Aurelie, Tod R Clapp, and Sue C Kinnamon. 2008. "Amiloride-sensitive Channels in Type I Fungiform Taste Cells in Mouse." *BMC Neuroscience* 9: 1. doi:10.1186/1471-2202-9-1.
- Vandenbeuch, Aurelie, Marco Tizzano, Catherine B Anderson, Leslie M Stone, Daniel Goldberg, and Sue C Kinnamon. 2010. "Evidence for a Role of Glutamate as an Efferent Transmitter in Taste Buds." *BMC Neuroscience* 11: 77. doi:10.1186/1471-2202-11-77.
- Wang, He-xing, Ying Zhou, Chuan-xi Tang, Jin-gui Wu, Yue Chen, and Qing-wu Jiang. 2012. "Association Between Bisphenol A Exposure and Body Mass Index in Chinese School Children: a Cross-sectional Study." *Environmental Health* 11 (1) (October 19): 79. doi:10.1186/1476-069X-11-79.
- Waterland, Robert A, and Randy L Jirtle. 2004. "Early Nutrition, Epigenetic Changes at Transposons and Imprinted Genes, and Enhanced Susceptibility to Adult Chronic Diseases." *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)* 20 (1) (January): 63–68.
- Weatherford, S C, D Greenberg, J Gibbs, and G P Smith. 1990. "The Potency of D-1 and D-2 Receptor Antagonists Is Inversely Related to the Reward Value of Sham-fed Corn Oil and Sucrose in Rats." *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior* 37 (2) (October): 317–323.
- Weatherford, S C, G P Smith, and L D Melville. 1988. "D-1 and D-2 Receptor Antagonists Decrease Corn Oil Sham Feeding in Rats." *Physiology & Behavior* 44 (4-5): 569–572.
- Wei, Jie, Yi Lin, Yuanyuan Li, Chenjiang Ying, Jun Chen, Liqiong Song, Zhao Zhou, et al. 2011. "Perinatal Exposure to Bisphenol A at Reference Dose Predisposes Offspring to Metabolic Syndrome in Adult Rats on a High-fat Diet." *Endocrinology* 152 (8) (August): 3049–3061. doi:10.1210/en.2011-0045.
- Wellendorph, Petrine, Lars Dan Johansen, and Hans Bräuner-Osborne. 2010. "The Emerging Role of Promiscuous 7TM Receptors as Chemosensors for Food Intake." *Vitamins and Hormones* 84: 151–184. doi:10.1016/B978-0-12-381517-0.00005-9.
- Wøjdemann, M, O Olsen, P Nørregaard, B Sternby, and J F Rehfeld. 1997. "Gastric Lipase Secretion after Sham Feeding and Cholinergic Blockade." *Digestive Diseases and Sciences* 42 (5) (May): 1070–1075.
- Yang, R, H H Crowley, M E Rock, and J C Kinnamon. 2000. "Taste Cells with Synapses in Rat Circumvallate Papillae Display SNAP-25-like Immunoreactivity." *The Journal of Comparative Neurology* 424 (2) (August 21): 205–215.
- Yang, R, S Tabata, H H Crowley, R F Margolskee, and J C Kinnamon. 2000. "Ultrastructural Localization of Gustducin Immunoreactivity in Microvilli of Type II Taste Cells in the Rat." *The Journal of Comparative Neurology* 425 (1) (September 11): 139–151.
- Yoneda, Takeshi, Katsuyoshi Saitou, Takafumi Mizushige, Shigenobu Matsumura, Yasuko Manabe, Satoshi Tsuzuki, Kazuo Inoue, and Tohru Fushiki. 2007. "The Palatability of Corn Oil and Linoleic Acid to Mice as Measured by Short-term Two-bottle Choice and Licking Tests." *Physiology & Behavior* 91 (2-3) (June 8): 304–309. doi:10.1016/j.physbeh.2007.03.006.
- Zhang, Y, R Proenca, M Maffei, M Barone, L Leopold, and J M Friedman. 1994. "Positional Cloning of the Mouse Obese Gene and Its Human Homologue." *Nature* 372 (6505) (December 1): 425–432. doi:10.1038/372425a0.
- Zhao, Grace Q, Yifeng Zhang, Mark A Hoon, Jayaram Chandrashekar, Isolde Erlenbach, Nicholas J P Ryba, and Charles S Zuker. 2003. "The Receptors for Mammalian Sweet and Umami Taste." *Cell* 115 (3) (October 31): 255–266.
- Zhu, Jiabin, Bonggi Lee, Kimberly K Buhman, and Ji-Xin Cheng. 2009. "A Dynamic, Cytoplasmic Triacylglycerol Pool in Enterocytes Revealed by Ex Vivo and in Vivo Coherent anti-Stokes

Raman Scattering Imaging." *Journal of Lipid Research* 50 (6) (June): 1080–1089.
doi:10.1194/jlr.M800555-JLR200.

Publications et Communications

Publications

Articles, revues :

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

Chevrot M, Martin C, Passilly-Degrace P, Besnard P (2012). Role of CD36 in oral and postoral sensing of lipids. *Handb Exp Pharmacol.* 2012; (209):295-307.

Martin C, Passilly-Degrace P, Gaillard D, Merlin J-F, **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(8): e24014.

Martin C, **Chevrot M**, Poirier H, Passilly-Degrace P, Niot I, Besnard P (2011). CD36 as a lipid sensor. *Physiology & Behavior*, 105, 36-42.

Martin C, **Chevrot M**, Passilly-Degrace P, Besnard P (2010). Détection oro-sensorielle des lipides alimentaires : impacts sur le comportement alimentaire et la santé (*Oro-sensory perception of dietary lipids: impacts on feeding behaviour and health*). *Innovations agronomiques*, 10, 81-93.

Martin C, **Chevrot M**, Passilly-Degrace P, Besnard P (2010). Le goût du « gras » : quoi, comment, pourquoi ? (*Taste of fat: what, how, why?*) Correspondances en MHDN, 2010, vol. 14, n°5, pp. 131-136.

Besnard P, Gaillard D, Passilly-Degrace P, Martin C, **Chevrot M** (2010). Fat and taste perception. *CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources*, 2010, 5, 032, 1-9.

Djaouti L, Jourdan T, Demizieux L, **Chevrot M**, Gresti J, Vergès B, Degrace P (2010). Different effects of pioglitazone and rosiglitazone on lipid metabolism in mouse cultured liver explants. *Diabetes Metab Res Rev.* 2010 May; 26(4): 297-305.

Résumés publiés :

Martin C, **Chevrot M**, Passilly-Degrace P, Gaillard D, Merlin JF, Besnard P (2011). CD36 is regulated by dietary lipids in mouse circumvallate papillae: impact on spontaneous fat preference. *Appetite Volume 57*, supplement 1, S28.

Martin C, **Chevrot M**, Buttet M, Monnot MC, Passilly-Degrace P, Besnard P (2010). Sensing des lipides dans les bourgeons du goût chez la souris : régulation différentielle des lipid-binding proteins CD36 et GPR120. *Nutrition, Aliments Fonctionnels, Aliments Santé (NAFAS)* Volume 8, n° 2, Avril 2010.

Martin C, Gaillard D, **Chevrot M**, Passilly-Degrace P, Besnard P (2009). Comparaison de l'expression de deux lipid-binding proteins, CD36 et GPR120, dans les bourgeons du goût chez la souris. *Nutrition, Aliments Fonctionnels, Aliments Santé (NAFAS)* Volume 7, n° 3, Juin 2009, p63-64.

Communications

Orales :

9^{ème} Congrès de Lipidomique « Lipides & Maladies métaboliques » (GERLI), 17-19 octobre 2012, Paris Jussieu, France.

Chevrot M, Martin C, Enderli G, Passilly-Degrace P, Robin I, Nicklaus S, Issanchou S, Verges B, Besnard P (2012). Obésité et perception oro-sensorielle des lipides alimentaires : impact sur la triglycéridémie et le taux de cholécystokinine.

21th Lipid Binding Proteins (LBP) Workshop, 26-27 janvier 2012, Dijon, France.

Chevrot M, Martin C, Enderli G, Passilly-Degrace P, Robin I, Nicklaus S, Issanchou S, Verges B, Besnard P (2012). Oro-sensory perception of lipids in obese mice and humans.

9^{ème} Journées Francophones de Nutrition (SFN), 07-09 décembre 2011, Reims, France.

Chevrot M, Martin C, Enderli G, Passilly-Degrace P, Robin I, Nicklaus S, Issanchou S, Verges B, Besnard P (2011). Obésité et perception oro-sensorielle des lipides alimentaires : impact sur la triglycéridémie et le taux de cholécystokinine.

The Student Show (séminaire interne à l'UMR U866 Inserm), 20 juin 2011, Dijon, France.

Chevrot M, Martin C, Enderli G, Passilly-Degrace P, Robin I, Nicklaus S, Issanchou S, Verges B, Besnard P (2011). Oral perception of dietary lipids: mechanisms and physiological consequences in mouse and human.

17^{ème} Forum des Jeunes Chercheurs (FJC), 16-17 juin 2011, Dijon, France.

Chevrot M, Martin C, Passilly-Degrace P, Besnard P (2011). La détection orale des lipides alimentaires : mécanismes d'action et conséquences physiologiques chez l'Homme et chez la souris.

Affichées

The 2011 Gordon Research Conference on Molecular & Cellular Biology of Lipids, 17-22 juillet 2011, Waterville, USA.

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.

19th Annual Meeting of the Society for the Study of Ingestive Behavior (SSIB), 12-16 juillet 2011, Clearwater, USA.

Martin C, Passilly-Degrace P, Gaillard D, Merlin JF, **Chevrot M**, Besnard P (2011). CD36 is regulated by dietary lipids in mouse circumvallate papillae: impact on spontaneous fat preference.

6^{ème} congrès Vitagora « Goût Nutrition, Santé », 23-24 mars 2011, Dijon, France.

Chevrot M, Martin C, Luquet S, Passilly-Degrace P, Magnan C, Besnard P (2011). Lipid-sensing hypothalamique chez la souris : impact sur la régulation de la prise alimentaire et implication de CD36.

16^{ème} Forum des Jeunes Chercheurs (FJC), 7-8 juin 2010, Besançon, France.

Chevrot M, Martin C, Passilly-Degrace P, Besnard P (2010). Impacts plasmatiques d'une stimulation lipidique orale chez la souris set chez le volontaire sain. *1er prix poster de la session « Biologie cellulaire et moléculaire animale »*

30th Blankenese Conference "Sensory and Metabolic Control of Energy Balance", 8-12 mai 2010, Hambourg, Allemagne.

Martin C, **Chevrot M**, Buttet M, Monnot MC, Passilly-Degrace P, Besnard P (2010). Lipid sensing in mice taste buds: differential regulation of CD36 and GPR120.

5^{ème} congrès Vitagora « Goût Nutrition Santé », 23-24 mars 2010, Dijon, France.

Martin C, **Chevrot M**, Buttet M, Monnot MC, Passilly-Degrace P, Besnard P (2010). Sensing des lipides dans les bourgeons du goût chez la souris : régulation différentielle des lipid-binding proteins CD36 et GPR120.

15^{ème} Forum des Jeunes Chercheurs (FJC), 25-26 juin 2009, Dijon, France.

Martin C, Gaillard D, **Chevrot M**, Passilly-Degrace P, Besnard P (2009). Comparaison de l'expression de deux lipid-binding proteins, CD36 et GPR120, dans les bourgeons du goût chez la souris.

4^{ème} congrès Vitagora « Goût Nutrition Santé », 18-20 mars 2009, Dijon, France.

1/ Martin C, Gaillard D, **Chevrot M**, Passilly-Degrace P, Besnard P (2009). Comparaison de l'expression de deux lipid-binding proteins, CD36 et GPR120, dans les bourgeons du goût chez la souris.

2/ Gaillard D, Martin C, Passilly-Degrace P, **Chevrot M**, Besnard P (2009). Lingual CD36 expression: regulation by lipids and consequences on spontaneous fat preference in the mouse.

❖ Author's Choice

ASBMB

JOURNAL OF LIPID RESEARCH



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

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

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

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

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

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

This work was supported by the Burgundy Council and Centre National Interprofessionnel de l'Economie Laitière (CNIEL) (HumanFATaste program to P.B.), C.M. and M.C. are fellows of HumanFATaste program. D.J.D. is supported by a Canada Research Chair in Regulatory Peptides, a Banting and Best Diabetes Centre Novo Nordisk Chair in Incretin Biology, and by Operating Grant OG-3-11-3270-DD from the Canadian Diabetes Association.

*Author's Choice—Final version full access.

Manuscript received 1 March 2012 and in revised form 9 August 2012.

Published, JLR Papers in Press, August 14, 2012

DOI 10.1194/jlr.M025874

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

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

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

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

¹To whom correspondence should be addressed.

e-mail: pbesnard@u-bourgogne.fr

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

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



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

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

MATERIALS AND METHODS

Ethics statement

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

Animals

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

Behavioral experiments

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

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

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

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

Papillae isolation

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

Tissue culture of CVPs

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

Compound profiling in recombinant GPR120 receptor assay using intracellular calcium mobilization

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

the chimeric G-protein Gα16 according to established protocols (19). In brief, cells were plated to a density of 2×10^5 cells/ml in cell culture medium containing human GPR120 (0.25%, v/v), mouse GPR120 (0.5%, v/v), or rat GPR120 (0.8%, v/v) BacMam virus. Gα16 BacMam virus (0.12%, v/v) was also transduced in preparation of recombinant human GPR120 cells to allow efficient coupling of the human GPR120 receptor to the phospholipase C pathway. This solution of cells/virus mixture was then plated at a density of 10^4 cells/well and cultured at 37°C, 5% CO₂, 95% humidity for 24 h. Functional EC₅₀ studies were performed in cells incubated with HBSS containing the cytoplasmic calcium indicator Fluo-4 dye in the acetylmethyl form (4 mM), 2.5 mM probenecid, and 250 μM Brilliant Black at 37°C for 60 min. Compound plates were generated containing 3% DMSO in dye loading buffer. Compounds (i.e., GPR120 agonist GSK137647A or histamine for host untransduced U2OS cells) were added to the cells at a 1:3 dilution, and calcium mobilization was measured using a fluorescence image plate reader (Molecular Devices). Data were converted into normalized responses with respect to assay standards GSK137647A (for GPR120) or histamine (for host U2OS cells). Data were further analyzed using a four-parameter fit to calculate EC₅₀ values.

Real-time RT-PCR

Total RNA from CVPs and surrounding nongustatory epithelium (negative control) was extracted using RNeasy mini-columns (Qiagen). Genomic DNA digestion was performed using the RNase-free DNase set (Qiagen). First-strand cDNA was generated by reverse transcription from total RNA (Omniscript Reverse Transcription; Qiagen). Levels of mRNA transcripts were determined by real-time RT-PCR (StepOnePlus apparatus; Applied Biosystems). RNA levels were normalized against levels of 36B4 RNA transcripts. Primer probe sets were designed with the Primer3 software tool using gene sequences, either from the GenBank database or purchased directly from Applied Biosystems. PCR amplification was done using Sybrgreen (Power SYBR Green PCR Master Mix; Applied Biosystems) or Taqman (Universal Taqman PCR Master Mix; Applied Biosystems) technology. The oligonucleotide sequences of primers and probes are shown in Table 1. The comparative 2^{-ΔΔCT} method was used for relative quantification (20).

Western blotting

Samples were homogenized using a micro-potter in a tris/sodium/EDTA buffer (50 mM Tris HCl, 150 mM NaCl, 1 mM

EDTA, 1% nonidet P.40). Protein concentration in homogenates was assayed using a bicinchoninic acid kit (Perkin Elmer). After being separated by SDS-PAGE, proteins were transferred to a polyvinylidene difluoride membrane by electroblotting. After being blocked using a TBS buffer containing 5% BSA and 0.05% Tween 20, membranes were incubated overnight at 4°C with an anti-CD36 primary antibody raised in goat (1:1,000 dilution; R&D Systems) or an anti-GPR120 primary antibody raised in rabbit (1:1,000 dilution; MBL International Corp.). After a set of washes, an appropriate peroxidase-conjugated secondary antibody was added (Santa Cruz Biotechnology). Antibody labeling was detected by chemiluminescence (ECL-plus reagent; Perkin Elmer). GAPDH was used as an internal reference protein.

Immunohistochemistry

CVPs from wild-type mice were fixed for 2–3 h in 4% paraformaldehyde, cryoprotected overnight with 30% sucrose in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4), and then embedded in OCT medium (Tissue-Tek; Sakura Finetek). Cryostat sections (10 μm) were air dried for 2 h at room temperature and then rehydrated in 0.1 M PBS (pH 7.4) for 10 min. Rehydrated sections were incubated for 1 h with PBS containing 0.3% Triton X-100, 30 min with PBS 50 mM glycine, and then blocked with 10% FA-free BSA in PBS for 40 min. Next, the slices were incubated overnight at 4°C with an anti-GPR120 primary antibody raised in rabbit (1:500 dilution; MBL). Specificity of the GPR120 antibody has been documented elsewhere (11). After washing, sections were incubated for 1 h at room temperature with a fluorescent anti-rabbit secondary antibody (Alexa 568, 1:1,000 dilution; Invitrogen). After washing, slices were blocked again before adding an anti-CD36 primary antibody raised in goat (1:250 dilution; R&D Systems) or an anti-GLP-1 primary antibody raised in goat (1:100 dilution; Santa Cruz Biotechnology). This GLP-1 antibody was used elsewhere (21). Sections were next incubated with a fluorescent anti-goat secondary antibody (Alexa 488, 1:1,000 dilution; Invitrogen) and then counterstained with Hoechst reactive (0.05 mg/ml; Sigma-Aldrich) to stain the nuclei. Slices were analyzed under a confocal microscope (Leica). In no cases was fluorescent staining observed when the primary antibody was omitted.

Statistics

Results are expressed as mean ± SEM. The significance of differences between groups was evaluated with SigmaStat (Systat Software; Germany). We first checked that the data for each

TABLE 1. Sequences and GenBank numbers of primers employed for RT-PCR amplifications

Gene name	Nucleotides sequences (5'→3') or Applied Biosystems Taqman Assay ID details	PubMed accession number
CD36	Forward: GGCCAAGCTATTGCGACATG Probe: CACAGACGCGAGCCTCTTCCACCT Reverse: CCGAACACAGCGTAGATAGAC	NM_007643
GPR120	Mm01198944_m1	NM_181748
α-Gustducin	Forward: ACACATTGCAGTCCATCCTAGC Probe: TGAAGTTGTTCTTGGTCTCTCCGCTCC Reverse: ATCACCATCTTCTAGTCTATTGGCC	XM_144196
PLCβ2	Forward: GGCTTGAGTTCAICGTCAIT Reverse: ACTGCCCTGTCTTTTCCCTA	NM_177568
T1R2	Forward: CCGCCAGGCTTCTTCCACC Probe: TTGCTTCTCCGCTCTGCCTCTCCTGC Reverse: AGCGCACACAATCTGGAAGG	NM_031873.1
IP3R3	Forward: ACGGAGCTGCCACATTTAT Reverse: CTCGTCTCTTCTACGATCTC	NM_080553
36B4	Forward: GCCACCTGGACAACAACCC Probe: AGGTCTCTTGGTGAACACGAAAGCC Reverse: GCCAACAGCATATCCGGAATC	NM_007475
T1R3	Mm00473459_g1	NM_031872.2
SGLT1	Mm0041203_m1	NM_019810.4
TRPM5	Mm00498453_m1	NM_020277.2

group were normally distributed and that variances were equal and then carried out ANOVA, two-tailed Student's *t*-test, or Mann-Whitney tests. A *P* value of less than 0.05 was considered to be statistically significant.

RESULTS

LCFAs enhance the GLP-1-mediated induction of sweet-taste sensitivity

To explore the mechanisms by which GLP-1 can affect sweet-taste sensitivity, drinking behavior of wild-type and *Glp1r*^{-/-} mice was compared using computer-controlled lickometers and a brief access procedure (1 min). Consistent with published data (16), functional disruption of the *Glp1r* gene led to a decrease in the attraction for sucrose under conditions in which postingestive cues were known to be deeply minimized (Fig. 1A). This effect took place independently of changes in both CVP structure (data not shown) and expression of the key genes responsible for sweet-taste perception (Fig. 1B). Interestingly, addition of a small quantity of ALA or OLA reinforced the avidity for the sucrose solution in wild-type mice, but was without effect in *Glp1r*^{-/-} mice (Fig. 1C), suggesting that LCFAs may modulate sweet-taste sensitivity via the GLP-1 signaling pathway. It is unlikely that the greater preference for the fat-sweet mix was due to an additive effect

of these two tastants, inasmuch as the concentration of LCFA used (i.e., 200 μ M \approx 0.005%) was not detected by mice when it was presented alone in a control solution (Fig. 2A). This behavior is independent of any change in relative expression of genes encoding for the gustatory lipid sensors GPR120 and CD36 in *Glp1r*^{-/-} mice (Fig. 2B, C).

GLP-1 signaling in CVPs is independent of CD36 gene expression

GLP-1 has been found in a few taste bud cells (TBCs) in various species (16, 22), but the mechanisms leading to its secretion by gustatory papillae are not yet fully understood. Because mouse CVPs express both GPR120 and GLP-1, we hypothesized that the activation of GPR120 by LCFA leads to GLP-1 secretion by TBCs, as reported for intestinal enteroendocrine L cells (14). In support of this hypothesis, GPR120 and GLP-1 were found to be coexpressed in a large number of mouse taste cells from mouse CVPs (Fig. 3A). No staining was detected when the GPR120 or the GLP-1 antibodies were omitted (data not shown). The fact that CD36 was also found to be coexpressed with GPR120 in subsets of TBCs (Fig. 3B) raises the possibility of a direct or indirect implication of lingual CD36 in the GLP-1-dependent modulation of avidity for sucrose. To assess this assumption, sucrose licking tests in the presence or absence

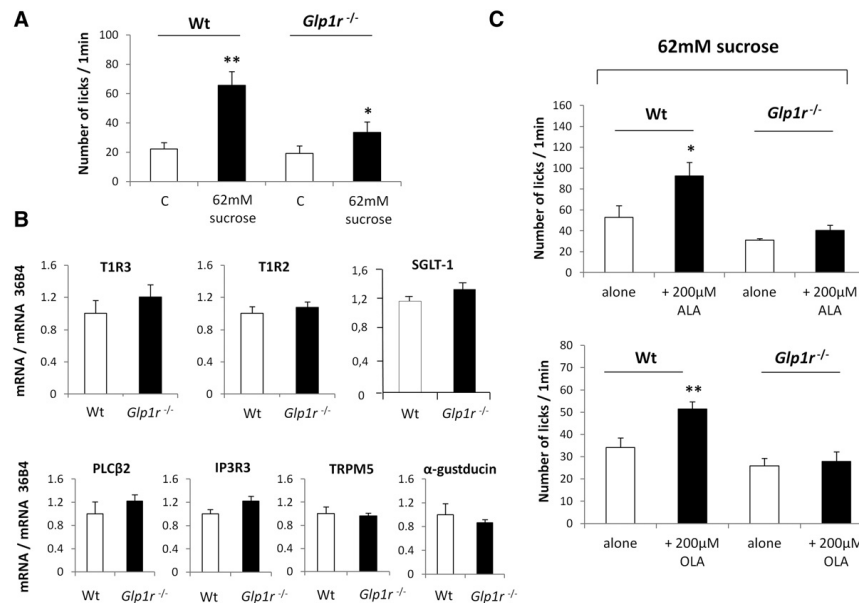


Fig. 1. Minute quantities of LCFA increase sweet-taste sensitivity via the GLP-1 signaling. **A:** Short-term licking tests (1 min) in wild-type (Wt) and *Glp1r*^{-/-} mice subjected to a control solution or 62 mM sucrose solution. Mean \pm SEM ($n = 11-15$). * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$. **B:** mRNA levels of key genes involved in sweet-taste perception assayed by real-time PCR in CVPs from wild-type (Wt) and *Glp1r*^{-/-} mice. Each value corresponds to a pool of total RNA from two mice. Mean \pm SEM ($n = 6$). **C:** Short-term licking tests (1 min) in wild-type (Wt) and *Glp1r*^{-/-} mice subjected to a 62 mM sucrose solution alone or in the presence of 200 μ M ALA or OLA. Mean \pm SEM ($n = 11-13$). * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

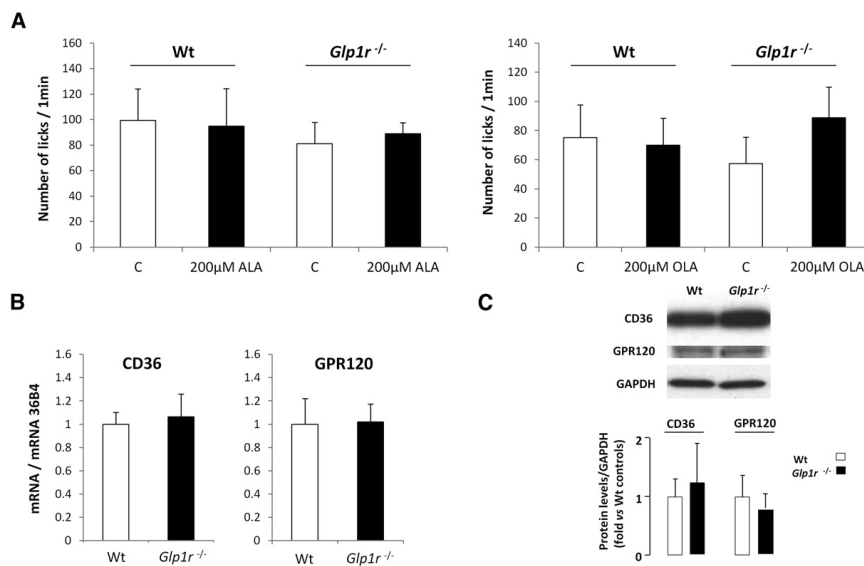


Fig. 2. *Glp1r* gene disruption does not affect gene expression of CD36 and GPR120 in mouse CVP. A: Short-term licking tests (1 min) in wild-type (Wt) and *Glp1r*^{-/-} mice subjected to a control solution or a 200 µM ALA or OLA solution. Mean ± SEM (n = 11–13). B: CD36 and GPR120 mRNA levels assayed by real-time PCR in CVPs from wild-type (Wt) and *Glp1r*^{-/-} mice. Each value corresponds to a pool of total RNA from two mice. Mean ± SEM (n = 6). C: CD36 and GPR120 protein levels assayed by Western blotting in CVPs from wild-type (Wt) and *Glp1r*^{-/-} mice. A representative blot corresponding to a pool of total proteins from three mice is shown. Mean ± SEM (n = 2–4).

of 200 µM ALA were performed in *CD36*-null mice. Interestingly, enhanced attraction for sucrose appeared to be independent of expression of the *CD36* gene (Fig. 3C).

GPR120 is involved in the lipid-mediated release of GLP-1 by mouse CVPs

To assess the role of GPR120 in the lipid-mediated activation of GLP-1 signaling in TBCs, freshly isolated mouse CVPs were incubated for 2 h in an oxygenized medium containing anti-DPP4, to prevent GLP-1 degradation, and 200 µM LCFA or 50 µM GSK137647A. This new drug (Fig. 4A) was identified by screening a recombinant GPR120 receptor assay coupled with the calcium imaging as a potent and selective GPR120 agonist in various species (Fig. 4B, C). ALA, which is a potent activator of GPR120 in vitro (14), led to a small but significant rise in active GLP-1 levels in culture medium (2.08 pM ± 0.09 vs. 1.51 pM ± 0.16 in controls without ALA) (data not shown). Because GPR120 is thought to be preferentially a ω3 receptor (23), the effect of ALA on GLP-1 secretion was compared with OLA. As shown in Fig. 5A, addition of ALA and, to a lesser extent, of OLA increased the GLP-1 content of medium. Interestingly, addition of the specific GPR120 agonist GSK137647A fully reproduced the ALA effect, suggesting that GPR120 might be responsible for the LCFA-mediated release of GLP-1 by the mouse CVPs (Fig. 5B).

Disruption of the *Glp1r* gene affects the detection threshold for lipids in the oral cavity

GLP-1 signaling in mouse taste buds modulates sweet-taste sensitivity (16). To determine whether such a regulatory system was also involved in the oro-sensory detection of dietary lipids, wild-type and *Glp1r*^{-/-} mice were subjected to a set of long-term (12 h) two-bottle preference tests using increasing amounts of rapeseed oil, known to contain both OLA and ALA. *Glp1r*^{-/-} mice were unable to detect low concentrations (from 0.02% to 0.5% w/v) of oil, contrary to control animals. However, *Glp1r*^{-/-} mice responded to high-lipid solutions (≥1% w/v) similarly to wild-type mice (Fig. 6A), suggesting that GLP-1 signaling also plays a role in the fatty-taste sensitivity.

It has been previously demonstrated that GLP-1 in TBCs may act on local targets in a paracrine manner (16). To confirm that GLP-1-mediated modulation of the detection threshold for lipids took place in the oral cavity, mice were subjected to a computer-controlled lickometer using a brief access procedure (1 min) to minimize post-ingestive effects. As expected, *Glp1r*-deficient mice failed to detect small quantities of OLA (0.125% = 4.4 mM), but shared similar high licking responses for the 0.5% OLA solution (= 17.7 mM) compared with responses obtained with wild-type mice, suggesting a higher detection threshold for fat in *Glp1r*^{-/-} mice (Fig. 6B).

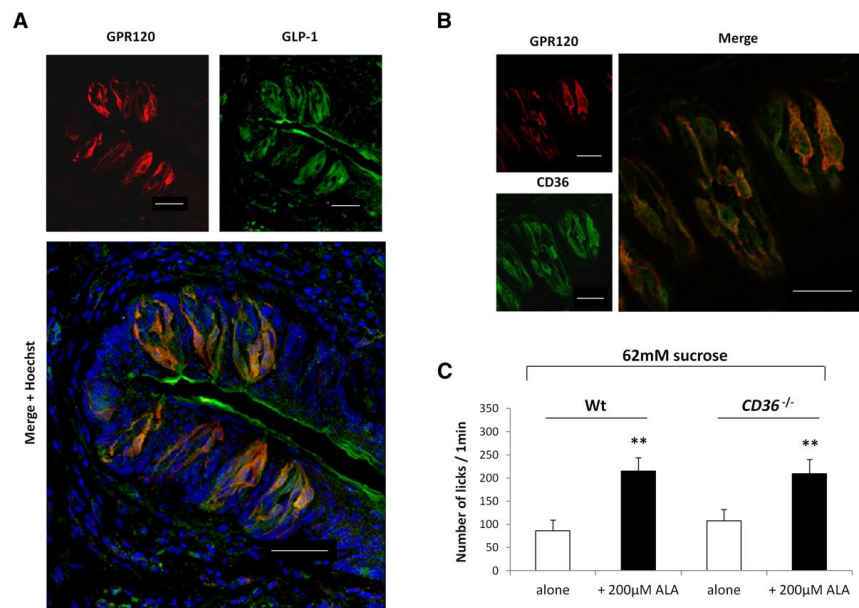


Fig. 3. LCEA-induced sweet-taste sensitivity is independent of the CD36 gene expression. **A:** Immunolocalization of GPR120 and GLP-1 in mouse CVPs. Nuclei were stained by Hoechst's dye. Scale bar is 40 μ m. **B:** Immunolocalization of GPR120 and CD36 in mouse CVPs. Scale bar is 40 μ m. **C:** Short-term licking tests (1 min) in wild-type (Wt) and *CD36*-null mice subjected to a 62 mM sucrose solution alone or in the presence of 200 μ M ALA. Mean \pm SEM (n = 10). ** $P < 0.01$.

Regulation of lingual CD36 is modulated by GLP-1 signaling

According to previous published data (3, 7, 8), lingual CD36 plays a significant role in the spontaneous preference for fat (Fig. 7A). Indeed, *CD36*^{-/-} mice failed to detect large quantities of OLA in a textured solution, in contrast to wild-type mice. It has recently been reported in mouse CVPs that CD36 is a lipid-sensitive receptor whom the down-regulation during a meal might lead to progressive sensory-specific satiety for lipid-rich foods (8). The origin of this physiological regulation remains elusive. Because GLP-1 affects the detection threshold for lipids in oral cavity, it was tempting to hypothesize that CD36 expression levels in taste buds might be modulated by the GLP-1 signaling pathway during the postprandial period. To explore this assumption, mice fasted overnight were refed a standard laboratory chow for 2 h, and CD36 expression levels were assayed by Western blotting in wild-type and *Glp1r*^{-/-} mouse CVPs. As expected, a 2-fold decrease in lingual CD36 protein levels were found in refed wild-type mice. By contrast, no change was detected in *Glp1r*-null mice (Fig. 7B).

DISCUSSION

The sense of taste informs the organism about the quality of the food before it is ingested, leading to stereotyped eating behavior (e.g., preference or aversion). Taste buds

not only specifically detect tastants responsible for the basic taste modalities, but are also able to modulate gustatory perception in an autocrine or a paracrine manner. This last function, probably related to the body energy balance, is not yet fully understood. A better knowledge of physiological mechanisms modulating gustation is required to explain and, perhaps, predict the ingestive decision circuitry. It is a major health challenge, since it can be thought that a dysfunction of this regulatory system might lead to disturbances in eating behavior.

Subsets of taste bud cells synthesize and secrete gastrointestinal hormones known to be controlled by energy nutrients, including lipids, and involved in the regulation of food intake, as GLP-1. The concomitant presence of the receptor for GLP-1 (GLP-1R) in gustatory mucosa (16) suggests that this hormone is locally active and, thus, might directly affect the basic functions in mouse taste buds. Consistent with this assumption, it has been reported that GLP-1 signaling enhances sweet-taste sensitivity (16). Because GLP-1 was found to be colocalized with the sweet-taste receptor subunit T1R3 and α -gustducin in a subset of type II TBCs in mouse CVPs, it was concluded that GLP-1-positive cells are probably sweet sensitive (16). Data reported herein confirm that the knock-out of the *Glp1r* gene decreases the attraction for sucrose in the mouse. We show that it is not elicited by changes in the expression of key genes encoding for sweet-taste transduction molecules,

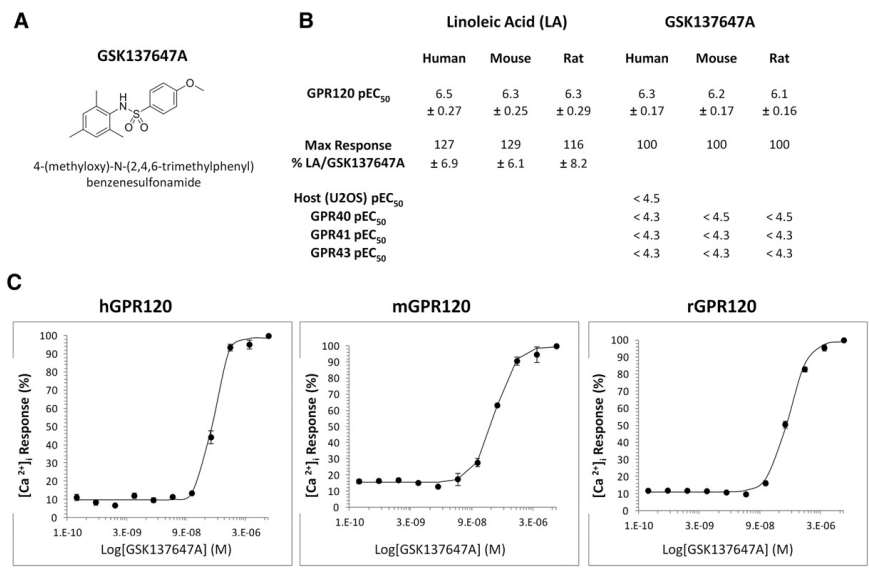


Fig. 4. Identification of a selective GPR120 agonist. A: Formula of the specific GPR120 agonist GSK137647A. B: In vitro potency (pEC₅₀) and efficacy (max response) of GPR120 agonists linoleic acid (LA) and GSK137647A for human, mouse, and rat GPR120. C: Calcium-response curves of the GPR120 agonist GSK137647A for human, mouse, and rat GPR120. For B and C, values are means of at least three experiments.

including T1R2 and T1R3 taste receptors, glucose/galactose transporter SGLT-1, α-gustducin, phospholipase C-β2, the receptor for inositol 1,4,5-trisphosphate, or the transient receptor potential M5 channel. Therefore, further investigations will be required to elucidate the involved mechanism.

We also show that attraction for the sucrose solution was reinforced by the presence of ALA or OLA, suggesting the existence of an additive lipid-dependent regulatory system. Such an effect has also been found in the rat (24). In our experiments, this phenomenon occurred while the LCFA concentration used (i.e., 200 μM ≈ 0.005%) was undetectable by the mouse when it was presented alone during licking tests. It is consistent with the results of Yoneda et al. (25) showing that mice are unable to properly detect 0.01% LCFA (ALA, OLA, or linoleic acid) during short-term behavioral tests. Therefore, the change in perceived

intensity of sweet taste may not be attributed to addition of sucrose and LCFA effects. Interestingly, we have found that salient impact of ALA or OLA was abolished in *Glp1r*-null mice, bringing the first demonstration that dietary lipids affect the perception threshold of sucrose via the GLP-1 signaling pathway. Because CD36 and GPR120 are lipid sensors expressed in the gustatory epithelium, their implication in this regulation was possible. A role of CD36 seems unlikely because *CD36*-null mice display a similar attraction for fat-sweet mixture as control mice during short-term licking tests. By contrast, several observations are in favor of an implication of GPR120. First, GPR120 and GLP-1 are found to be colocalized in subsets of TBCs in mouse CVPs. This observation correlated quite well with the fact that GPR120 (11, 26) and GLP-1 (16) are mainly expressed in type II TBCs in the mouse. Second, using an original ex-vivo approach maintaining the morphological

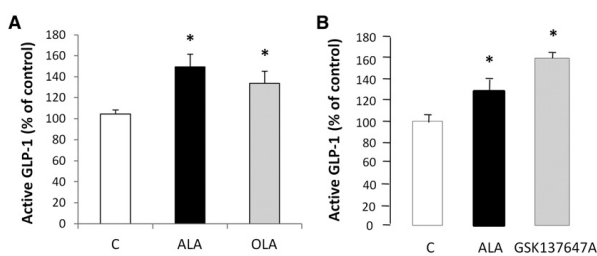


Fig. 5. LCFA and the selective GPR120 agonist GSK137647A induce active GLP-1 release by mouse CVPs. A: GLP-1 release by freshly isolated CVPs incubated in the presence of 33 μM BSA alone (C, control) or with 200 μM ALA or 200 μM OLA. Each value corresponds to the GLP-1 released by a pool of CVP from three mice. Mean ± SEM (n = 3–4). * P < 0.05. B: GLP-1 release by freshly isolated CVPs incubated in the presence of 33 μM BSA alone (C, control) or with 200 μM ALA or 50 μM of the specific GPR120 agonist GSK137647A. Each value corresponds to the GLP-1 released by a pool of CVPs from three mice. Mean ± SEM (n = 3). * P < 0.05.

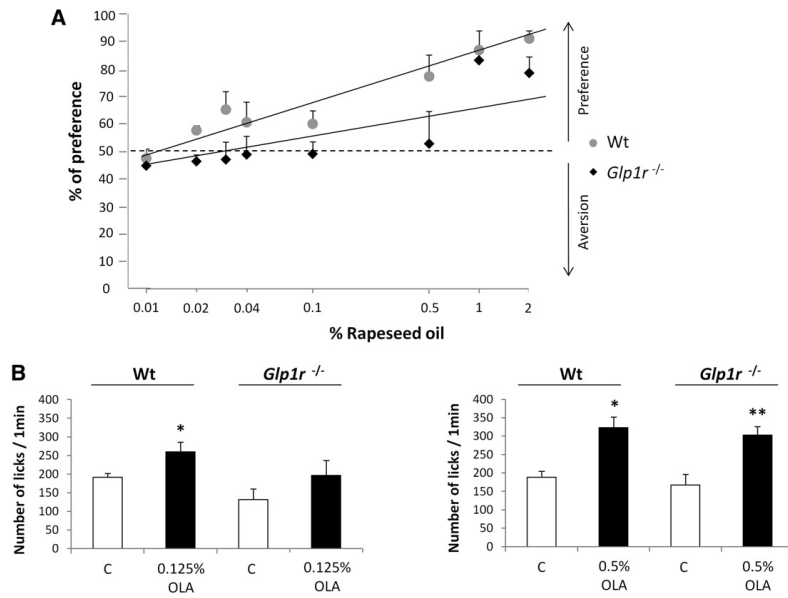


Fig. 6. Disruption of the *Glp1r* gene affects the lipid detection threshold in the mouse. **A:** Long-term two-bottle preference tests (12 h) in wild-type (Wt) and *Glp1r*^{-/-} mice subjected to control solution (0.3% xanthan gum in water) and growing levels of rapeseed oil (0.01–2%) in 0.3% xanthan gum. Xanthan gum was used to minimize textural cues and to emulsify rapeseed oil. Mean ± SEM (n = 10–12). Dotted line represents a lack of preference. **B:** Short-term licking tests (1 min) in wild-type (Wt) and *Glp1r*^{-/-} mice subjected to a control solution (mineral oil) and 0.125 or 0.5% OLA in mineral oil. Mean ± SEM (n = 11–20). * *P* < 0.05; ** *P* < 0.01.

and functional integrity of taste buds, we found that LCFAs lead to GLP-1 release by mouse CVPs. ALA, which is known to be a potent activator of the GPR120 receptor (14), appears to be a stronger GLP-1 secretagogue than OLA. Third,

use of the specific GPR120 agonist GSK137647A reproduces the secretion of active GLP-1 mediated by LCFAs, especially ALA. Because LCFA, GPR120, and GLP-1 are functionally linked in the entero-endocrine L cells in the

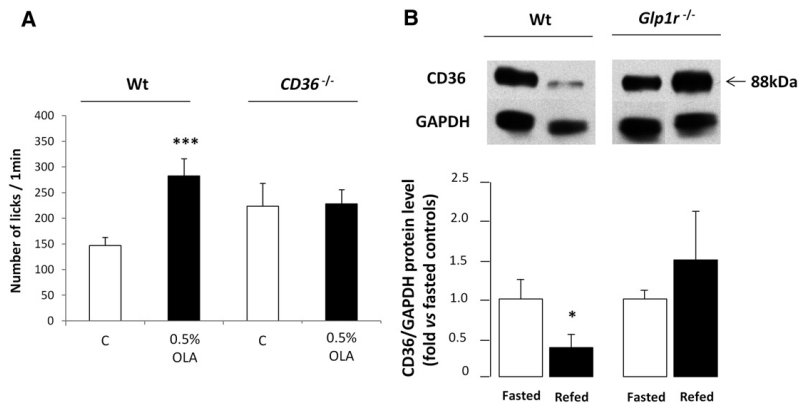


Fig. 7. Regulation of lingual CD36 is modulated by GLP-1 signaling. **A:** Short-term licking tests (1 min) in wild-type (Wt) and *CD36*^{-/-} mice subjected to a control solution (mineral oil) and 0.5% OLA in mineral oil. Mean ± SEM (n = 7). *** *P* < 0.001. **B:** CD36 protein levels determined by Western blotting in CVPs from wild-type (Wt) or *Glp1r*^{-/-} mice fasted overnight or refed ad libitum with a standard laboratory chow for 2 h. Each point corresponds to a pool of total proteins from three to four mice. Mean ± SEM (n = 4). * *P* < 0.05.



gut (14), these results suggest that the activation of lingual GPR120 by LCFAs might induce the release of GLP-1 by TBCs, increasing the attraction for sucrose. This original function for the sense of taste does not exclude a direct implication of GPR120 in the oro-sensory perception of dietary lipids, as proposed by Damak and collaborators (11). Indeed, it is thought that the glucose sensor TIR3 plays a role in both sweet-taste perception and hormone secretion (27, 28).

GLP-1 signaling also appears to be involved in the oro-sensory perception of dietary fat. Inactivation of the *Glp1r* gene leads to a significant reduction of sensitivity to rapeseed oil in long term (12 h) two-bottle preference tests. Although the preference threshold for oil was 0.02% in age-matched wild-type controls, it was up to 0.5% in *Glp1r*^{-/-} mice. Mechanisms responsible for this eating behavior mainly take place in the oral cavity. Indeed, similar data were reproduced when wild-type controls and *Glp1r*-null mice were tested with a computer-controlled lickometer using a brief-access procedure (1 min) known to minimize postingestive cues. We have recently reported that the CD36 protein level in mouse CVPs is subjected to a short-term down-regulation during food intake, contrary to GPR120 (8). It is a very sensitive regulation strictly dependent on the presence of lipid in the diet. Interestingly, direct oil deposition onto the tongue is sufficient to trigger the decrease of CD36 protein in CVP, confirming a local regulation (8). However, the underlying mechanism(s) remain poorly understood. Data reported here demonstrate that GLP-1 signaling plays a significant role in this regulation. Indeed, no decrease in CD36 protein level was observed in CVPs from refed *Glp1r*-null mice, contrary to wild-type animals. As reported for numerous surface receptors, this negative feedback might constitute a desensitization system during persistent exposure to dietary lipids. Consistent with this assumption, the postprandial down-regulation of CD36 in CVPs seems to be sufficient to affect the motivation for fat during a meal, initially high and then gradually decreasing secondary to food intake (8). Therefore, it is tempting to speculate that the lower attraction for fat found in *Glp1r*^{-/-} mice is related to a dysfunction in the GLP-1 regulatory loop controlling CD36 protein level in CVPs.

The existence of physiological links between oro-sensory perception of lipids, selection of energy-dense foods, and obesity risk is gradually emerging. An inverse correlation between peripheral gustatory sensitivity to PUFAs and preference for lipid-rich foods has been reported in rats (29). In healthy humans, hypersensitivity to lipids seems to be associated with lower energy consumption, fat intake, and body mass index (30). This phenomenon might be related to lipid sensors found in taste buds. The fact that a common genetic polymorphism leading to the reduction of CD36 gene expression produces an attenuation of oro-sensory sensitivity for fat in humans (10) is consistent with this assumption. Studies have also shown synergy between oral fat sensitivity and attraction for sucrose in rodents. The ability of unsaturated LCFAs to inhibit the delayed-rectifying K⁺ channels in rat TBCs has been the first

mechanism identified (31). Indeed, lipid-mediated cellular depolarization added to that triggered by sucrose should increase the sweet-taste perception (24). Present data highlight an alternative mechanism suggesting the involvement of GLP-1 signaling. The relative physiological importance of these two mechanisms remains to be established.

In conclusion, our data support the existence of a functional link between unsaturated LCFAs including ω 3, GPR120, and the secretion of GLP-1 by mouse CVP. This system, reminiscent of what happens in the entero-endocrine L cells, modulates the sensitivity thresholds for energy-dense nutrients (sucrose and LCFA). For lipids, it appears to be implicated in a regulatory loop targeting CD36. Because change of CD36 protein level in CVPs modulates the motivation for fat during a meal (8), this LCFA/GPR120/GLP-1 axis might play a significant role in the sensory-specific satiety for lipids. Therefore, it is tempting to speculate that a dysfunction of this regulatory loop might lead to an increased motivation to obtain high-fat foods. A better understanding of the molecular mechanisms responsible for lipid sensing in the gustatory papillae and of their physiological impact on eating behavior should allow the development of new therapeutic and nutritional strategies for mitigating excess food intake and limiting obesity risk. **■**

REFERENCES

1. Fukuwatari, T., K. Shibata, K. Iguchi, T. Saeki, A. Iwata, K. Tani, E. Sugimoto, and T. Fushiki. 2003. Role of gustation in the recognition of oleate and triolein in anosmic rats. *Physiol. Behav.* **78**: 579–583.
2. Chale-Rush, A., J. R. Burgess, and R. D. Mattes. 2007. Evidence for human orosensory (taste?) sensitivity to free fatty acids. *Chem. Senses.* **32**: 423–431.
3. Laugerette, F., P. Passilly-Degrace, B. Patris, I. Niot, M. Febbraio, J. P. Montmayeur, and P. Besnard. 2005. CD36 involvement in orosensory detection of dietary lipids, spontaneous fat preference, and digestive secretions. *J. Clin. Invest.* **115**: 3177–3184.
4. Baillie, A. G., C. T. Coburn, and N. A. Abumrad. 1996. Reversible binding of long-chain fatty acids to purified FAT, the adipose CD36 homologue. *J. Membr. Biol.* **153**: 75–81.
5. Fukuwatari, T., T. Kawada, M. Tsuruta, T. Hiraoka, T. Iwanaga, E. Sugimoto, and T. Fushiki. 1997. Expression of the putative membrane fatty acid transporter (FAT) in taste buds of the circumvallate papillae in rats. *FEBS Lett.* **414**: 461–464.
6. Simons, P. J., J. A. Kummer, J. J. Luiken, and L. Boon. 2011. Apical CD36 immunolocalization in human and porcine taste buds from circumvallate and foliate papillae. *Acta Histochem.* **113**: 839–843.
7. Sclafani, A., K. Ackroff, and N. A. Abumrad. 2007. CD36 gene deletion reduces fat preference and intake but not post-oral fat conditioning in mice. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **293**: R1823–R1832.
8. Martin, C., P. Passilly-Degrace, D. Gaillard, J. F. Merlin, M. Chevrot, and P. Besnard. 2011. The lipid-sensor candidates CD36 and GPR120 are differentially regulated by dietary lipids in mouse taste buds: impact on spontaneous fat preference. *PLoS ONE.* **6**: e24014.
9. Love-Gregory, L., R. Sherva, T. Schappe, J. S. Qi, J. McCrea, S. Klein, M. A. Connelly, and N. A. Abumrad. 2011. Common CD36 SNPs reduce protein expression and may contribute to a protective atherogenic profile. *Hum. Mol. Genet.* **20**: 193–201.
10. Pepino, M. Y., L. Love-Gregory, S. Klein, and N. A. Abumrad. 2012. The fatty acid translocase gene, CD36, and lingual lipase influence oral sensitivity to fat in obese subjects. *J. Lipid Res.* **53**: 561–566.
11. Cartoni, C., K. Yasumatsu, T. Ohkuri, N. Shigemura, R. Yoshida, N. Godinot, J. le Coutre, Y. Ninomiya, and S. Damak. 2010. Taste



- preference for fatty acids is mediated by GPR40 and GPR120. *J. Neurosci.* **30**: 8376–8382.
12. Matsumura, S., T. Mizushige, T. Yoneda, T. Iwanaga, S. Tsuzuki, K. Inoue, and T. Fushiki. 2007. GPR expression in the rat taste bud relating to fatty acid sensing. *Biomed. Res.* **28**: 49–55.
 13. Galindo, M. M., N. Voigt, J. Stein, J. van Lengerich, J. D. Raguse, T. Hofmann, W. Meyerhof, and M. Behrens. 2012. G protein-coupled receptors in human fat taste perception. *Chem. Senses.* **37**: 123–139.
 14. Hirasawa, A., K. Tsumaya, T. Awaji, S. Katsuma, T. Adachi, M. Yamada, Y. Sugimoto, S. Miyazaki, and G. Tsujimoto. 2005. Free fatty acids regulate gut incretin glucagon-like peptide-1 secretion through GPR120. *Nat. Med.* **11**: 90–94.
 15. Baggio, L. L., and D. J. Drucker. 2007. Biology of incretins: GLP-1 and GIP. *Gastroenterology.* **132**: 2131–2157.
 16. Shin, Y. K., B. Martin, E. Golden, C. D. Dotson, S. Maudsley, W. Kim, H. J. Jang, M. P. Mattson, D. J. Drucker, J. M. Egan, et al. 2008. Modulation of taste sensitivity by GLP-1 signaling. *J. Neurochem.* **106**: 455–463.
 17. Febbraio, M., N. A. Abumrad, D. P. Hajjar, K. Sharma, W. Cheng, S. F. Pearce, and R. L. Silverstein. 1999. A null mutation in murine CD36 reveals an important role in fatty acid and lipoprotein metabolism. *J. Biol. Chem.* **274**: 19055–19062.
 18. Scrocchi, L. A., T. J. Brown, N. MaClusky, P. L. Brubaker, A. B. Auerbach, A. L. Joyner, and D. J. Drucker. 1996. Glucose intolerance but normal satiety in mice with a null mutation in the glucagon-like peptide 1 receptor gene. *Nat. Med.* **2**: 1254–1258.
 19. Condreay, J. P., S. M. Witherspoon, W. C. Clay, and T. A. Kost. 1999. Transient and stable gene expression in mammalian cells transduced with a recombinant baculovirus vector. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **96**: 127–132.
 20. Livak, K. J., and T. D. Schmittgen. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔC_T} method. *Methods.* **25**: 402–408.
 21. Jang, H. J., Z. Kokrashvili, M. J. Theodorakis, O. D. Carlson, B. J. Kim, J. Zhou, H. H. Kim, X. Xu, S. L. Chan, M. Juhaszova, et al. 2007. Gut-expressed gustducin and taste receptors regulate secretion of glucagon-like peptide-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **104**: 15069–15074.
 22. Feng, X. H., X. M. Liu, L. H. Zhou, J. Wang, and G. D. Liu. 2008. Expression of glucagon-like peptide-1 in the taste buds of rat circumvallate papillae. *Acta Histochem.* **110**: 151–154.
 23. Oh, D. Y., S. Talukdar, E. J. Bae, T. Imamura, H. Morinaga, W. Fan, P. Li, W. J. Lu, S. M. Watkins, and J. M. Olefsky. 2010. GPR120 is an omega-3 fatty acid receptor mediating potent anti-inflammatory and insulin-sensitizing effects. *Cell.* **142**: 687–698.
 24. Pittman, D. W., C. E. Labban, A. A. Anderson, and H. E. O'Connor. 2006. Linoleic and oleic acids alter the licking responses to sweet, salt, sour, and bitter tastants in rats. *Chem. Senses.* **31**: 835–843.
 25. Yoneda, T., K. Saitou, H. Asano, T. Mizushige, S. Matsumura, A. Eguchi, Y. Manabe, S. Tsuzuki, K. Inoue, and T. Fushiki. 2009. Assessing palatability of long-chain fatty acids from the licking behavior of BALB/c mice. *Physiol. Behav.* **96**: 735–741.
 26. Matsumura, S., A. Eguchi, T. Mizushige, N. Kitabayashi, S. Tsuzuki, K. Inoue, and T. Fushiki. 2009. Colocalization of GPR120 with phospholipase-Cbeta2 and alpha-gustducin in the taste bud cells in mice. *Neurosci. Lett.* **450**: 186–190.
 27. Damak, S., M. Rong, K. Yasumatsu, Z. Kokrashvili, V. Varadarajan, S. Zou, P. Jiang, Y. Ninomiya, and R. F. Margolskee. 2003. Detection of sweet and umami taste in the absence of taste receptor T1r3. *Science.* **301**: 850–853.
 28. Kokrashvili, Z., B. Mosinger, and R. F. Margolskee. 2009. T1R3 and alpha gustducin in gut regulate secretion of glucagon-like peptide 1. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1170**: 91–94.
 29. Gilbertson, T. A., L. Liu, D. A. York, and G. A. Bray. 1998. Dietary fat preferences are inversely correlated with peripheral gustatory fatty acid sensitivity. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **855**: 165–168.
 30. Stewart, J. E., C. Feinle-Bisset, M. Golding, C. Delahunty, P. M. Clifton, and R. S. Keast. 2010. Oral sensitivity to fatty acids, food consumption and BMI in human subjects. *Br. J. Nutr.* **104**: 145–152.
 31. Gilbertson, T. A., D. T. Fontenot, L. Liu, H. Zhang, and W. T. Monroe. 1997. Fatty acid modulation of K⁺ channels in taste receptor cells: gustatory cues for dietary fat. *Am. J. Physiol.* **272**: C1203–C1210.

The Lipid-Sensor Candidates CD36 and GPR120 Are Differentially Regulated by Dietary Lipids in Mouse Taste Buds: Impact on Spontaneous Fat Preference

Céline Martin, Patricia Passilly-Degrace, Dany Gaillard[†], Jean-François Merlin, Michaël Chevrot, Philippe Besnard*

Physiologie de la Nutrition, INSERM U866, Université de Bourgogne, AgroSup Dijon, Dijon, France

Abstract

Background: Recent studies in rodents and humans suggest that the chemoreception of long-chain fatty acids (LCFA) in oral cavity is involved in the spontaneous preference for fatty foods and might contribute to the obesity risk. CD36 and GPR120 are LCFA receptors identified in rodent taste bud cells. The fact that CD36 or GPR120 gene inactivation leads to a decrease in the preference for lipids raises the question of the respective role(s) played by these gustatory lipid-sensor candidates.

Methodology/Principal Findings: Using a combination of biochemical, nutritional and behavioural studies in wild-type, CD36^{+/2} and CD36^{2/2} mice, it was found that: 1) CD36 and GPR120 display different diurnal rhythms in the gustatory circumvallate papillae, CD36 mRNA levels being down-regulated during the dark period in contrast to GPR120, 2) this change is due to food intake and strictly dependent of the presence of lipids in the diet, 3) CD36 protein levels are also rapidly but transiently decreased by the food intake, a two-fold drop in CD36 protein levels being found 1 h after refeeding, followed by a progressive return to the pre-prandial values, 4) this down-regulation, which has a post-transcriptional origin, seems sufficient to alter the spontaneous fat preference, independently to change in the GPR120 gene expression.

Conclusions/Significance: In contrast to GPR120, CD36 appears to be a food-sensitive lipid sensor in the gustatory circumvallate papillae. Lipid-mediated change in lingual CD36 expression might modulate the motivation for fat during a meal, initially high and then gradually decreasing secondary to the food intake. This short-term lipid-mediated effect is reminiscent of sensory-specific satiety. These findings, which highlight the role played by CD36 in the oro-sensory perception of dietary lipids, raise the possibility of novel pharmacological strategies to modify attraction for fatty foods and decrease obesity risks.

Citation: Martin C, Passilly-Degrace P, Gaillard D, Merlin JF, Chevrot M, et al. (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(8): e24014. doi:10.1371/journal.pone.0024014

Editor: Stéphane Blanc, Institut Pluridisciplinaire Hubert Curien, France

Received: February 14, 2011; **Accepted:** August 2, 2011; **Published:** August 25, 2011

Copyright: © 2011 Martin et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by the French Research Agency (ANR) and the Vitagora cluster (SensofAT project to PB) and by the Burgundy Council and Centre National Interprofessionnel de l'Economie Laitière (CNIEL) (HumanFATaste project to PB). CM and M.C. are fellows of ANR and Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche, respectively. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* Email: pbesnard@u-bourgogne.fr

† Current address: Department of Cell & Developmental Biology-Rocky Mountain Taste & Smell Center, University of Colorado Denver, School of Medicine, Aurora, Colorado, United States of America

Introduction

Obesity reaches epidemic proportions worldwide and is a major contributor to the global burden of chronic diseases. Chronic overconsumption of fatty foods contributes to this phenomenon [1]. Rodents and humans display a spontaneous preference for lipid-rich foods. However, the molecular mechanisms underlying this pattern of eating behaviour in mammals remain unclear. The oro-sensory perception of dietary lipids was long thought to involve only textural and olfactory cues. Recent findings challenge this limited viewpoint, strongly suggesting that the sense of taste also plays a significant role in dietary lipid perception and might therefore be involved in the preference for fatty foods and, consequently, in the obesity risk [2].

Compelling evidences implicate the multifunctional protein CD36 as a gustatory lipid sensor. This receptor-like glycoprotein, which belongs to the scavenger receptor family [3], binds saturated and unsaturated long-chain fatty acids (LCFA, number of carbons ≥ 16) with an affinity in the nanomolar range [4]. CD36 is found in rodent lingual epithelium in which it is strictly restricted to some taste bud cells (TBC) [5,6]. CD36 gene inactivation abolishes spontaneous fat preference [6,7] and the cephalic phase of digestion triggered by a LCFA deposition onto the tongue in the mouse [6]. These physiological effects take place through the gustatory circuitry [8]. Indeed, the spontaneous preference for or, conversely, the conditioned aversion to LCFA require intact gustatory nerves. Moreover, neuronal activation in the gustatory area of the nucleus of the solitary tract elicited by a lingual

deposition of LCFA in wild-type mice cannot be reproduced in CD36-null animals. Finally, LCFA selectively trigger a rapid and huge increase in $[Ca^{2+}]_i$ in CD36-positive TBC isolated from mouse circumvallate papillae (CVP). This change, initiated by the phosphorylation of Src protein tyrosine kinases (Src-PTK), leads to the release of neurotransmitters (i.e. serotonin and in less extent norepinephrine) which activates the gustatory afferent nerve fibers [9]. Altogether these data strongly highlight the crucial role played by CD36 in the oro-sensory perception of dietary lipids in the mouse. This last finding seems paradoxical since CD36 does not belong to the G protein-coupled receptor (GPCR) family whereas most of the other taste receptors, such as T1Rs and T2Rs responsible for sweet, umami and bitter tastes, do [10]. It has been recently reported that two members of the GPCR family displaying specificity for LCFA also play a role in the taste for fat. GPR40 and GPR120 are specifically expressed in the gustatory epithelium of the tongue in the mouse [11]. Knock-out mice lacking GPR40 or GPR120 have diminished preference for oleic acid and linoleic acid solutions [11]. Contrary to these authors, we have not been able to detect GPR40 mRNA in mouse CVP, similarly to Matsumura and colleagues in the rat [12]. Origin of this discrepancy is unclear. By contrast, we confirm the presence of GPR120 in mouse taste buds which raises the question of the respective role(s) played by CD36 and GPR120 in the coding mechanisms for fat taste at the periphery. In this report, expression of genes encoding for CD36 and GPR120 in mouse CVP was explored during the day-night cycle and in mice subjected to nutritional manipulations. Physiological consequences on spontaneous lipid preference were analyzed using behavioural approaches.

Materials and Methods

Ethics Statement

French guidelines for the use and the care of laboratory animals were followed and experimental protocols were approved by the animal ethics committee of Burgundy University (approval codes B0110, B0210 and B0610).

Animals and experimental procedures

Animals were housed in a controlled environment (constant temperature and humidity, darkness from 7 pm to 7 am) and were fed a standard laboratory chow containing 3% of lipids (w/w, soybean oil; Mucedola, Italy). C57BL/6J wild-type mice were purchased from Charles River Laboratories (France). CD36^{2/2} [13], CD36⁺² as well as CD36⁺⁺ control littermates were bred locally on a C57BL/6J background.

Diurnal rhythm. Male wild-type mice fed the standard laboratory chow ad libitum were used to study gene expression in the CVP. The experiment started at 10 am. Mice were sacrificed every 3 h during 24 h. Animals were anesthetized by an intra-peritoneal injection of ketamine and xylazine mixture (10 mg/100 g of body weight each, in a saline solution). Blood was collected on heparin, plasma recovered by centrifugation (2600 rcf, 10 minutes at 4°C) and conserved at 2.20°C until biochemical analyses. CVP and surrounding non-gustatory epithelium were isolated for RT-PCR analyses. During the dark phase, experiments were carried-out under red light.

Nutritional experiments. Animals were anesthetized by an intra-peritoneal injection of pentobarbital (15 mg/100 g of body weight). In a first experiment, male and female mice were fed a standard diet (3% lipids, w/w). Controls were fasted overnight. In a second experiment, male mice were fed an allipidic (0%) or a hyperlipidic (30%, w/w) diet. Controls were fasted overnight. Diet

was reconstituted with soybean oil from a free-fat powder (SAFE, France). In a third experiment, male mice were fasted overnight or fed a low lipidic chow (0.5%, w/w, soybean oil; Mucedola special diet). In other experiments, male mice were fasted overnight and then refed the standard laboratory chow for 1 h, 4 h, 6 h or 11 h. Control group was fasted overnight.

Oral deposition of lipids. Male mice were fasted overnight. At t=0 and t=15 min, they received a lingual deposition of soybean oil. At t=60 min, animals were anesthetized by an intra-peritoneal injection of pentobarbital (15 mg/100 g of body weight) and circumvallate papillae were harvested for western blotting analyses.

Behavioural experiments. Male CD36⁺⁺, CD36⁺² and CD36-null mice were submitted to double choice tests using contact lickometers (Med Associates, USA). Mice were offered for 30 min a pair of bottles of water and 4% sucrose (Sigma-Aldrich, USA) in experimental cages for 2 days as a training. Since LCFA were added in mineral oil to minimize textural cues, mice were subjected on day 3 to mineral oil (Cooper, France) alone to avoid neophobia. A double choice test between control solution (mineral oil) and experimental solution (mineral oil + different concentrations of linoleic acid; Sigma-Aldrich) was performed on day 4. Mice were food and water deprived 11 h before the test which took place 3 h after the beginning of the dark period. Position of bottles (on the right or the left) was changed daily to avoid the development of side preference. Data were analyzed for 5 min from the first lick and preference for the experimental solutions (ratio between the number of licks on experimental bottle and the total number of licks) was calculated.

Papillae isolation

Wild-type, CD36⁺² or CD36^{2/2} mice were sources of taste tissue. Gustatory papillae were isolated according to previously published procedures [6]. In brief, lingual epithelium was separated from connective tissue by enzymatic dissociation (elastase and dispase mixture, 2 mg/ml each in Tyrode buffer: 140 mM NaCl, 5 mM KCl, 10 mM HEPES, 1 mM CaCl₂, 10 mM glucose, 1 mM MgCl₂, 10 mM Na pyruvate, pH 7.4) and papillae dissected under a microscope. Epithelium surrounding the papillae was also collected to serve as non-sensory control tissue. Samples were snap-frozen in liquid nitrogen and stored at 2.80°C until RNA extraction or lysed in a buffer for western blot analyses.

Real-time RT-PCR

Total RNA from gustatory papillae and surrounding non-gustatory epithelium (negative control) were extracted using RNeasy mini-columns (Qiagen, USA). Genomic DNA digestion was performed using the RNase-free DNase Set (Qiagen). First-strand cDNA was generated by reverse transcription from total RNA (OmniScript Reverse Transcription, Qiagen). Levels of mRNA transcripts were determined by real-time RT-PCR (StepOnePlus apparatus, Applied biosystems, USA). a-gustducin, a G protein considered as a specific TBC marker, was systematically assayed to assess the purity of papillae preparations. RNA levels were normalized against levels of 18S ribosomal or 36B4 RNA transcripts in the same samples. Primer probe sets were designed with Primer3 software tool using gene sequences from the GenBank database or purchased directly from Applied Biosystems. PCR amplification was done using Sybrgreen (Power SYBR Green PCR Master Mix, Applied biosystems) or Taqman (Universal Taqman PCR Master Mix, Applied biosystems) technology. The oligonucleotide sequences of primers and probes are shown in Table 1. The comparative 2^{-ΔΔCT} method was used for relative quantification [14].

Table 1. Sequences and GenBank numbers of primers used for RT-PCR amplifications.

Gene name	Nucleotides sequences (59R 39 or Applied Biosystems Taqman Assay ID details)	Pubmed accession number
CD36	Forward: GGCCAAAGCTATTGGACATG Probe: CACGACGCAAGCTCTTTCACCT Reverse: CCGAACACACGCTAGATAGAC	NM_007643
GPR120	Mm01198944_m1	NM_181748
a-gustducin	Forward: ACACATTGCAGTCCATCTAGC Probe: TGAAGTTGTCTTGGTCTCTCGGCTCC Reverse: ATCAOATCTTCTAGTGATTTTGGC	XM_144196
18S	Forward: TAAGTCCCTGCCCTTTGTACACA Reverse: GATCCGAGGGCCCTACTAAAC	X00686
36B4	Forward: GCCAAGCTGGAGCAACACC Probe: AGTCTCTCTTGGTGAACACGAAGCC Reverse: GCCAACAGCATATCCGGAAATC	NM_007475

doi:10.1371/journal.pone.0024014.t001

Western blotting

Samples were homogenized using a micro-potter in a TSE buffer (50 mM Tris HCl, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% nonidet P.40). Protein concentration in homogenates was assayed using a BCA kit (Pierce and Warriner, USA). After being separated by SDS-PAGE, proteins were transferred to a PVDF membrane by electroblotting. After being blocked using a TBS buffer containing 5% BSA and 0.05% Tween 20, membranes were incubated overnight at 4°C with a primary antibody (Table 2). After a set of washes, the appropriate peroxidase-conjugated secondary antibody was added. Antibody labeling was detected by chemiluminescence (ECL-plus reagent, Pierce and Warriner). GAPDH was used as an internal reference protein.

Immunohistochemistry

Excised CVP from wild-type or CD36-null mice were fixed for 2–3 hours in 4% paraformaldehyde, cryoprotected overnight with 30% sucrose in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4) and then embedded in OCT medium (Tissue-Tek, Sakura Finetek). Cryostat sections (10 µm) were air dried for 2 h at room temperature and then rehydrated in 0.1 M PBS (pH 7.4) for 10 min. Rehydrated sections were incubated during 1 h with PBS containing 0.3% Triton X-100 and then blocked with 10% fatty acid-free BSA in PBS for 40 min. Next, the slices were incubated overnight at 4°C with an anti-GPR120 (1:500 dilution; MBL, USA) or an anti-a-gustducin (1:100 dilution; Santa Cruz Biotechnology Inc., USA) primary antibody, both raised in rabbit. Specificity of the GPR120 antibody was assayed in mouse jejunum: only some enteroendocrine cells were positively stained (not shown). Moreover, specificity of this antibody was documented elsewhere [11]. After washing, sections were incubated for 1 h at room temperature with a fluorescent anti-rabbit secondary

antibody (Alexa 568 or 488, 1:1000 dilution; Invitrogen, USA). After washing, slices were counterstained with Hoechst reactive (0.05 mg/ml; Sigma-Aldrich) to stain the nuclei. Slices were then analyzed under an epifluorescence microscope (Zeiss) at the IFR100 Cellular Imaging Platform. In no cases was fluorescent staining observed when the primary antibody was omitted.

Biochemical analyses

Plasma glucose and triglycerides levels were assayed using specific bioMérieux kits (glucose RTU kit and the TG Pap150 kit, respectively).

Statistics

Results are expressed as Means \pm SEM. The significance of differences between groups was evaluated with SigmaStat (Systat Software, Germany). We first checked that the data for each group were normally distributed and that variances were equal and then carried out ANOVA, two-tailed Student's *t* test or Mann-Whitney tests. A *P* value of less than 0.05 was considered to be statistically significant.

Results**CD36 and GPR120 genes display specific diurnal rhythms in mouse circumvallate papillae**

CD36 or GPR120 gene inactivation deeply affects the spontaneous preference for lipid-enriched solutions in mice subjected to behavioural tests. To better understand the respective function played by these lipid-binding proteins in mouse gustatory papillae, the nycthemeral regulation of CD36 and GPR120 gene expression was studied in CVP. The 24-hours cycle is characterized by physiological changes in feeding behaviour, with a peak of food consumption occurring during the dark period associated with changes in various plasma parameters including plasma triglycerides and glucose levels (Fig. 1-A). CD36 mRNA levels in CVP tended to be lower during the dark period than during the light period (Fig. 1-B). By contrast, GPR120 mRNA levels did not show a similar change along a day suggesting that CD36 and GPR120 genes display different diurnal rhythms. Comparison of areas under the curve (AUC) is consistent with this assumption (Fig. 1-B). mRNA levels of the G protein a-gustducin, known to be involved in the transduction of sweet, bitter and umami tastes and used here as a specific CVP marker, remained grossly stable along a day (Fig. 1-B).

Table 2. Primary antibodies used for Western blotting analyses.

Antigen	Host	Vendor	Dilution
CD36	Goat	R&D Systems	1:500
GPR120	Rabbit	MBL	1:500
GAPDH	Mouse	Millipore	1:500

doi:10.1371/journal.pone.0024014.t002

CD36 and GPR120 Regulation in Mouse Taste Buds

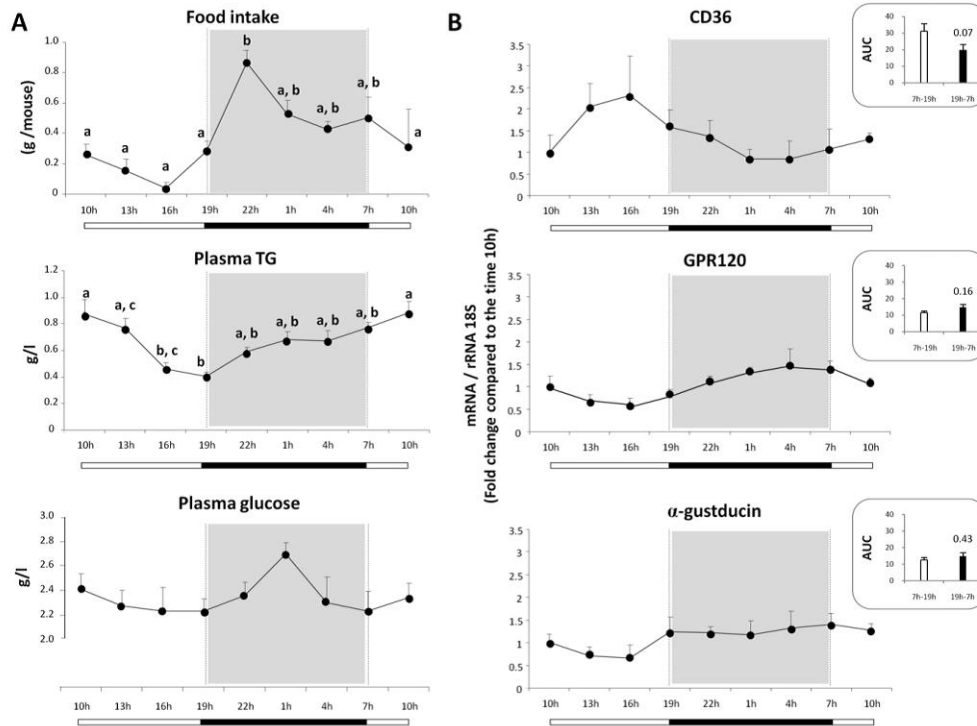


Figure 1. *CD36* and *GPR120* mRNA transcripts display different diurnal rhythms in mouse circumvallate papillae. A: Diurnal rhythm of food intake, plasma triglycerides (TG) and glucose levels in mice fed ad libitum a standard laboratory chow. Means \pm SEM (n = 10). B: *CD36*, *GPR120* and α -gustducin mRNA levels determined by real-time PCR in circumvallate papillae from mice fed ad libitum a standard laboratory chow. Insert: comparison of area under the curve (AUC) between the light and the dark periods. Each value corresponds to a pool of total RNA from 2 mice. Means \pm SEM (n = 5). doi:10.1371/journal.pone.0024014.g001

CD36 and GPR120 gene expression are differentially regulated by dietary lipids in circumvallate papillae

To explore whether this differential regulation of *CD36* and *GPR120* genes was related to the nutritional status of mice, *CD36* and *GPR120* mRNA levels were assayed in CVP from fasted or fed mice. *CD36* mRNA levels were systematically lower in fed mice than in fasted animals. This nutritional regulation was not gender-dependent since it is retrieved in males and females. In contrast, *GPR120* or α -gustducin mRNA levels remained unchanged (Fig. 2-A). To determine whether the lipid content of diet was responsible of the down-regulation of *CD36* gene, levels of mRNA encoding for *CD36* and *GPR120* were assayed in CVP from mice fed an alipidic diet (0% lipid) or a high fat diet (30% lipid, w/w) and compared to the fasted controls (Fig. 2-B). Interestingly, the decrease in *CD36* mRNA found in mice subjected to the high fat diet was not reproduced with the alipidic diet demonstrating the lipid-dependent origin of this nutritional regulation. The fact that *GPR120* mRNA levels remained unchanged in these conditions suggests that this gene is insensitive to the lipid content of diet in contrast to *CD36* (Fig. 2-B). To further explore the sensitivity to lipid of the *CD36* gene, mice were fed a diet especially low in fat

(0.5%, w/w). As shown in the Fig. 2-C, this minute quantity of fat was sufficient to trigger a two-fold decrease in *CD36* mRNA levels as compared to fasted controls. As expected, *GPR120* and α -gustducin gene expression remained unchanged in this condition.

There is a lipid-dependent drop in *CD36* protein levels in circumvallate papillae while the amount of *GPR120* protein remains stable

Time-course experiment was performed by Western blotting to explore whether *CD36* and *GPR120* protein levels in CVP were also affected by the food intake during a fasting/re-feeding sequence. A dramatic drop in *CD36* protein levels was found 1 hour after re-feeding, followed by a progressive return to levels observed during fasting (Fig. 3-A). An inverse correlation between food consumption and *CD36* protein levels was found in CVP (Fig. 3-B). In contrast, no food-mediated regulation of *GPR120* protein levels was observed (Fig. 3A & B). To further explore feeding-induced down-regulation of *CD36* in CVP, *CD36* gene expression was compared in fasted and 1 h refed mice. Consistent with the time-course experiment (Fig. 3-A), a 3-fold decrease in *CD36* protein levels was found in mice refed during 1 h (Fig. 4-A).

CD36 and GPR120 Regulation in Mouse Taste Buds

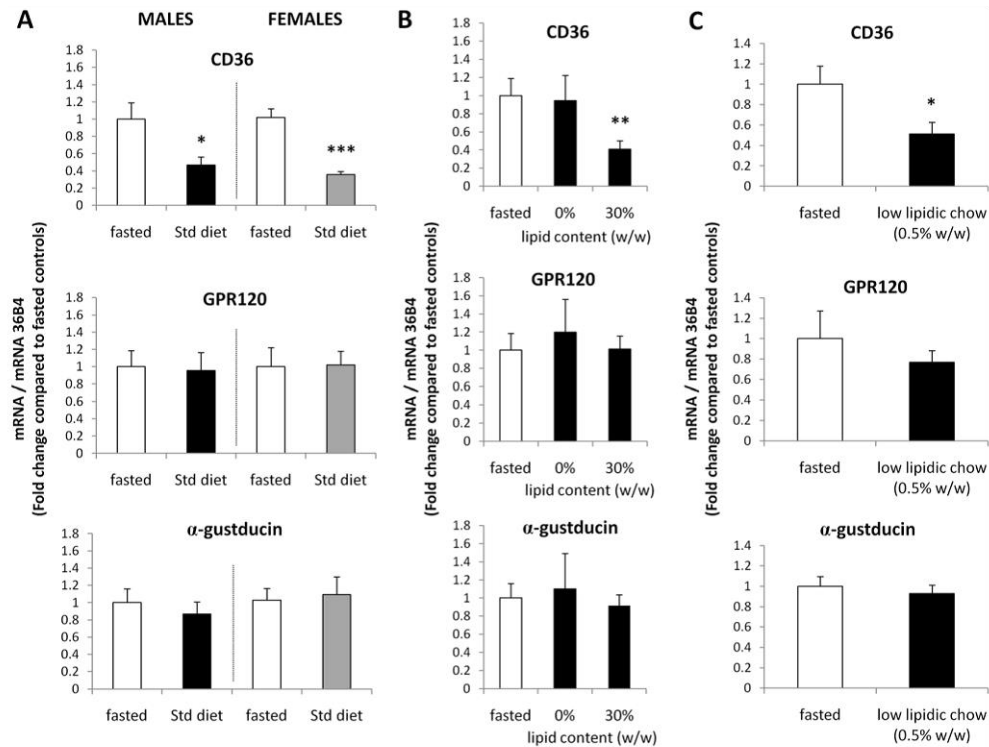


Figure 2. CD36 and GPR120 gene expression are differentially regulated by dietary lipids in mouse circumvallate papillae. **A:** CD36, GPR120 and α -gustducin mRNA levels determined by real-time PCR in circumvallate papillae from male and female mice fed ad libitum a standard (Std) diet (3% lipids, w/w). Controls were fasted overnight. Each value corresponds to a pool of total RNA from 2 mice. Means \pm SEM (n=6). * p, 0.05, *** p, 0.001. **B:** CD36, GPR120 and α -gustducin mRNA levels determined by real-time PCR in circumvallate papillae from male mice fed ad libitum an alipidic (0%) or a hyperlipidic (30% lipids, w/w) diet. Controls were fasted overnight. Each value corresponds to a pool of total RNA from 2 mice. Means \pm SEM (n=4-6). ** p, 0.01. **C:** CD36, GPR120 and α -gustducin mRNA levels determined by real-time PCR in circumvallate papillae from male mice fed ad libitum a low lipidic chow (0.5% lipids, w/w). Controls were fasted overnight. Each value corresponds to a pool of total RNA from 2 mice. Means \pm SEM (n=4). * p, 0.05. doi:10.1371/journal.pone.0024014.g002

Surprisingly, no change in CD36 mRNA levels occurred in these conditions suggesting that the drop of CD36 protein has a post-transcriptional origin (Fig. 4-B). Decrease in CD36 protein levels in CVP was efficiently reproduced when oil was directly deposited onto the tongue in fasted mice excluding involvement of post-ingestive influences in this regulation (Fig. 4-C).

The lipid-mediated down-regulation of lingual CD36 gene should be sufficient to affect the preference for lipids independently to GPR120 expression

If CD36 plays a significant role in the chemodetection of LCFA in the oral cavity, its nutritional-mediated down-regulation in gustatory papillae might affect the preference for lipids during a meal. Unfortunately, by reason of deep changes both in endocrine status and autonomic nervous system activity which might also affect the preference for fat, the comparison of feeding behaviour in fed and fasted mice would not allow to fully answer to the question. To overpass for this limitation, two-bottle preference

tests were performed in CD36^{+/+}, CD36^{+/-} and CD36^{-/-} mice in which CD36 levels in circumvallate papillae are genetically established (Fig. 5). As in our previous long-term two-bottle preference tests [6], linoleic acid (LA) was used. To minimize textural cues, post-ingestive effects and lipid-mediated activation of CD36 in other tissues, control and experimental solutions containing LA were prepared using mineral oil (saturated long-chain hydrocarbon) and behavioural tests were analyzed for 5 min from the first lick using a computer-controlled lickometer. Experiments were performed using 0.5% LA since this concentration led to an optimal behavioural response in wild-type mice with this protocol (Fig. 5-A). Surprisingly in these conditions, LA preference found in wild-type animals was fully abolished not only in CD36-null mice but also in heterozygous CD36^{+/-} animals in which CD36 protein expression is two-fold lower in CVP (Fig. 5-B & C). Similar data were also found when CD36^{+/-} mice were subjected to a 4-fold higher LA concentration (i.e. 2%) suggesting that, like homozygous mice, heterozygous mice are unable to

CD36 and GPR120 Regulation in Mouse Taste Buds

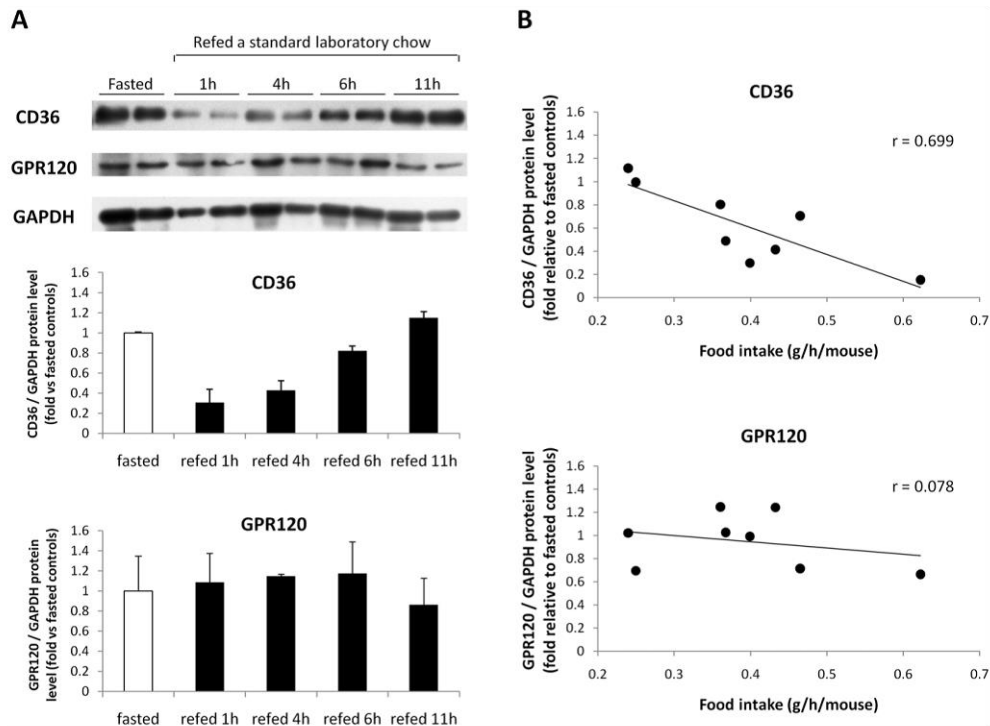


Figure 3. CD36 and GPR120 proteins in circumvallate papillae are differentially regulated during fasting/refeeding sequences. A: CD36 and GPR120 protein levels determined by western blotting in circumvallate papillae from fasted controls or mice refed ad libitum a standard laboratory chow for 1 h, 4 h, 6 h or 11 h. Each point corresponds to a pool of total proteins from 4 mice (n=2). The mean CD36/GAPDH and GPR120/GAPDH protein ratios were also analyzed. Error bars are SEM. B: Relationship between CD36 or GPR120 protein levels and food intake. doi:10.1371/journal.pone.0024014.g003

detect large quantity of free LCFA in a textured solution (Fig. 5-C). To take into consideration the putative role played by GPR120 in this loss of fat detection, impact of CD36 gene inactivation on GPR120 gene expression was studied in mouse CVP. Levels of GPR120 mRNA and protein localization in taste buds remained similar in wild-type and CD36-null mice CVP. (Fig. 6-A). The G protein α -gustducin was used as a taste bud cell marker (Fig. 6-B).

Discussion

Many recent studies strongly suggest the existence of a specific gustatory system devoted to the detection of LCFA in rodents and, likely, in humans [2,15]. Two unrelated lipid-sensor candidates, the multifunctional glycoprotein CD36 and the G protein-coupled receptor GPR120, displaying similar binding specificities for LCFA [4,16], have been identified in gustatory papillae in the mouse. Inactivation of the gene encoding for CD36 [6,7] or GPR120 [11] renders mice unable to properly detect the presence of LCFA in a textured solution during behavioural tests. This effect seems to be specific since the disruption of the CD36 or GPR120 genes does not alter the architecture of taste buds [6,11] and sweet preference or bitter aversion are maintained in CD36^{2/2} and GPR120^{2/2} mice [6,11]. If CD36-mediated

signaling in taste buds is partially deciphered [9], mechanisms by which GPR120 affects fat preference are not yet established. Collectively, these findings raise the question of the respective role(s) of CD36 and GPR120 in gustatory papillae in the mouse.

We report herein that the expression of the CD36 gene in mouse CVP is subjected to a short-term lipid-mediated down-regulation during food intake in contrast to what is found for the GPR120 gene. The physiological relevance of this change is supported by its diurnal rhythm. Indeed, a slight decrease in CD36 mRNA levels occurred during the dark period characterized by a sustained food intake while GPR120 mRNA remained unchanged. The fact that this decrease is reproduced when fasted mice are fed or refed a standard laboratory chow suggests its nutritional origin. It is a very sensitive regulation strictly dependent of the presence of lipid in diet since it is still retrieved in mice refed a diet containing only 0.5% (w/w) lipids but lacking when animals were subjected to an alipidic diet. This observation correlates quite well with the high binding affinity of CD36 for LCFA [4]. Interestingly, direct oil deposition onto the tongue is sufficient to trigger the decrease of CD36 protein in CVP suggesting a local regulation independent from subsequent post-oral influences. Moreover, the post-transcriptional origin of this regulation is likely since the decrease in the CD36 protein in CVP took place while CD36 mRNA

CD36 and GFR120 Regulation in Mouse Taste Buds

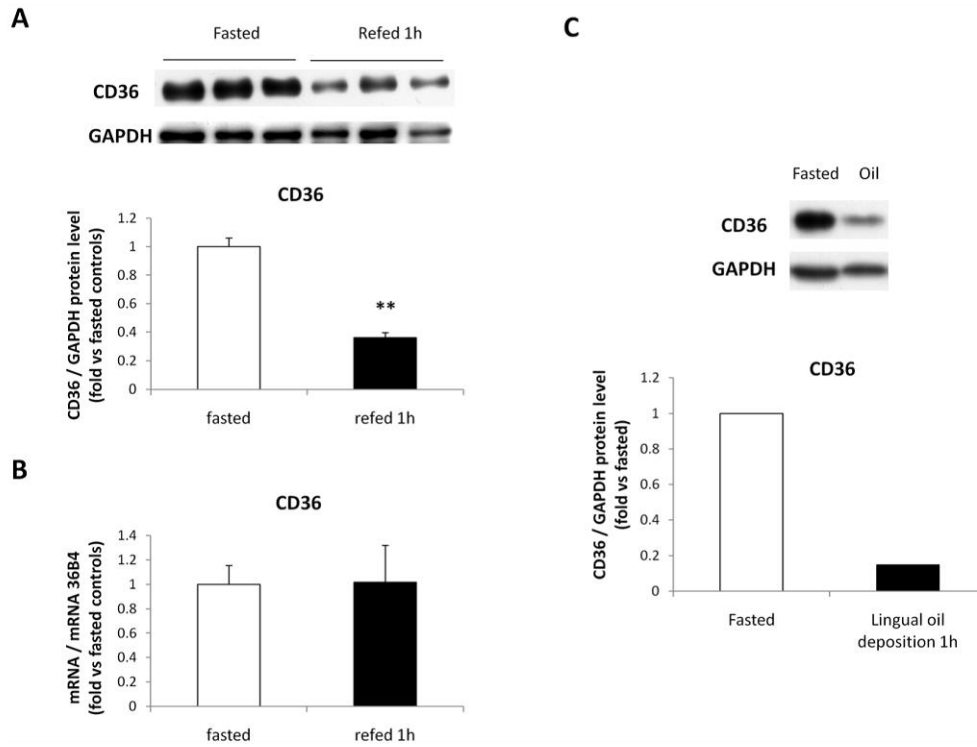


Figure 4. Dietary lipids induce a direct post-transcriptional down-regulation of lingual CD36. **A:** CD36 protein levels determined by western blotting in circumvallate papillae from fasted controls or mice refed ad libitum a standard laboratory chow for 1 h. Each point corresponds to a pool of total proteins from 3 mice. Means \pm SEM (n=3). ** p, 0.01. **B:** CD36 mRNA levels determined by real-time PCR in circumvallate papillae from fasted controls or mice refed ad libitum a standard laboratory chow for 1 h. Each value corresponds to a pool of total RNA from 2 mice. Means \pm SEM (n=5-6). **C:** CD36 protein level determined by western blotting in circumvallate papillae from fasted mice 1 h after a lingual deposition of soybean oil at t=0 and t=15 min. Controls were fasted mice. Each point corresponds to a pool of total proteins from 3 mice. Data are representative of two different experiments. doi:10.1371/journal.pone.0024014.g004

remained unchanged. Interestingly, we have recently identified a similar nutritional-mediated decrease of CD36 gene expression in the small intestine in refed rats or oil force-fed mice. In this tissue, the down-regulation of CD36 gene expression was consecutive to a lipid-mediated disappearance of CD36 protein from brush border membrane of enterocytes followed by a rapid degradation by the ubiquitin-proteasome pathway [17]. This event triggered the activation of a signalling cascade involving the ERK 1/2 pathway leading to an optimization of the chylomicron formation [17]. In the present study, the lipid-mediated decrease in CD36 protein levels being found using total CVP homogenates, it can be thought that it also results from a CD36 degradation. As reported for numerous surface receptors, such a negative regulatory feedback might elicit a physiological desensitization of lingual CD36 secondary to a persistent exposure to dietary lipids.

Lipid-induced modulation of CD36 in CVP constitutes an additive feature consistent with its involvement in the oro-sensory perception of dietary lipids. Indeed, it has been previously shown that CD36 expression is strictly restricted to the apical side of some

TBC lining the pore of gustatory papillae in the lingual epithelium from rat [5,6] and human [18]. Moreover, it exhibits a receptor-like structure, with an extracellular binding pocket [19] and a C-terminal cytoplasmic tail able to interact with kinases [20] constituting a functional complex able to activate cell signalling in TBC in a lipid-dependent manner. Consistent with this assumption, experiments using CD36 positive TBC isolated by immuno-magnetism from mouse CVP have shown that activation of CD36 by LCFA leads to the recruitment and activation of Src-PTK [9]. This event triggered a prompt and huge rise in intracellular ionized calcium levels ($[Ca^{2+}]_i$) [8] leading to the release of serotonin and nor-epinephrin, neuro-transmitters known to activate afferent gustatory nerve fibers [9]. It is noteworthy that all steps of this cascade are strictly CD36-dependent since they are not reproduced neither in CD36-negative TBC nor in CD36-positive TBC pre-treated with the pharmacological CD36 binding inhibitor, sulfo-N-succinimidyl oleic acid ester (SSO) [9]. Finally LCFA deposition onto the tongue induces the neuronal activation in the nucleus of solitary tract (NST) areas in the brainstem known

CD36 and GPR120 Regulation in Mouse Taste Buds

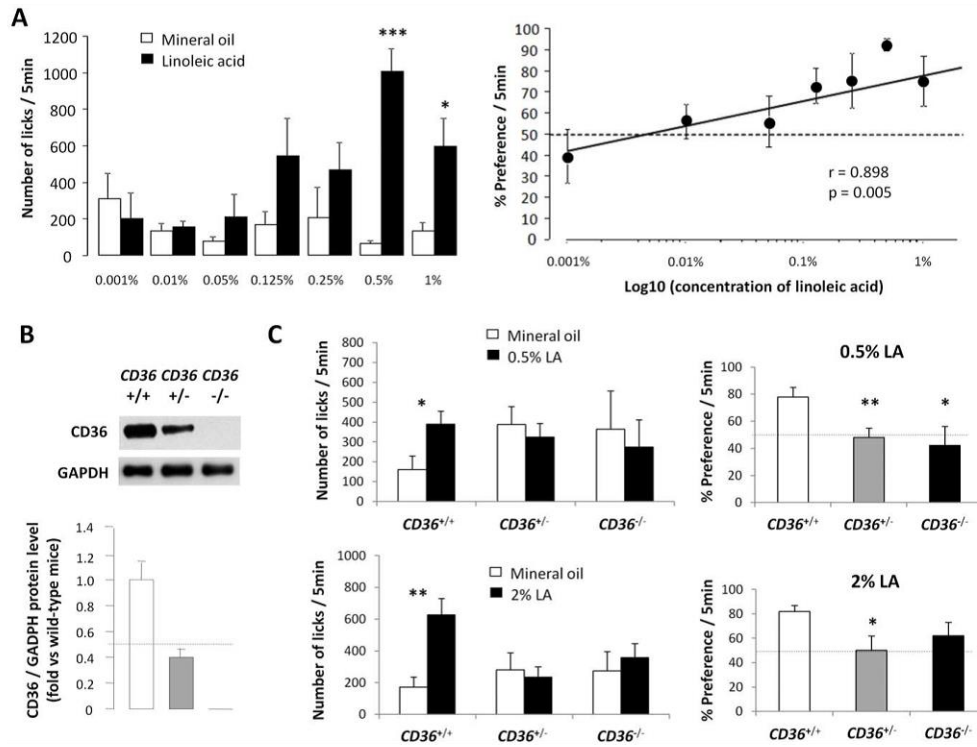


Figure 5. CD36 protein levels in circumvallate papillae can affect lipid preference. A: Number of licks of wild-type mice during 5 min behavioural experiments (i.e. two-bottle preference tests) as a function of concentrations of linoleic acid (LA) in mineral oil used to minimize textural cues. Means \pm SEM (n=4-9) * p, 0.05, *** p, 0.001. Relationship between the percentage of preference and the logarithm of linoleic acid concentration is also shown. Dotted line represents a lack of preference. B: CD36 protein levels determined by western blotting in circumvallate papillae of CD36^{+/+}, CD36^{+/-} or CD36^{-/-} mice. Each point corresponds to a pool of total proteins from 4 mice (n=2). Error bars are SEM. A representative immunoblot of CD36 and GAPDH is shown. C: Number of licks and percentage of preference for linoleic acid (LA) during 5 min behavioural experiments in CD36^{+/+}, CD36^{+/-} or CD36^{-/-} mice. Animals were allowed access to a control solution (mineral oil) and an experimental one (mineral oil + 0.5% or 2% LA). Dotted line represents a lack of preference. Means \pm SEM (n=6-11) * p, 0.05, ** p, 0.01. doi:10.1371/journal.pone.0024014.g005

to receive afferent fibers from gustatory nerves (i.e. chorda tympani and glossopharyngeal nerves). Interestingly, this activation appears to be CD36-dependent, since it is not reproduced in CD36-null mice subjected to an oral LCFA stimulation [8].

From a physiological point of view, we confirm in the present report the crucial role played by lingual CD36 in the oro-sensory detection of LCFA using a short-term (5 min) two-bottle preference test controlled by a computer. In these conditions, which minimize post-ingestive influences and CD36 activation in other tissues, CD36-null mice but not wild-type one are unable to discriminate the solution containing LCFA compared to the control solution. Interestingly, this lack of detection is also found in heterozygous CD36^{+/-} animals, expressing only half of the CD36 protein in CVP. Therefore, it is tempting to speculate that the two-fold drop in CD36 protein levels elicited by the refeeding in presence of dietary lipids might be sufficient to decrease the preference for lipids. According to this assumption, it can be thought that the lipid-mediated change in CD36 gene expression

in CVP might modulate the motivation for fat during a meal, initially high and then gradually decreasing during the food intake. This physiological negative feedback is reminiscent of sensory-specific satiety which refers to a temporary decline in pleasure derived from consuming a certain food in comparison to other unconsumed foods [21]. It is noteworthy that such an effect seems to be independent to GPR120 since its gene expression is unaffected by the food intake or the CD36 gene ablation.

The lipid-mediated down-regulation of CD36 protein found both in taste buds and intestinal mucosa also suggests that CD36 might play a similar role throughout the oro-intestinal tract, as a lipid sensor [22]. This assumption is supported by recent data showing that digestive and absorptive processing of ingested food is coordinated by specialized nutrient sensing systems in the intestinal tract similar to what is found in the oral cavity. For instance, the same T1R3 sweet taste receptor, that senses sugar in the mouth, also detects sugar in the intestinal lumen and triggers physiological responses affecting sugar metabolism [23,24]. These

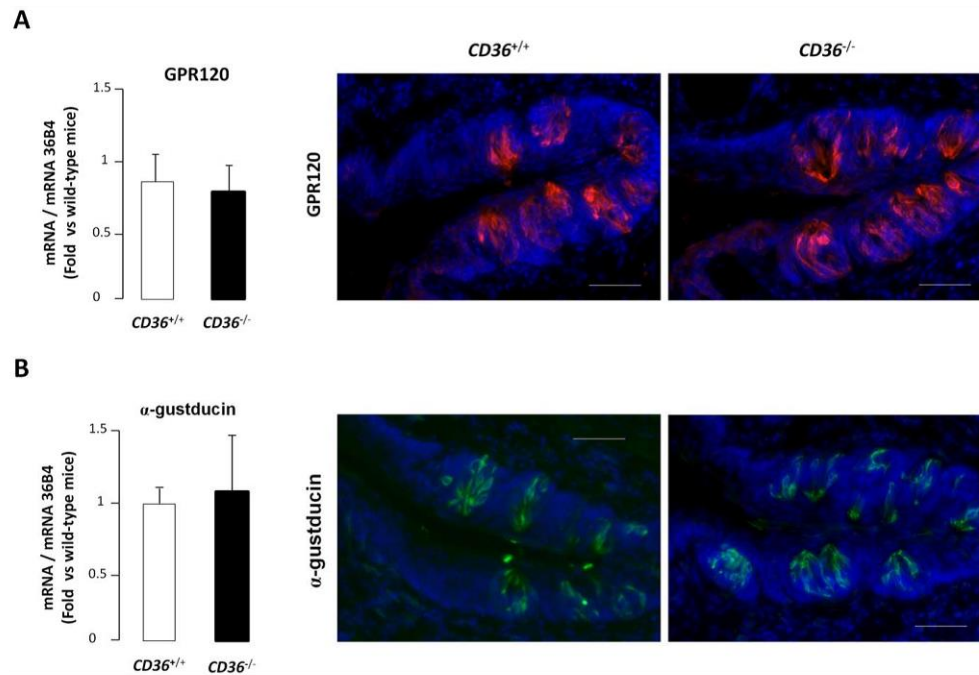


Figure 6. *GPR120* gene expression is unaffected by *CD36* gene invalidation. **A:** *GPR120* mRNA levels determined by real-time PCR in circumvallate papillae of *CD36*^{+/+} or *CD36*^{2/2} mice. Each value corresponds to a pool of total RNA from 3 mice. Means \pm SEM (n=4). Immunodetection of *GPR120* protein (red) in circumvallate papillae of *CD36*^{+/+} or *CD36*^{2/2} mice. Hoechst (blue) was used to stain the nuclei. Scale bar is 50 nm. **B:** α -gustducin mRNA levels determined by real-time PCR in circumvallate papillae of *CD36*^{+/+} or *CD36*^{2/2} mice. Each value corresponds to a pool of total RNA from 3 mice. Means \pm SEM (n=4). Immunodetection of α -gustducin protein (green) in circumvallate papillae of *CD36*^{+/+} or *CD36*^{2/2} mice. Hoechst (blue) was used to stain the nuclei. Scale bar is 50 nm. doi:10.1371/journal.pone.0024014.g006

observations suggest the existence of a “functional continuum” throughout the oro-intestinal tract responsible for the real-time analysis and control of ingested energy nutrients and their subsequent digestion, absorption and metabolic fate in the body.

Compelling evidences show that oral perception of LCFA affects food intake contributing to the risk of weight gain and obesity. An inverse correlation between peripheral gustatory sensitivity to poly-unsaturated fatty acids and preference for lipid-rich foods was reported in rats [25]. Recently, experiments performed in healthy humans have highlighted the relationship between the oro-sensory fat perception and the body mass index. Hypersensitivity to lipids was associated with lower energy consumption, fat intake and body mass index [26]. Whether threshold of sensitivity to dietary lipids is dependent of *CD36* and/or *GPR120* in humans remains to be determined. A better understanding of molecular mechanisms responsible for the oro-sensory reception of dietary lipids and their physiological impacts

on the feeding behaviour should allow the development of new therapeutic and nutritional strategies for mitigating excess food intake.

Acknowledgments

We are indebted to Dr M. Febbraio (Department of Cardiovascular Medicine, Cleveland Clinic, Cleveland, USA) for the provision of *CD36*-null mice. We thank Marie-Claude Monnot and Marjorie Buttet for their technical assistance.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: CM MC DG PP-D PB. Performed the experiments: CM MC DG J-FM PP-D PB. Analyzed the data: CM MC DG PP-D PB. Contributed reagents/materials/analysis tools: CM MC DG J-FM. Wrote the paper: CM PB.

References

- Bray GA, Paolucci S, Popkin BM (2004) Dietary fat and obesity: a review of animal, clinical and epidemiological studies. *Physiol Behav* 83: 549–555.
- Mattes RD (2000) Is there a fatty acid taste? *Annu Rev Nutr* 20: 305–327.
- Silverstein RL, Febbraio M (2009) *CD36*, a scavenger receptor involved in immunity, metabolism, angiogenesis, and behavior. *Sci Signal* 2: re3.
- Baillie AG, Coburn CT, Abumrad NA (1995) Reversible binding of long chain fatty acids to purified FAT, the adipose *CD36* homologue. *J Membr Biol* 153: 75–81.
- Fukuwatari T, Kawada T, Tsuruta M, Hirakawa T, Iwanaga T, et al. (1997) Expression of the putative membrane fatty acid transporter (FAT) in taste buds of the circumvallate papillae in rats. *FEBS Lett* 414: 461–464.

CD36 and GPR120 Regulation in Mouse Taste Buds

6. Laugerette F, Passilly-Degrace P, Patris B, Niot I, Febbraio M, et al. (2005) CD36 involvement in orosensory detection of dietary lipids: spontaneous fat preference, and digestive secretions. *J Clin Invest* 115: 3177–3184.
7. Scafani A, Adroff 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: R1823–1832.
8. Gaillard D, Laugerette F, Darcel N, El-Yasimi A, Passilly-Degrace P, et al. (2008) The gustatory pathway is involved in CD36-mediated orosensory perception of long-chain fatty acids in the mouse. *FASEB J* 22: 1458–1468.
9. El-Yasimi 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.
10. Chandrasekar J, Hoon MA, Ryba NJ, Zuker CS (2006) The receptors and cells for mammalian taste. *Nature* 444: 288–294.
11. Carboni C, Yasumatsu K, Ohkuri T, Shigemura N, Yoshida R, et al. (2010) Taste preference for fatty acids is mediated by GPR40 and GPR120. *J Neurosci* 30: 8376–8382.
12. Matsuura S, Mizushige T, Yoneda T, Iwanaga T, Tazuki S, et al. (2007) GPR expression in the rat taste bud relating to fatty acid sensing. *Biomed Res* 28: 49–55.
13. Febbraio M, Abumrad NA, Hajjar DP, Sharma K, Cheng W, et al. (1999) A null mutation in murine CD36 reveals an important role in fatty acid and lipoprotein metabolism. *J Biol Chem* 274: 19055–19062.
14. Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔC_T} Method. *Methods* 25: 402–408.
15. Passilly-Degrace P, Gaillard D, Besnard P (2009) Orosensory perception of dietary lipids in mammals. *Results Probl Cell Differ*. pp 1–48.
16. Hirasawa A, Tsumaya K, Awaji T, Katsuma S, Adachi T, et al. (2005) Free fatty acids regulate gut incretin glucagon-like peptide-1 secretion through GPR120. *Nat Med* 11: 90–94.
17. Tran TT, Poirier H, Clement L, Nassir F, Peters MM, et al. (2011) Luminal lipid regulates CD36 levels and downstream signaling to stimulate chylomicron synthesis. *J Biol Chem*.
18. 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*.
19. Rac ME, Saitanow K, Poncyfusz W (2007) Molecular Basis of Human CD36 Gene Mutations. *Mol Med* 13: 288–296.
20. 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.
21. Cabanac M (1971) Physiological role of pleasure. *Science* 173: 1103–1107.
22. Martin C, Chevrol M, Poirier H, Passilly-Degrace P, Niot I, et al. (2011) CD36 as a lipid sensor. *Physiol Behav*.
23. Jang HJ, Kokrashvili Z, Theodorakis MJ, Carlson OD, Kim BJ, et al. (2007) Gut-expressed gustducin and taste receptors regulate secretion of glucagon-like peptide-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 15069–15074.
24. Margulies RF, Dyer J, Kokrashvili Z, Simon KS, Hegans E, et al. (2007) T1R3 and gustducin in gut sense sugars to regulate expression of Na⁺-glucose cotransporter 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 15075–15080.
25. 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.
26. Stewart JE, Feinle-Bisset C, Golding M, Delahunty C, Clifton PM, et al. (2010) Oral sensitivity to fatty acids, food consumption and BMI in human subjects. *Br J Nutr* 104: 145–152.



Contents lists available at ScienceDirect

Physiology & Behavior

journal homepage: www.elsevier.com/locate/phb

CD36 as a lipid sensor

Céline Martin, Michael Chevrot, Hélène Poirier, Patricia Passilly-Degrace, Isabelle Niot, Philippe Besnard*

Physiologie de la Nutrition, UMR INSERM U866/Université de Bourgogne, AgroSup Dijon, 1, Esplanade Erasme, 21000 Dijon, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 6 January 2011

Received in revised form 10 February 2011

Accepted 17 February 2011

Keywords:

Lipids

Lipid-binding proteins

Lipid receptors

Fat preference

Behavior

ABSTRACT

CD36 is a multifunctional protein homologous to the class B scavenger receptor SR-B1 mainly found in tissues with a sustained lipid metabolism and in several hematopoietic cells. CD36 is thought to be involved in various physiological and pathological processes like angiogenesis, thrombosis, atherogenesis, Alzheimer's disease or malaria. An additive emerging function for CD36 is a role as a lipid sensor. Location of CD36 and orthologue molecules in plasma membrane of cells in contact with the external environment (e.g. gustatory, intestinal or olfactory epithelia) allows the binding of exogenous-derived ligands including dietary lipids, diglycerides from bacterial wall in mammals and even a lipid-like pheromone in insects. Similar function might also exist in the brain in which a CD36-dependent sensing of fatty acids has been reported in ventromedial hypothalamic neurons in rodents. Specific recognition of lipid-related molecules by a receptor-like protein highly conserved throughout the evolution strongly suggests that lipid-sensing by CD36 is responsible for basic physiological functions in relation with behavior, energy balance and innate immunity.

   2011 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Obesity epidemic spreads rapidly over the world especially in children. Origin of obesity epidemic is clearly dependent from multiple parameters. Increased consumption of more energy-dense, nutrient-poor foods with especially high levels of lipids participates to this epidemic situation. Behavioral experiments in both rats and mice show a spontaneous preference for fatty foods. This lipid attraction is so strong that a mouse with a free access to a source of oil in addition to a standard laboratory chow becomes rapidly obese [1]. In humans, studies also report that obese subjects have a higher preference for lipids when compared to lean subjects [2,3]. Why fatty foods are so attractive is not yet fully understood. Recent data demonstrate that low quantities of long-chain fatty acids (LCFA, number of carbons > 16) can be specifically detected in oral cavity by laboratory rodents and humans (for review see Ref. [4]). Interestingly, a plasma membrane lipid-binding protein termed CD36, recently identified in rodent taste buds [5,6], seems to play a crucial role in the oro-sensory perception of dietary lipids. Indeed, CD36 gene disruption greatly abolishes the spontaneous preference for fatty foods in the mouse [6,7]. It has been shown that oral sensing of lipids by CD36 takes place through the gustatory circuitry [8]. These original data suggest that CD36 plays a

significant role in the oro-sensory perception of dietary lipids as a lipid sensor. Such a conclusion might seem paradoxical. Indeed, contrary to taste receptors whose tissue expression and binding affinities are restricted, CD36 is a broadly expressed and multifunctional protein. How does CD36 participate to the lipid sensing in the oral cavity? Does CD36 play the role of a lipid sensor in other tissues? What is the impact of such a function on feeding behavior and health? Why can CD36 play several functions? This minireview will attempt to answer these questions.

2. CD36, a complex glycoprotein with broad functions

The fatty acid translocase (FAT) was first identified in rat adipocytes by labeling with sulfo-N-succinimidyl esters of LCFA under conditions where LCFA uptake was significantly inhibited [9]. It has been established that FAT is a 88 kDa transmembrane glycoprotein homologous to the human scavenger receptor CD36 (cluster of differentiation 36). The primary structure and topology of CD36 appears to be highly conserved in mammals and CD36-like proteins have also been identified in *Drosophila* and in nematodes suggesting that this protein plays basic roles.

2.1. Structure

CD36 contains 471 amino-acid residues corresponding to an expected molecular mass of 53 kDa. However, apparent molecular mass of CD36 is in mean of 88 kDa by reason of variable post-translational N-linked glycosylations. Analysis of amino-acid sequence of CD36 predicts a receptor-like structure (Fig. 1). Two trans-membrane domains located near the N- and C-terminal tails result in a hairpin

Abbreviations: AGE, advanced glycation end-products; cVA, cis-vaccenyl acetate; FAT, fatty acid translocase; GPCR, G protein-coupled receptor; LCFA, long-chain fatty acids; LDL, low density lipoproteins; LTA, lipoteichoic acid; NST, nucleus of the solitary tract; OR, olfactory receptors; PPAR, peroxisome proliferator-activated receptor; SNMP, sensory neuron membrane protein; Src-PTK, Src protein tyrosine kinases; SSO, sulfo-succinimidyl oleate ester; TBC, taste bud cells; TLR, Toll-like receptors; VMN, ventromedial nucleus.

* Corresponding author. Tel./fax: +33 3 80 77 40 91.

E-mail address: pbsnard@u-bourgogne.fr (P. Besnard).

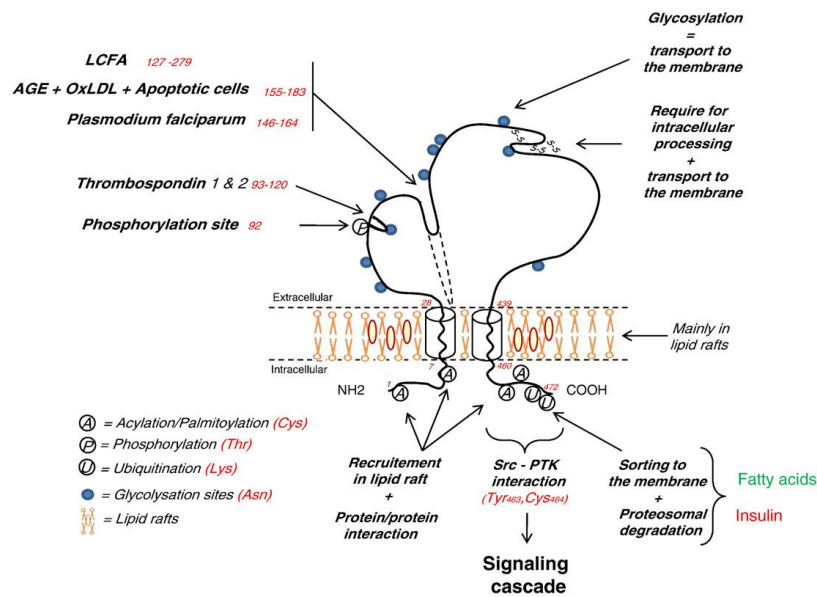


Fig. 1. Main structural features of human CD36. AGE, advanced-glycation end products; LCFA, long-chain fatty acids; OxLDL, oxidized low density lipoproteins; Src-PTK, Src protein tyrosine kinases. Adapted from Refs. [10,75,76].

configuration with a large extracellular domain containing at least two different binding sites [10]. The first one, located from 93 to 120 amino-acid residues, is a thrombospondin-binding site while the second one constitutes a large hydrophobic pocket containing different domains able to bind specific molecules responsible for the recognition of erythrocytes infected with the *Plasmodium falciparum* [11] (146–164 residues) and oxidized low density lipoproteins (LDL) [12], advanced glycated end products (AGE) [13] or apoptotic cells [14] (155–183 residues). This binding site is also able to bind saturated and unsaturated LCFA with an affinity in the nanomolar range [15]. This ectodomain also contains multiple glycosylation sites and three disulfide bridges essential for the intracellular processing of the protein and its correct targeting towards the plasma membrane (Fig. 1). The N- and C-terminal tails contain cysteine residues that acylation and/or palmitoylation contribute to the recruitment of CD36 in the lipid rafts [16]. Conversely, ubiquitination of Lys⁴⁶⁹ and Lys⁴⁷² found in the C-terminal tail facilitates the sorting of CD36 to the plasma membrane and its subsequent degradation by the proteasome pathway [17]. It is noteworthy that the Tyr⁴⁶³ and Cys⁴⁶⁴ found in the C-terminal tail are able to interact with Src-protein tyrosine kinases (Src-PTK), known to be involved in cell signaling [18]. Therefore, CD36 displays all the features require to transfer an exogenous signal into the cell.

2.2. Tissue distribution and cellular localization

In mammals, CD36 is found in tissues subjected to important lipid fluxes, like the adipose tissue [19], skeletal and cardiac muscles [20], small intestine [21] or mammary glands [22]. It is also expressed in various hematopoietic cells including monocytes/macrophages [23,24], platelets and megacaryocytes [25]. CD36 has also been identified in sensory cells of retina [26], taste buds [5,6,27] and in several hypothalamic neurons [28]. CD36 is subjected to many post-translational changes (acylation/palmitoylation, glycosylation, ubiquitination, Fig.1) that facilitate its circulation into the cell. This feature explains why CD36 has been found both in plasma membrane and intracellular compart-

ments in embryonic fibroblasts from wild-type mice. In the plasma membrane, CD36 is mainly found in cholesterol-rich microdomains (i.e. lipid rafts, Fig. 1) in which it can form functional associations with other receptors like caveolin-1 [29,30]. Such a protein-protein interaction might be useful for the stabilization of CD36 in the membrane since it is lacking in plasma membrane from caveolin-null mice [31]. Moreover, co-localization of CD36 with Src-PTK or Toll-like receptor 2/6 (TLR) heterodimer has been reported in platelets and intestinal epithelium, respectively [32,33]. In *Drosophila*, a CD36 homologue, the sensory neuron membrane protein (SNMP) has recently been found in a population of olfactory neurons [34].

2.3. Main functions

CD36 recognizes a wide range of hydrophobic ligands which are either native (i.e. thrombospondin, collagen or LCFA) or modified molecules found in body fluid (i.e. oxidized LDL or AGE) or on the surface of apoptotic cells, *P. falciparum*-infected erythrocytes or cell-derived micro-particles (Fig. 2). According to this broad binding specificity, CD36 is thought to be involved in several physiological and pathological events (for a recent review see Ref. [35]). For instance, by reason of its affinity for thrombospondin-1 and collagen, CD36 plays a role in angiogenesis [36] and thrombosis [37]. By its implication in LCFA uptake by adipocytes and myocytes [38], CD36 contributes to the regulation of energy balance and, hence, to obesity risk. Consistent with this assumption, Hajri et al. show that CD36-null mice display a decrease in adipose tissue mass [39]. Savill et al. were the first to assign a role to CD36 in the recognition and phagocytosis of apoptotic cells by macrophages [40]. This scavenger function of CD36 also concerns various other modified molecules or cell structures including oxidized LDL [23], β -amyloid peptide [41], shed outer segments of photoreceptors [26] or erythrocytes infected with *P. falciparum* [42] explaining the implication of CD36 in atherogenesis, Alzheimer's disease, retinal degeneration or malaria.

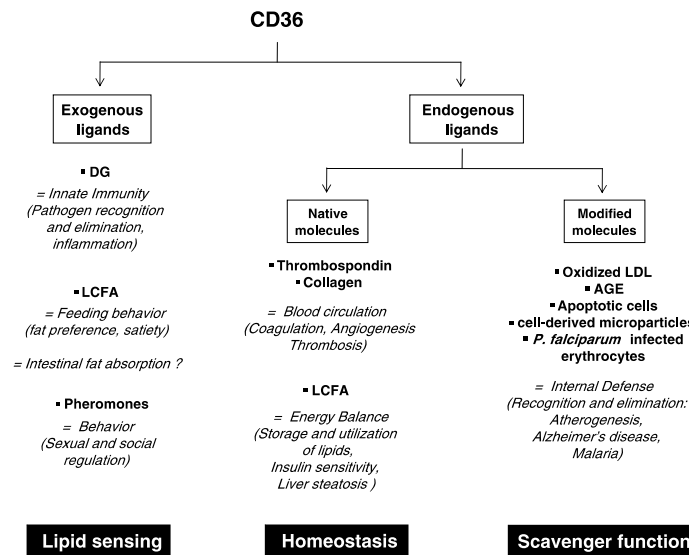


Fig. 2. Binding properties and related-functions of CD36. AGE, advanced-glycation end-products; DG, diglycerides; LCFA, long-chain fatty acids; LDL, low density lipoproteins.

3. Role of CD36 in lipid sensing

It has been reported both in mammals (rodents and humans) and in insects (*Drosophila*) that CD36 or orthologue molecules also recognize, with a high affinity, exogenous ligands including LCFA, fatty acid-derived pheromones or microbial diglycerides (Fig. 2). The common lipid nature of these ligands and the fact that CD36 gene has been highly conserved during the evolution raise the possibility that CD36 also plays the role of a lipid sensor responsible for basic physiological functions like behavior, regulation of energy balance and innate immunity.

3.1. In chemo-sensory perception of lipids

Recent data strongly suggest that CD36 plays a role in the chemo-sensory perception of lipids in different tissues and organs including gustatory papillae and hypothalamus in mammals or olfactory epithelium in *Drosophila*.

3.1.1. Taste buds

Rats and mice spontaneously prefer lipid-rich foods [43,44]. Although dietary lipids are mainly constituted of triglycerides, LCFA seem to be responsible for this attraction for fat. Indeed, in a free choice situation, rats prefer LCFA to medium chain fatty acids or triglycerides [43,45]. Lingual lipase, which is responsible for an efficient release of LCFA from triglycerides in rodents, seems to play a significant role in oral fat perception. Indeed, its pharmacological inhibition leads to a dramatic decrease in lipid preference in the mouse [46]. These observations raise the possibility that laboratory rodents have a chemo-sensory system devoted to the lipid detection. Since taste reception is ensured by specific chemo-sensitive proteins located on the apical side of the taste bud cells (TBC), an oro-sensory perception of lipids also requires the existence of specific lipid-sensors displaying a high affinity for LCFA in gustatory papillae. Interestingly, CD36 is found in the rodent lingual epithelium in which it is strictly restricted to taste buds [5,6]. Moreover, CD36 protein appears to be mainly localized to the apical side of some sensory cells

lining the pore of taste buds from mouse circumvallate papillae [6]. This location of a protein with a very high affinity for LCFA appears to be especially suitable for an efficient sensing of dietary lipids. Indeed, CD36-positive TBC are directly exposed to a microclimate potentially rich in LCFA, due to the local release of lingual lipase in the clefts of circumvallate papillae [46].

In the TBC, interaction between a tastant (e.g. sucrose for the sweet taste) with its specific taste receptors (e.g. T1R2/T1R3 heterodimer) triggers a signaling cascade leading to a huge rise in intracellular ionized calcium ($[Ca^{2+}]_i$) levels [47]. This change induces, in turn, a neurotransmitter release by the TBC which is at the origin of a taste signal. Using CD36-positive TBC freshly isolated from mouse circumvallate papillae by affinity purification with magnetic beads, it has been shown that saturated and unsaturated LCFA induce a selective, rapid and significant elevation of $[Ca^{2+}]_i$ levels [8]. This effect was strictly CD36-dependent since it is not reproduced in CD36-negative TBC. Moreover, pharmacological inhibition of the lipid-binding site of CD36 by the sulfo-N-succinimidyl oleate ester (SSO) [48] fully abolished the rise in $[Ca^{2+}]_i$ levels induced by linoleic acid [8]. Finally, it has been shown that there was a CD36-dependent neurotransmitter release (mainly serotonin) when TBC were cultured in the presence of LCFA [49]. In brief, LCFA are able to activate TBC via CD36 in the mouse circumvallate papillae.

Interestingly, CD36 gene inactivation abolishes both fat preference [6,7] and the cephalic phase of digestion triggered by an oral LCFA deposition [6]. These physiological effects are elicited by the gustatory circuitry. Indeed, the oral lipid signal is transmitted by the gustatory nerves (i.e. chorda tympani and glossopharyngeal nerves) to gustatory area in the nucleus of the solitary tract (NST) in the brainstem which is the first taste relay in the central nervous system [8]. The projections of the NST to hypothalamic nuclei involved in eating behavior and to the digestive tract could account for both the CD36-mediated attraction for lipids [6,7] and activation of the cephalic phase of the digestion [6] found in wild-type mice subjected to an oral lipid stimulation. Altogether, these data strongly suggest that lingual CD36 is a lipid sensor involved in the oro-sensory perception of dietary lipids in rodents.

Another lipid-sensor candidate, GPR120, has been recently found in mouse [50,51] and rat [52] gustatory papillae. This G protein-coupled receptor (GPCR), firstly identified in enteroendocrine cells, functions as a receptor for LCFA leading to the secretion of glucagon-like peptide-1 [53] and cholecystokinin [54], two hormones known to participate in the control of food intake through the activation of gut-brain neural pathways. Interestingly, as reported for CD36, inactivation of the gene encoding for *GPR120* renders mice unable to properly detect the presence of LCFA in a textured solution during behavioral tests [51]. The respective role played by CD36 and GPR120 in TBC is not yet established. Could a difference in ligand affinity, cell distribution and/or a required cooperation between these two proteins explain the phenotype of respective CD36 and GPR120-null mice?

It can be thought that a similar oro-sensory detection of dietary lipids might also exist in humans. Indeed, psychophysical data strongly suggest that healthy adult subjects are able to specifically detect very low quantities of fatty acids in a textured mixture. The protocol used to minimize olfactory and somatosensory (texture, spicity) influences, this perception has been attributed to taste [55]. Moreover, CD36 gene is also specifically expressed in TBC in humans [27]. Recently, experiments performed in healthy humans have highlighted the relationship between the oro-sensory fat perception and the body mass index. Hypersensitivity to lipids was associated with lower energy consumption, fat intake and body mass index [56]. Whether the threshold of sensitivity to dietary lipids is dependent of CD36 and/or other lipid-sensors in humans remains to be determined. Further studies in patients with null-mutations for genes encoding for CD36 or GPR120 might allow to answer this question.

3.1.2. Hypothalamic neurons

CD36 is also found in the hypothalamus [28] although its function in this tissue remains elusive. It is well known that the hypothalamus is the major integrative site for nervous, endocrine and nutrient signals which control food intake and energy balance [57]. Humoral regulators may act directly on the central nervous system due to the discontinuity of the blood-brain barrier. It has recently been shown that central injection of oleic acid inhibited the food intake in rats [58]. This satiating effect might be mediated by fatty acid-sensitive neurons located in the hypothalamus [59]. However, the molecular mechanisms responsible for this regulation are not yet fully established. In this context, CD36 was a plausible candidate. Consistent with this hypothesis, it has been shown that oleic acid was able to activate or inhibit neurons isolated from the ventromedial nucleus (VMN) in rat hypothalamus. This effect was glucose-independent [28]. Moreover, pharmacological inhibition of the CD36 binding site by SSO led to a 2-fold decrease of effects of oleic acid in fatty acid-excitatory and fatty acid-inhibitory neurons [28]. These authors suggest that exogenous free fatty acids can affect the neuronal activity of VMN through at least two distinct pathways, one being CD36-dependent [28]. Like in TBC, it appears that CD36 in VMN neurons plays the role of a lipid sensor which activates or inhibits activity of specific hypothalamic neurons. Further investigations are required to determine the molecular mechanisms implicated and explore if this central lipid-sensing has a direct physiological impact on the regulation of food intake and energy homeostasis.

3.1.3. Olfactory sensory neurons

Recent identification in *Drosophila* of a CD36-related receptor involved in olfactory detection of the fatty acid-derived pheromone *cis*-vaccenyl acetate (cVA) [34] suggests that the lipid-sensing function of CD36 may be widespread throughout the animal kingdom. Sensory neuron membrane protein (SNMP) is insect membrane proteins associated with specific olfactory neurons. In *Drosophila*, SNMP forms a functional complex with the olfactory receptor (OR) heterodimer Or67d and Or83b which binds cVA on the surface of olfactory dendrites. This pheromone sensing system, present in specialized neural cells (e.g.

from antenna), generates action potentials in presence of cVA [34] leading to stereotyped sexual and aggregation behaviors. The essential functional role played by SNMP in this pheromone detection system has been demonstrated by using *Snmp* mutants. In contrast to what was found in wild-type neurons, *Snmp* mutant neurons displayed no cVA-evoked action potentials at any concentration tested. The rescue of *Snmp* transgene in Or67d-expressing neurons fully restored stimulus-evoked response [34]. In brief, the CD36 related protein SNMP broadly expressed in pheromone-sensing neurons in *Drosophila* is an essential co-factor for the detection of the fatty-acid derived molecule cVA.

3.2. In intestinal fat absorption

In the small intestine, the CD36 expression levels (mRNA and protein) are especially high in the duodeno-jejunum, the major site of fat absorption [21]. Immunohistochemical studies in rats and humans demonstrate that CD36 is strictly localized in the brush border membrane of well differentiated enterocytes [21,60]. Therefore, it has been proposed that intestinal CD36 plays a role in fat absorption. However, its role in lipid intestinal uptake remains a matter of debate. In isolated enterocytes, CD36 gene inactivation either impairs LCFA uptake [61] or has no effect [62]. *In vivo*, the lack of dramatic intestinal phenotype in CD36-null mice, as well as in patients with type I CD36 deficiency, seems to preclude a critical role in the net LCFA intestinal absorption [61,63]. Consistent with this assumption, no change in LCFA uptake is found in CD36-null mice using an *in situ* isolated jejunal loop, an *in vivo* approach known to respect both intestinal microclimate (i.e. unstirred water layer, cell polarization) and lymph/blood circulation (I.N., unpublished data). By contrast, a disappearance of CD36 in the brush border membrane of enterocytes is observed in rodents in the post-prandial period [64]. Interestingly, this phenomenon is rapid and strictly lipid-dependent. This lipid-induced internalization of CD36 is followed by an ubiquitin/proteasome-mediated degradation of CD36 (I.N., unpublished data), which is reminiscent of the receptor desensitization [65]. Functional interest of this phenomenon remains to be established. However, this finding seems more consistent with a role as a lipid-receptor rather than an efficient lipid transporter. Indeed, if CD36 internalization constituted a vectorial transport system facilitating the targeting of LCFA toward the sites of lipoprotein synthesis (i.e. endoplasmic reticulum and golgi), the efficiency of such a transport system should be questionable, especially during high lipid loads (i.e. the post-prandial periods). In respect to its lipid mediated regulation, an alternative hypothesis is an involvement of CD36 as a lipid-sensor leading to metabolic adaptation at the origin of more efficient lipid handling by enterocytes during the post-prandial period [66]. In agreement with this assumption, a triglyceride retention in enterocytes and a production of smaller chylomicrons were observed in CD36-null mice subjected to a high-fat diet [62,63,67]. Contribution of CD36 as an intestinal lipid sensor is also supported by recent data showing that CD36 can link dietary fat intake to satiety via the synthesis of the endocannabinoid oleyletanolamide [68]. Therefore, intestinal CD36 seems to be a lipid-receptor involved in oleyletanolamide production and lipoprotein synthesis and secretion.

3.3. In innate immunity

Release of lipoteichoic acid (LTA) from Gram-positive bacteria cell walls elicits a homeostatic innate immune response. It has been recently shown that CD36 facilitates the recognition of bacterially-derived LTA by the TLR2/TLR6 complex in macrophages [33]. This phenomenon triggers the production of pro-inflammatory cytokines participating to the defense against microbes. Using a drug-mediated mutation strategy, Hoebe et al. have shown that homozygous mice insensitive to LTA ("*oblivious*" mice) have an increased morbidity compared to wild-type mice when they were subjected to Gram-

positive inocula. Gene sequencing of oblivious mice revealed a missense mutation (T1022A) in the coding region of CD36 gene leading to the production of non functional truncated protein. Since a similar morbidity was also found in CD36-null mice, it has been concluded that CD36 is a sensor of bacterially-derived diglycerides [33]. It has been recently shown that the role of CD36 as a TLR2 co-receptor is strictly dependent on its ectodomain, excluding a signaling or endocytosis mediated effects dependent from its intracellular domains [69]. Since CD36 ectodomain is able to bind more than one molecule of polyanionic ligands and thus concentrate LTA on the surface of cells, CD36 appears to be a lipid sensor, linking bacteria to innate immune system, required to maintain host integrity.

3.4. CD36 as a lipid sensor: a unified working model?

This overview highlights the role of “signaling bridge” played by CD36 in the recognition and transfer of lipid ligands to TLR or OR. In this context, CD36 appears to be an obligate co-partner. Indeed, CD36 gene inactivation leads to a dramatic decrease in both innate immunity and detection of the fatty acid-derived pheromone cVA. A unified model for CD36 function, coupling recognition of lipid extracellular ligands to signaling receptors in both pheromonal communication and activation of innate immunity has been proposed by Benton et al. [34]. Consistent with this model, it may be hypothesized that CD36 might also serve as an essential co-receptor in taste buds by transferring LCFA to GPR120. Indeed, CD36 displays a higher affinity for LCFA than GPR120 and a stoichiometry of 1 mole protein for 3 mole LCFA [15,53], two binding properties especially suitable for the trapping on the cell surface of minute quantities of LCFA found in saliva. Moreover, it seems that CD36 and GPR120 can be co-localized in some taste bud cells (C.M., personal data). This cooperation might take place in specialized cholesterol-rich membrane micro-domains since CD36 is known to be mainly localized in membrane lipid rafts as well as several GPCRs [29,70]. Such a scenario might explain why both CD36 and GPR120 gene inactivation significantly alters fat preference in

the mouse. As suggested for TLR2 [69], this co-receptor function of CD36 might be dependent only on its ectodomain (Fig. 3A) excluding downstream signaling induced by the intracellular domains of the molecule (Fig. 3B). Indeed, ligand-induced activation of CD36 is also known to contribute to the assembly of a signaling complex with Src family kinases and MAPK leading to downstream functions (for a review see Ref. [35]). This last signaling system, not taking into account in the Benton’s model, participates to the functional complexity of CD36. Further experiments are required to better understand the molecular mechanisms responsible for CD36 function as a lipid sensor, which probably depends on the different receptor partners found in each cell membrane.

4. Why is CD36 a multifunctional protein?

Despite its multifunctionality, CD36 generally plays a specific role in a given cell type. For example, it is involved in collagen-mediated cytoadhesion in platelets, whereas it mediates LCFA uptake in myocytes. This cell specificity of function probably results from both cellular context (genotype and microenvironment) and aspects of CD36 itself. Indeed, regulation of the CD36 gene is unusually complex [71]. Human, rat and mouse CD36 genes contain several alternative and independent promoters and first exons [10,72,73]. The expression profiles of these alternative transcripts differ considerably between tissues [71], resulting in the tissue-specific regulation of CD36 gene expression. For instance, differences in the CD36 promoters expressed in the liver and small intestine account for the differential regulation of the CD36 gene by peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) agonists observed in these tissues [72]. The diversity of post-translational modifications of CD36 (glycosylation, phosphorylation, acylation, palmitoylation, ubiquitination) also contributes to the cell-type specificity of its functions. For example, the degree of glycosylation of the CD36 extracellular domain varies considerably between tissues [74]. This phenomenon may result in specific physiological effects due to the selection of a specific ligand in a specific cell.

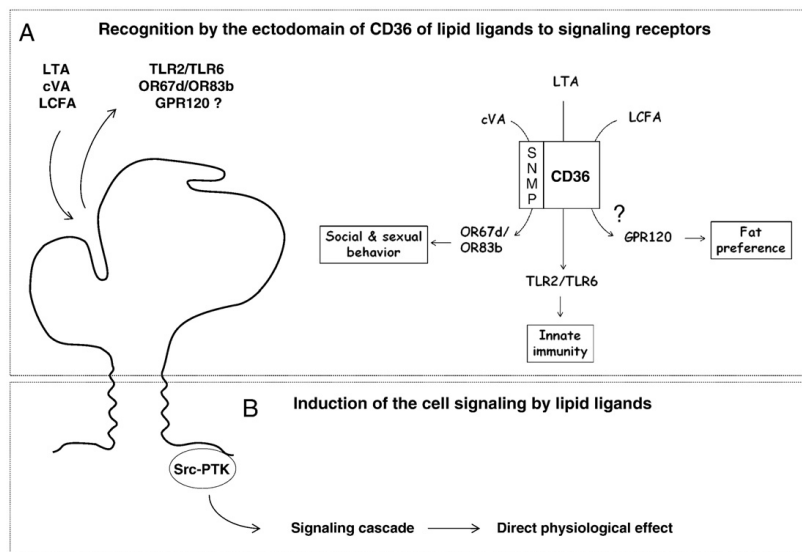


Fig. 3. Unified working model for CD36 function as a lipid sensor. A—Involvement of ectodomain of CD36 in the recognition of lipid ligands to signaling receptors. B—Implication of C-terminal cytosolic tail of CD36 in cell signaling cascade. cVA, cis-vaccenyl acetate; LCFA, long-chain fatty acids; LTA, lipoteichoic acid; SNMP, sensory neuron membrane protein; Src-PTK, Src protein tyrosine kinases.

5. Future directions

CD36 is a multi-ligand glycoprotein with a large spectrum of expression highly conserved during the evolution. It is a multifunctional protein involved in many physiological and pathological processes. Among its basic functions, a role of CD36 as a lipid sensor is gradually confirmed. Through this action, CD36 might actively participate to the protection of host integrity by inducing innate immunity via the activation of TLR. The fact that CD36 is found both in gustatory papillae, small intestine and hypothalamus suggest that CD36 might also participate to a "functional continuum" along an oro-intestinal–brain axis responsible for the permanent sensing and control of ingestion, digestion, absorption and body metabolic fate of dietary lipids. Such a working hypothesis raises the possibility that an inappropriate lipid perception along this axis might influence obesity risk by impacting feeding behavior (preference, satiation, satiety) and energy balance. Consistent with this assumption, it has been recently reported the existence of an inverse correlation between the lipid orosensory perception threshold, preference for fatty foods and body mass index in healthy subjects [56]. Whether the threshold of sensitivity to dietary lipids is dependent of CD36 and/or other lipid-sensors (GPCR) remains to be determined. Albeit this finding must be confirmed, it raises the possibility of novel pharmacological strategies to modify attraction for fatty foods and decrease obesity risks.

Acknowledgements

Authors are supported by the French Research Agency (ANR, SensoFAT project) and by the Burgundy Council. C.M. and M.C. are fellows of ANR and Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche, respectively.

References

- Takeda M, Imaizumi M, Sawano S, Manabe Y, Fushiki T. Long-term optional ingestion of corn oil induces excessive caloric intake and obesity in mice. *Nutrition* 2001;17:117–20.
- Mela DJ, Sacchetti DA. Sensory preferences for fats: relationships with diet and body composition. *Am J Clin Nutr* 1991;53:908–15.
- Drewnowski A, Brunzell JD, Sande K, Iverius PH, Greenwood MR. Sweet tooth reconsidered: taste responsiveness in human obesity. *Physiol Behav* 1985;35:617–22.
- Passilly-Degrace P, Gaillard D, Besnard P. Orosensory perception of dietary lipids in mammals. *Results Probl Cell Differ* 2009;1–18.
- Fukuwatari T, Kawada T, Tsuruta M, Hiraoka T, Iwanaga T, Sugimoto E, et al. Expression of the putative membrane fatty acid transporter (FAT) in taste buds of the circumvallate papillae in rats. *FEBS Lett* 1997;414:461–4.
- Laugerette F, Passilly-Degrace P, Patris B, Niot I, Febbraio M, Montmayeur JP, et al. CD36 involvement in orosensory detection of dietary lipids, spontaneous fat preference, and digestive secretions. *J Clin Invest* 2005;115:3177–84.
- Scalafani A, Ackroff K, Abumrad NA. CD36 gene deletion reduces fat preference and intake but not post-oral fat conditioning in mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2007;293:R1823–32.
- Gaillard D, Laugerette F, Darcel N, El-Yassimi A, Passilly-Degrace P, Hichami A, et al. The gustatory pathway is involved in CD36-mediated orosensory perception of long-chain fatty acids in the mouse. *FASEB J* 2008;22:1458–68.
- Abumrad NA, el-Maghrabi MR, Amri EZ, Lopez E, Grimaldi PA. Cloning of a rat adipocyte membrane protein implicated in binding or transport of long-chain fatty acids that is induced during preadipocyte differentiation. Homology with human CD36. *J Biol Chem* 1993;268:17665–8.
- Rac ME, Safranow K, Poncyljusz W. Molecular basis of human CD36 gene mutations. *Mol Med* 2007;13:288–96.
- Baruch DL, Ma XC, Pasloske B, Howard RJ, Miller LH. CD36 peptides that block cytoadherence define the CD36 binding region for *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *Blood* 1999;94:2121–7.
- Puente Navazo MD, Daviet L, Ninio E, McGregor JL. Identification on human CD36 of a domain (155–183) implicated in binding oxidized low-density lipoproteins (Ox-LDL). *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996;16:1033–9.
- Ohgami N, Nagai R, Ikemoto M, Arai H, Kuniyasu A, Horiuchi S, et al. Cd36, a member of the class B scavenger receptor family, as a receptor for advanced glycation end products. *J Biol Chem* 2001;276:3195–202.
- Navazo MD, Daviet L, Savill J, Ren Y, Leung LL, McGregor JL. Identification of a domain (155–183) on CD36 implicated in the phagocytosis of apoptotic neutrophils. *J Biol Chem* 1996;271:15381–5.
- Baillie AG, Coburn CT, Abumrad NA. Reversible binding of long-chain fatty acids to purified FAT, the adipose CD36 homologue. *J Membr Biol* 1996;153:75–81.
- Tao N, Wagner SJ, Lublin DM. CD36 is palmitoylated on both N- and C-terminal cytoplasmic tails. *J Biol Chem* 1996;271:22315–20.
- Smith J, Su X, El-Maghrabi R, Stahl PD, Abumrad NA. Opposite regulation of CD36 ubiquitination by fatty acids and insulin: effects on fatty acid uptake. *J Biol Chem* 2008;283:13578–85.
- Huang MM, Bolen JB, Barnwell JW, Shattil SJ, Brugge JS. Membrane glycoprotein IV (CD36) is physically associated with the Fyn, Lyn, and Yes protein-tyrosine kinases in human platelets. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:7844–8.
- Harmon CM, Abumrad NA. Binding of sulfoximinidyl fatty acids to adipocyte membrane proteins: isolation and amino-terminal sequence of an 88-kD protein implicated in transport of long-chain fatty acids. *J Membr Biol* 1993;133:43–9.
- Van Nieuwenhoven FA, Verstijnen CP, Abumrad NA, Willemsen PH, Van Eys GJ, Van der Vusse GJ, et al. Putative membrane fatty acid translocase and cytoplasmic fatty acid-binding protein are co-expressed in rat heart and skeletal muscles. *Biochem Biophys Res Commun* 1995;207:747–52.
- Poirier H, Degraze P, Niot I, Bernard A, Besnard P. Localization and regulation of the putative membrane fatty-acid transporter (FAT) in the small intestine. Comparison with fatty acid-binding proteins (FABP). *Eur J Biochem* 1996;238:368–73.
- Clezardin P, Frappart L, Clerget M, Pechoux C, Delmas PD. Expression of thrombospondin (TSP1) and its receptors (CD36 and CD51) in normal, hyperplastic, and neoplastic human breast. *Cancer Res* 1993;53:1421–30.
- Endemann G, Stanton LW, Madden KS, Bryant CM, White RT, Protter AA. CD36 is a receptor for oxidized low density lipoprotein. *J Biol Chem* 1993;268:11811–6.
- Savill J, Hogg N, Ren Y, Haslett C. Thrombospondin cooperates with CD36 and the vitronectin receptor in macrophage recognition of neutrophils undergoing apoptosis. *J Clin Invest* 1992;90:1513–22.
- Febbraio M, Hajjar DP, Silverstein RL. CD36: a class B scavenger receptor involved in angiogenesis, atherosclerosis, inflammation, and lipid metabolism. *J Clin Invest* 2001;108:785–91.
- Ryeom SW, Sparrow JR, Silverstein RL. CD36 participates in the phagocytosis of rod outer segments by retinal pigment epithelium. *J Cell Sci* 1996;109(Pt 2):387–95.
- Simons PJ, Kummer JA, Luiken JJ, Boon L. Apical CD36 immunolocalization in human and porcine taste buds from circumvallate and foliate papillae. *Acta Histochem* 2010.
- Le Foll C, Irani BG, Mignant C, Dunn-Meynell AA, Levin BE. Characteristics and mechanisms of hypothalamic neuronal fatty acid sensing. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2009;297:R655–64.
- Lisanti MP, Scherer PE, Vidugiriene J, Tang Z, Hermanowski-Vosatka A, Tu YH, et al. Characterization of caveolin-rich membrane domains isolated from an endothelial-rich source: implications for human disease. *J Cell Biol* 1994;126:111–26.
- Chang WJ, Ying YS, Rothberg KG, Hooper NM, Turner AJ, Gambliel HA, et al. Purification and characterization of smooth muscle cell caveolae. *J Cell Biol* 1994;126:127–38.
- Ring A, Le Lay S, Pohl J, Verkade P, Stremmel W. Caveolin-1 is required for fatty acid translocase (FAT/CD36) localization and function at the plasma membrane of mouse embryonic fibroblasts. *Biochim Biophys Acta* 2006;1761:416–23.
- Dorahy DJ, Lincz LF, Meldrum CJ, Burns GF. Biochemical isolation of a membrane microdomain from resting platelets highly enriched in the plasma membrane glycoprotein CD36. *Biochem J* 1996;319(Pt 1):67–72.
- Hoeb K, Georgel P, Rutschmann S, Du X, Mudd S, Crozat K, et al. CD36 is a sensor of diacylglycerides. *Nature* 2005;433:523–7.
- Benton R, Vannice KS, Voshall LB. An essential role for a CD36-related receptor in pheromone detection in *Drosophila*. *Nature* 2007;450:289–93.
- Silverstein RL, Febbraio M. CD36, a scavenger receptor involved in immunity, metabolism, angiogenesis, and behavior. *Sig Transl* 2009;2:re3.
- Asch AS, Barnwell J, Silverstein RL, Nachman RL. Isolation of the thrombospondin membrane receptor. *J Clin Invest* 1987;79:1054–61.
- Ghosh A, Li W, Febbraio M, Espinola RG, McCrae KR, Cockrell E, et al. Platelet CD36 mediates interactions with endothelial cell-derived microparticles and contributes to thrombosis in mice. *J Clin Invest* 2008;118:1934–43.
- Coburn CT, Knapp Jr FF, Febbraio M, Beets AL, Silverstein RL, Abumrad NA. Defective uptake and utilization of long chain fatty acids in muscle and adipose tissues of CD36 knockout mice. *J Biol Chem* 2000;275:32523–9.
- Hajri T, Hall AM, Jensen DR, Pietka TA, Drower VA, Tao H, et al. CD36-facilitated fatty acid uptake inhibits leptin production and signaling in adipose tissue. *Diabetes* 2007;56:1872–80.
- Savill J, Hogg N, Haslett C. Macrophage vitronectin receptor, CD36, and thrombospondin cooperate in recognition of neutrophils undergoing programmed cell death. *Chest* 1991;99:68–75.
- Coraci IS, Husemann J, Berman JW, Hulette C, Dufour JH, Campanella GK, et al. CD36, a class B scavenger receptor, is expressed on microglia in Alzheimer's disease brains and can mediate production of reactive oxygen species in response to beta-amyloid fibrils. *Am J Pathol* 2002;160:101–12.
- Oquendo P, Hundt E, Lawler J, Seed B. CD36 directly mediates cytoadherence of *Plasmodium falciparum* parasitized erythrocytes. *Cell* 1989;58:95–101.
- Tsuruta M, Kawada T, Fukuwatari T, Fushiki T. The orosensory recognition of long-chain fatty acids in rats. *Physiol Behav* 1999;66:285–8.
- Takeda M, Imaizumi M, Fushiki T. Preference for vegetable oils in the two-bottle choice test in mice. *Life Sci* 2000;67:197–204.
- Fukuwatari T, Shibata K, Iguchi K, Saeiki T, Iwata A, Tani K, et al. Role of gustation in the recognition of oleate and triolein in anosmic rats. *Physiol Behav* 2003;78:579–83.
- Kawai T, Fushiki T. Importance of lipolysis in oral cavity for orosensory detection of fat. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2003;285:R447–54.
- Gilbertson TA, Boughter Jr JD. Taste transduction: appetizing times in gustation. *NeuroReport* 2003;14:905–11.

- [48] Harmon CM, Luce P, Beth AH, Abumrad NA. Labeling of adipocyte membranes by sulfo-N-succinimidyl derivatives of long-chain fatty acids: inhibition of fatty acid transport. *J Membr Biol* 1991;121:261–8.
- [49] El-Yassimi A, Hichami A, Besnard P, Khan NA. Linoleic acid induces calcium signaling, Src kinase phosphorylation, and neurotransmitter release in mouse CD36-positive gustatory cells. *J Biol Chem* 2008;283:12949–59.
- [50] Matsumura S, Eguchi A, Mizushige T, Kitabayashi N, Tsuzuki S, Inoue K, et al. Colocalization of GPR120 with phospholipase-Cbeta2 and alpha-gustducin in the taste bud cells in mice. *Neurosci Lett* 2009;450:186–90.
- [51] Cartoni C, Yasumatsu K, Ohkuri T, Shigemura N, Yoshida R, Godinot N, et al. Taste preference for fatty acids is mediated by GPR40 and GPR120. *J Neurosci* 2010;30:8376–82.
- [52] Matsumura S, Mizushige T, Yoneda T, Iwanaga T, Tsuzuki S, Inoue K, et al. GPR expression in the rat taste bud relating to fatty acid sensing. *Biomed Res* 2007;28:49–55.
- [53] Hirasawa A, Tsumaya K, Awaji T, Katsuma S, Adachi T, Yamada M, et al. Free fatty acids regulate gut incretin glucagon-like peptide-1 secretion through GPR120. *Nat Med* 2005;11:90–4.
- [54] Tanaka T, Katsuma S, Adachi T, Koshimizu TA, Hirasawa A, Tsujimoto G. Free fatty acids induce cholecystokinin secretion through GPR120. *Naunyn Schmiedeberg Arch Pharmacol* 2008;377:523–7.
- [55] Chale-Rush A, Burgess JR, Mattes RD. Evidence for human orosensory (taste?) sensitivity to free fatty acids. *Chem Senses* 2007;32:423–31.
- [56] Stewart JE, Feinle-Bisset C, Golding M, Delahunty C, Clifton PM, Keast RS. Oral sensitivity to fatty acids, food consumption and BMI in human subjects. *Br J Nutr* 2010;104:145–52.
- [57] Morton GJ, Cummings DE, Baskin DG, Barsh GS, Schwartz MW. Central nervous system control of food intake and body weight. *Nature* 2006;443:289–95.
- [58] Migrenne S, Magnan C, Cruciani-Guglielmacci C. Fatty acid sensing and nervous control of energy homeostasis. *Diab Metab* 2007;33:177–82.
- [59] Wang R, Cruciani-Guglielmacci C, Migrenne S, Magnan C, Cotero VE, Routh VH. Effects of oleic acid on distinct populations of neurons in the hypothalamic arcuate nucleus are dependent on extracellular glucose levels. *J Neurophysiol* 2006;95:1491–8.
- [60] Lobo MV, Huerta L, Ruiz-Velasco N, Teixeira E, de la Cueva P, Celdran A, et al. Localization of the lipid receptors CD36 and CLA-1/SR-BI in the human gastrointestinal tract: towards the identification of receptors mediating the intestinal absorption of dietary lipids. *J Histochem Cytochem* 2001;49:1253–60.
- [61] Nassir F, Wilson B, Han X, Gross RW, Abumrad NA. CD36 is important for fatty acid and cholesterol uptake by the proximal but not distal intestine. *J Biol Chem* 2007;282:19493–501.
- [62] Drover VA, Ajmal M, Nassir F, Davidson NO, Nauli AM, Sahoo D, et al. CD36 deficiency impairs intestinal lipid secretion and clearance of chylomicrons from the blood. *J Clin Invest* 2005;115:1290–7.
- [63] Masuda D, Hirano K, Oku H, Sandoval JC, Kawase R, Yuasa-Kawase M, et al. Chylomicron remnants are increased in the postprandial state in CD36 deficiency. *J Lipid Res* 2009;50:999–1011.
- [64] Niot I, Poirier H, Tran TTT, Besnard P. Intestinal absorption of long-chain fatty acids: evidence and uncertainties. *Prog Lipid Res* 2009;48:101–15.
- [65] Miranda M, Sorkin A. Regulation of receptors and transporters by ubiquitination: new insights into surprisingly similar mechanisms. *Mol Interv* 2007;7:157–67.
- [66] Petit V, Arnould L, Martin P, Monnot MC, Pineau T, Besnard P, et al. Chronic high-fat diet affects intestinal fat absorption and postprandial triglyceride levels in the mouse. *J Lipid Res* 2007;48:278–87.
- [67] Nauli AM, Nassir F, Zheng S, Yang Q, Lo CM, Vonlehmden SB, et al. CD36 is important for chylomicron formation and secretion and may mediate cholesterol uptake in the proximal intestine. *Gastroenterology* 2006;131:1197–207.
- [68] Schwartz GJ, Fu J, Astarita G, Li X, Gaetani S, Campolongo P, et al. The lipid messenger OEA links dietary fat intake to satiety. *Cell Metab* 2008;8:281–8.
- [69] Jimenez-Dalmaroni MJ, Xiao N, Corper AL, Verdino P, Ainge GD, Larsen DS, et al. Soluble CD36 ectodomain binds negatively charged diacylglycerol ligands and acts as a co-receptor for TLR2. *PLoS ONE* 2009;4:e7411.
- [70] Patel HH, Murray F, Insel PA. G-protein-coupled receptor-signaling components in membrane raft and caveolae microdomains. *Handb Exp Pharmacol* 2008:167–84.
- [71] Andersen M, Lenhard B, Whatling C, Eriksson P, Odeberg J. Alternative promoter usage of the membrane glycoprotein CD36. *BMC Mol Biol* 2006;7:8–22.
- [72] Sato O, Takanashi N, Motojima K. Third promoter and differential regulation of mouse and human fatty acid translocase/CD36 genes. *Mol Cell Biochem* 2007;299:37–43.
- [73] Cheung L, Andersen M, Gustavsson C, Odeberg J, Fernandez-Perez L, Norstedt G, et al. Hormonal and nutritional regulation of alternative CD36 transcripts in rat liver—a role for growth hormone in alternative exon usage. *BMC Mol Biol* 2007;8:60.
- [74] Greenwalt DE, Lipsky RH, Ockenhouse CF, Ikeda H, Tandon NN, Jamieson GA. Membrane glycoprotein CD36: a review of its roles in adherence, signal transduction, and transfusion medicine. *Blood* 1992;80:1105–15.
- [75] Collot-Teixeira S, Martin J, McDermott-Roe C, Poston R, McGregor JL. CD36 and macrophages in atherosclerosis. *Cardiovasc Res* 2007;75:468–77.
- [76] Hajri T, Abumrad NA. Fatty acid transport across membranes: relevance to nutrition and metabolic pathology. *Annu Rev Nutr* 2002;22:383–415.

Détection oro-sensorielle des lipides alimentaires : Impacts sur le comportement alimentaire et la santé

Martin C., Chevrot M., Passilly-Degrace P., Besnard P.

Physiologie de la Nutrition, UMR INSERM U 866/Université de Bourgogne, AgroSup Dijon, 1, Esplanade Erasme, 21000 Dijon, France.

Correspondance : philippe.besnard@u-bourgogne.fr

Résumé

Pour la première fois de son histoire, une large partie de la population mondiale « ne court plus après les calories ». Cette opulence alimentaire donne libre cours à nos appétits spécifiques. C'est ainsi que, dans le régime occidental, les lipides alimentaires représentent près de 40% des apports caloriques journaliers alors que les recommandations nutritionnelles se situent à 30-35%. Cet apport excessif, 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 à l'augmentation de la prévalence de l'obésité et des pathologies associées (atteintes vasculaires, diabète de type II, hypertension, cancers). Cette attirance pour les corps gras n'est pas spécifique à l'Homme. Les rongeurs (rats, souris) présentent également une préférence spontanée pour les boissons et les aliments enrichis en lipides. Jusqu'à une période récente, on pensait que seules la texture et l'odeur des lipides étaient responsables de leur détection oro-sensorielle. Cette vision restrictive a été récemment battue en brèche par une série de travaux montrant que le choix de consommer préférentiellement des lipides comporte également une dimension gustative. Cette mini-revue se propose de faire le point des connaissances dans ce nouveau domaine d'investigation à la fois chez les rongeurs et chez l'Homme.

Mots clés : Lipides – Goût – Comportement alimentaire – Obésité.

Abstract: Oro-sensory detection of dietary lipids: impacts on feeding behavior and health

For the first time in its history, much of the world's population no longer has to "run after calories." An abundance of food has obvious consequences: it promotes our specific appetites. Lipids account for about 40% of the calories ingested in Western countries, whereas nutritional recommendations are in the range of 30-35%. This excessive lipid intake, associated with a qualitative imbalance (excess of saturated fatty acids and cholesterol, too high $\omega 6/\omega 3$ ratio) strongly favours the development of obesity and associated diseases (atherosclerosis, non insulin-dependent diabetes, hypertension, cancer). This attraction to fatty foods is not specific to humans. Rats and mice spontaneously prefer lipid-rich foods if provided with a free choice. Until recently, it was thought that oral lipid detection involved only textural and olfactory cues. This restrictive view has been challenged by recent observations suggesting that sense of taste is also involved in spontaneous fat preference underlying that the "fatty" taste might constitute a sixth gustatory modality. This mini-review highlights recent findings in this new field of investigations in both rodents and humans.

Keywords: Lipids – sense of taste – feeding behaviour – obesity.

Introduction

La composition chimique des aliments joue indéniablement un rôle important dans le choix alimentaire chez le mammifère. Elle est perçue grâce à l'intégration d'informations précoces d'origine olfactive, somesthésique (texture, température, piquant) et gustative déclenchées dès la mise en bouche de l'aliment et de signaux neuro-endocrines et métaboliques plus tardifs, car d'origine post-ingestive. L'ensemble de ces informations converge vers des zones spécifiques du système nerveux central pour y être intégré, suscitant ainsi des réponses comportementales stéréotypées (préférence, aversion, rassasiement, satiété). En bref, quand il en a l'opportunité, le mammifère choisit préférentiellement ses aliments en fonction de leurs caractéristiques physico-chimiques, hédoniques et nutritionnelles (palatabilité, digestibilité, composition en nutriments, efficacité métabolique, absence de toxiques). La perception des graisses n'échappe pas à cette complexité. C'est sans doute pourquoi, on a longtemps pensé que seules la texture et l'odeur des lipides étaient responsables de leur effet attractif. Des données récentes suggèrent que la gustation est également impliquée dans la préférence spontanée pour les lipides alimentaires.

1. Aperçu du système gustatif

La perception des saveurs (sucré, salé, amer, acide, umami - *goût induit par certains acides aminés comme le glutamate*) est assurée par trois sortes de papilles gustatives (Figure 1-A) : les papilles fongiformes, situées dans les 2/3 antérieures de la langue, contiennent un petit nombre de bourgeons du goût (Figure 1-B). Elles sont innervées par le nerf VII ou corde du tympan (Figure 1-C). Dans l'épithélium lingual postérieur, on trouve les papilles calciformes et foliées qui sont innervées par le nerf IX ou glossopharyngien (Figure 1-C). Les premières comportent un sillon circulaire dans lequel débouchent les pores de centaines de bourgeons du goût. L'Homme possède plusieurs papilles calciformes formant le « V » lingual alors que le rat et la souris n'en ont qu'une seule en position centrale (Figure 1-A). Les foliées ont, quant à elles, une localisation latérale. Les rares papilles gustatives présentes au niveau de l'œsophage supérieur sont connectées à des branches du pneumogastrique (nerf X). Les fibres de ces trois nerfs (VII, IX, X) rejoignent au niveau bulbaire le noyau du tractus solitaire (NTS) qui constitue le premier relais de la chaîne sensorielle gustative (Figure 1-C). Le NTS projette des fibres dans différentes parties du cerveau dont certaines sont impliquées dans le contrôle de la prise alimentaire comme l'hypothalamus. Il renvoie également des informations vers le tractus digestif *via* des fibres efférentes du nerf X (Figure 1-C).

2. Pour le rongeur, le « gras » est un saveur

Des études comportementales, indiquent que certains lipides pourraient être perçus comme des molécules sapides par les rongeurs de laboratoire. Le test du double choix (*Two-bottle preference test*) est une méthode classique permettant d'évaluer la préférence d'un animal pour une boisson donnée en mesurant sa consommation spontanée par rapport à une solution témoin présentée simultanément. Ce simple test montre clairement que les rats (Tsuruta *et al.*, 1999) et les souris (Takeda *et al.*, 2000) ont une forte attirance pour les lipides. Cependant, l'interprétation de cette observation reste complexe. En effet, le choix alimentaire résulte de l'intégration de stimuli oro-sensoriels précoces (odeur, texture, goût) et de signaux plus tardifs d'origine post-ingestive (libération de peptides régulateurs par le tractus digestif, le tissu adipeux, le foie et le cerveau). Il a donc fallu évaluer l'importance relative de chacun de ces paramètres régulateurs pour arriver à la conclusion que le « gras » peut être perçu comme un saveur. Tout d'abord, l'attirance pour les lipides est maintenue chez les rats et les souris rendus anosmiques (perte de l'odorat) par instillation nasale de sulfate de zinc ou intervention chirurgicale (section du bulbe olfactif), ce qui démontre que l'olfaction ne joue pas un rôle prépondérant dans ce choix (Takeda *et al.*, 2001; Fukuwatari *et al.*, 2003). De même, la préférence pour les lipides ne semble

pas être totalement imputable à leur palatabilité intrinsèque puisque les animaux préfèrent nettement l'huile végétale à un agent texturant comme la gomme de xanthane (Takeda *et al.*, 2000). Enfin, l'attrait pour des lipides est maintenu au cours de tests comportementaux réalisés sur des périodes extrêmement courtes (0,5 – 5 min) ce qui minimise l'impact des signaux post-ingestifs (Tsuruta *et al.*, 1999; Smith *et al.*, 2000; McCormack *et al.*, 2006). Le fait que l'exclusion simultanée des influences olfactives, texturales et post-ingestives demeure insuffisante pour supprimer totalement l'attrait pour les lipides suggère donc que la préférence spontanée pour les lipides comporte également une dimension gustative chez le rongeur (Takeda *et al.*, 2001; Fukuwatari *et al.*, 2003). En accord avec cette hypothèse, nous avons montré que la dénervation sélective des nerfs gustatifs (VII et/ou IX) s'accompagne d'une perte de la perception des lipides lors de tests à double choix (Gaillard *et al.*, 2008).

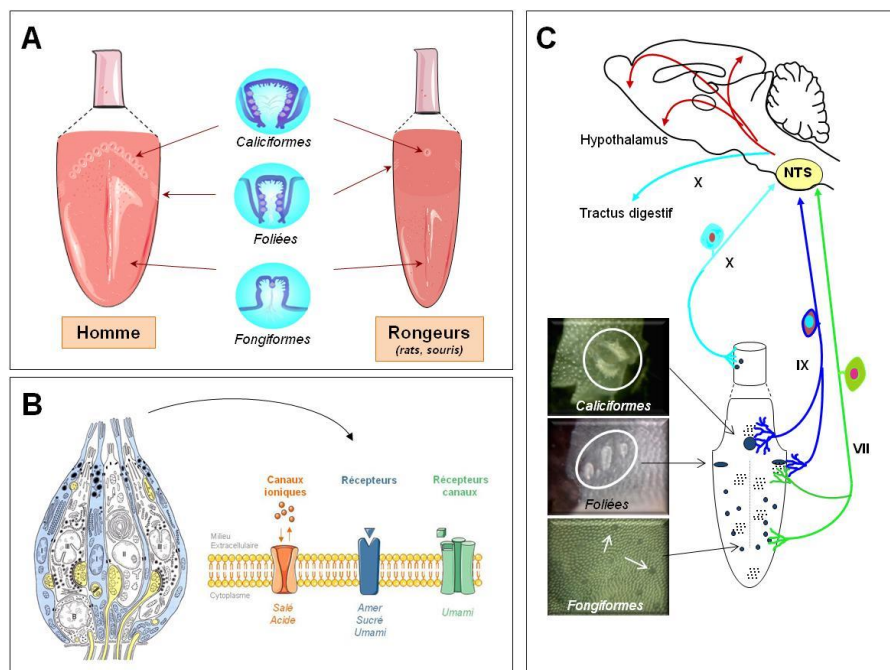


Figure 1 : Anatomie du système gustatif. A- Localisation des différentes papilles gustatives chez l'Homme et les rongeurs. Les différentes saveurs gustatives de bases (sucré, salé, amer, acide et umami) sont détectées au niveau des bourgeons du goût. B- Structure schématique d'un bourgeon du goût et les différents systèmes de détection des saveurs. C- Voies nerveuses impliquées dans la perception gustative. Nerfs VII = corde du tympan ; Nerfs IX = glosso-pharyngien ; Nerfs X = pneumo-gastrique (auss appelé nerf vague).

3. Acides gras ou triglycérides ?

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 al.*, 1999; Fukuwatari *et al.*, 2003). Cette sélectivité chimique est étroite puisque les AGLC

ne sont plus reconnus quand ils sont méthylés (Tsuruta *et al.*, 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 al.*, 2006) ou une souris (Gaillard *et al.*, 2008) 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 al.*, 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 and Fushiki, 2003).

4. 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 1-B). 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 and Boughter, 2003). Quel que soit le mécanisme incriminé, il aboutit au final à une variation de la concentration intracellulaire de calcium ionisé ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) ce qui provoque l'exocytose de neuromédiateurs à l'origine de l'activation des fibres nerveuses gustatives sous-jacentes (Gilbertson and 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.

4.1. Un 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 faibles (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 stimulus sensoriels (Gilbertson *et al.*, 1997). Il en résulte une dépolarisation transitoire de la cellule réceptrice gustative due à l'accumulation intracellulaire de charges positives (Gilbertson *et al.*, 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 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 al.*, 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 al.*, 2005). Des résultats comparables ont été obtenus avec d'autres substances sapes renforçant ainsi leur effet attractif ou aversif (Pittman *et al.*, 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 al.*, 2005), à l'instar de ce qui a été rapporté pour les cellules cardiaques (Honore *et al.*, 1994).

4.2. Des récepteurs 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 – Fig. 1-B). 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 al.*, 2005) et de la cholécystokinine (CCK) (Tanaka *et al.*, 2008), deux hormones impliquées notamment dans le contrôle de la prise alimentaire. Le GPR120 est aussi spécifiquement exprimé dans les cellules 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 al.*, 2010). On ignore actuellement quel est le mécanisme responsable de ce comportement. L'inactivation du gène codant pour le GPR40 s'accompagne également d'une chute de la préférence spontanée pour les lipides chez la souris (Cartoni *et al.*, 2010). Comme ce GPCR lie à la fois les acides gras à chaîne moyenne et à chaîne longue (Briscoe *et al.*, 2003), il a été proposé qu'il pourrait également jouer un rôle dans la perception oro-sensorielle des lipides alimentaires (Cartoni *et al.*, 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 al.*, 2007; Cartoni *et al.*, 2010).

4.3. La glycoprotéine multifonctionnelle CD36

La glycoprotéine CD36 est une molécule multifonctionnelle trouvée dans différents tissus dont l'épithélium lingual. Elle présente les caractéristiques structurales et fonctionnelles requises pour être un lipido-récepteur gustatif (Laugerette *et al.*, 2005). En effet, cette protéine membranaire, qui lie les AGLC avec une très haute affinité (de l'ordre du nanomolaire), a une structure de type récepteur avec une large poche hydrophobe extracellulaire flanquée de deux courts segments transmembranaires plongeant dans le cytoplasme (Rac *et al.*, 2007). Son extrémité C-terminale peut s'associer avec des Src kinases (Huang *et al.*, 1991) constituant ainsi un ensemble fonctionnel pouvant potentiellement permettre la transduction d'un signal lipidique. Dans l'épithélium lingual, l'expression du gène du CD36 est strictement restreinte aux bourgeons du goût chez le rat (Fukuwatari *et al.*, 1997), la souris (Laugerette *et al.*, 2005) et l'Homme (Simons *et al.*, 2010). Nous avons montré chez la souris que la protéine CD36 est

C. Martin *et al.*

principalement localisée au niveau de la partie apicale de certaines cellules sensorielles bordant le pore gustatif de la papille caliciforme (Laugerette *et al.*, 2005). Ce positionnement est particulièrement adéquat pour générer un signal gustatif.

D'un point de vue fonctionnel, le CD36 semble jouer un rôle important dans la préférence spontanée pour les lipides. En effet, les souris dont le gène codant pour le CD36 a été invalidé ne sont plus capables de faire la différence entre une solution enrichie en acide linoléique et une solution aqueuse contenant un agent texturant (Laugerette *et al.*, 2005). En revanche, leur attirance pour le sucré et leur aversion pour l'amer restent équivalentes aux souris de type sauvage (Laugerette *et al.*, 2005). En absence de CD36, le système gustatif semble donc fonctionner normalement sauf pour la détection des AGLC. Le CD36 lingual joue également un rôle régulateur dans la boucle céphalique de la digestion déclenchée par la présence de lipides au niveau oral. En effet, l'augmentation du flux pancréato-biliaire et du contenu en protéines du suc pancréatique secondaire au dépôt lingual d'acide linoléique observée chez les témoins n'existe plus chez les souris CD36^{-/-} (Laugerette *et al.*, 2005). La présence de CD36 au niveau lingual semble donc essentielle pour préparer l'organisme à digérer et absorber les graisses.

5. Les fonctions multiples du CD36 sont-elles compatibles avec le rôle de lipido-récepteur gustatif ?

Le CD36 est une protéine exprimée par de nombreux tissus où elle exerce de multiples fonctions. En effet, le CD36 facilite le transfert des AGLC dans le cardiomyocyte ou l'adipocyte, le captage des LDL oxydées par le macrophage, module l'agrégation plaquettaire grâce à son affinité pour la thrombospondine et le collagène, facilite la phagocytose par les macrophages de cellules apoptotiques et augmente la cyto-adhérence d'hématies modifiées car infectées par le *Plasmodium falciparum*, parasite responsable de la malaria (Febbraio *et al.*, 2001). Nos résultats indiquent que le CD36 peut exercer également le rôle de lipido-récepteur de type gustatif au niveau lingual (Laugerette *et al.*, 2005; Gaillard *et al.*, 2008). Cette dernière fonction peut paraître paradoxale compte tenu de l'expression tissulaire et des affinités de liaison étroites caractérisant les récepteurs gustatifs comme les T1R et T2R impliqués dans la perception du sucré, de l'*umami* et de l'amer (Sugita, 2006). Malgré cette plurifonctionnalité au niveau de l'organisme, le CD36 semble exercer des fonctions spécifiques au niveau d'un type cellulaire donné. Cette spécialisation cellulaire est probablement la résultante d'une part de la complexité inhabituelle du gène codant pour le CD36 et d'autre part des multiples modifications post-traductionnelles que subit la protéine. Plusieurs promoteurs alternatifs régulés de façon indépendante ont été identifiés chez l'Homme, la souris et le rat (Rac *et al.*, 2007; Sato *et al.*, 2007). Leur expression est tissu-spécifique de telle sorte que les promoteurs actifs du CD36 sont, par exemple, différents dans le foie et l'intestin. Cette caractéristique explique pourquoi la régulation de l'expression du gène du CD36 par les agonistes des *peroxisome proliferator-activated receptors* (PPARs) est différente dans ces tissus. Les modifications post-traductionnelles multiples qui peuvent affecter le CD36 (glycosylation, phosphorylation, acylation, palmitoylation) participent également à la spécialisation fonctionnelle tissulaire de cette protéine. En effet, la partie extracellulaire du CD36 possède différents sites de liaison distincts et fortement glycosylés correspondant à des ligands spécifiques (Rac *et al.*, 2007). Une glycosylation variable du CD36 en fonction des tissus (Greenwalt *et al.*, 1992) peut donc privilégier la sélection d'un ligand donné par la cellule déclenchant ainsi un effet physiologique spécifique. En bref, le CD36 semble capable d'exercer une fonction spécifique dans une cellule donnée comme, par exemple, la chimioréception des lipides alimentaires par les cellules gustatives. L'identification récente d'une protéine homologue au CD36 responsable de la détection olfactive d'une phéromone de nature lipidique chez la drosophile (Benton *et al.*, 2007) suggère que la fonction chimioréceptrice du CD36 proposée par nos travaux chez la souris pourrait être également partagée par d'autres espèces.

6. Mécanismes responsables de la transduction du signal lipidique médié par le CD36 lingual

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 and 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 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 al.*, 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 réceptrices 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 al.*, 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 al.*, 2008). En bref, les AGLC sont bien capables d'activer des cellules réceptrices gustatives *via* le CD36.

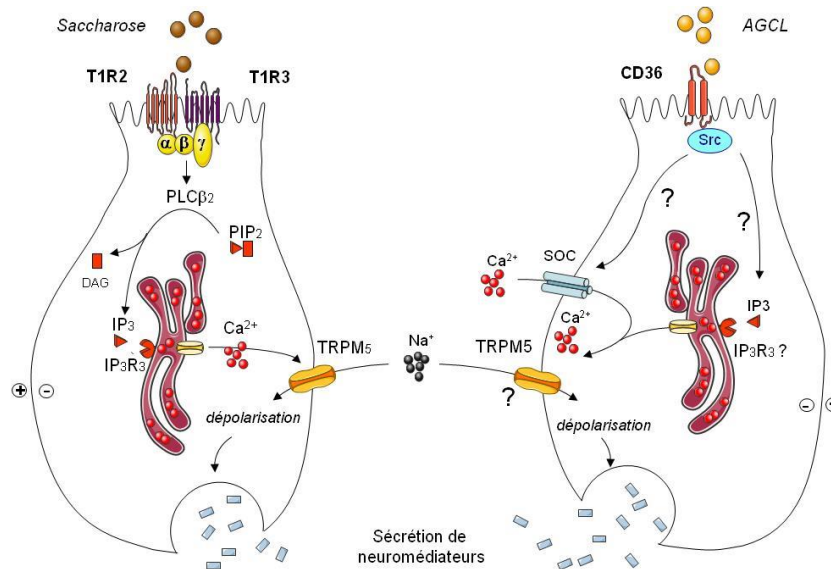


Figure 2 : Voies probables de transduction du signal lipidique dans la cellule réceptrice gustative chez la souris. L'interaction entre un acide gras à longue chaîne (AGLC) et le CD36 induit l'activation de protéines kinases de la famille des Src ce qui provoque l'ouverture des canaux calciques SOC (Store-Operated Calcium channels). Comme pour le saccharose, les AGLC semble être également capable 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 neurotransmetteurs à l'origine du signal gustatif probablement via une dépolarisation cellulaire dépendante des canaux TRPM5. Cette cascade d'événements rappelle celle à l'origine de la détection gustative du sucré.

Mais comment s'effectue la transduction CD36-dépendante du signal lipidique ? En collaboration avec l'équipe de Naïm Khan de l'Université de Bourgogne, nous avons trouvé que les AGLC en se liant au

C. Martin *et al.*

CD36 recrutent et activent les protéines Fyn et Yes de la famille des Src protéine-tyrosine kinases (Src-PTK) (El-Yassimi *et al.*, 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 al.*, 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 al.*, 2008). Il apparaît que ce changement est dû, entre autre, 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'événements, 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 al.*, 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 al.*, 1996). L'augmentation rapide et massive de la $[Ca^{2+}]_i$ qui résulte de ces événements déclencherait l'exocytose de neuromédiateurs vers les fibres gustatives afférentes probablement *via* une dépolarisation cellulaire dépendante des canaux TRPM5 (Figure 2). 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 2).

7. Le signal lipidique dépendant du CD36 lingual active le noyau du tractus solitaire

Nous avons vu que 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 al.*, 2008). Bien que des axones de la branche mandibulaire du nerf 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 al.*, 2008). Il est notable 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 al.*, 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 les sécrétions digestives (Figure 1-C).

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 3).

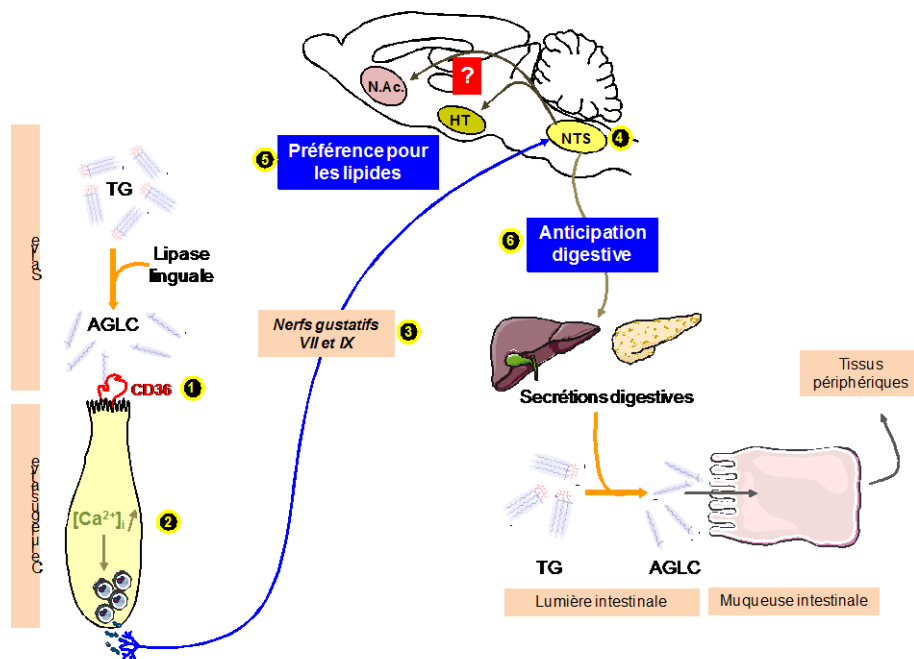


Figure 3 : Rôle du CD36 dans la perception gustative des lipides alimentaires chez la souris : modèle de travail. Le CD36 linguale se comporte comme un lipido-récepteur impliqué dans la détection des acides gras à longue chaîne (AGLC) issus de l'hydrolyse des triglycérides (TG) alimentaires par la lipase linguale. (1) La reconnaissance des AGLC par le CD36 est à l'origine d'une augmentation de la concentration intracellulaire de calcium ionisé ($[Ca^{2+}]_i$). (2) Ce changement déclenche la sécrétion de neurotransmetteurs 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 éfferentes 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).

8. 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), cette perception a été imputée à la gustation (Chale-Rush *et al.*, 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 al.*, 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 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 al.*, 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 al.*, 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 and Teff, 2006). Ce phénomène endocriné est rapide puisque l'effet maximal est atteint 4 minutes après la stimulation orale. Chez la souris, nous avons également observé un changement de la concentration plasmatique de différentes hormones dans les minutes qui suivent le dépôt oral d'acide linoléique (résultats non publiés). On ignore actuellement si ces changements sont dépendants du CD36.

Conclusions et perspectives

La perception orale des lipides alimentaires est clairement 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 probablement chez l'Homme. Ce sont les AGLC qui sont détectés par des molécules réceptrices spécialisées localisées au niveau des bourgeons du goût. Chez la souris, le CD36 et probablement certains 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. Cette fonction inédite pourrait constituer un avantage nutritionnel non négligeable en cas de restriction alimentaire chronique. En effet, les aliments riches en lipides sont connus pour avoir une forte densité énergétique et être les vecteurs des acides gras indispensables et des vitamines liposolubles (A, D, E, K) dont les rôles biologiques sont essentiels et multiples. En revanche, elle pourrait participer à la mise en place d'une surcharge pondérale en cas de pléthore alimentaire permanente.

En accord avec cette hypothèse, une relation entre le seuil de perception oro-sensorielle des AGLC, la préférence pour les aliments gras et l'indice de masse corporelle (IMC) a été récemment montré chez l'Homme. Les sujets les plus sensibles aux lipides consommeraient moins d'aliments gras et présenteraient un IMC plus faible (Stewart *et al.*, 2010). Ce résultat intéressant doit cependant être confirmé compte tenu du petit nombre de sujets inclus dans cette étude et de l'absence d'une comparaison entre sujets minces et obèses. De plus, on ignore actuellement si le seuil de sensibilité aux AGLC est dépendant du niveau d'expression des lipido-récepteurs exprimés au niveau de l'épithélium lingual gustatif.

De nombreuses questions restent donc encore en suspens. Quelles sont les fonctions respectives de CD36 et de la GPR120 au niveau lingual ? Existe-t-il d'autres lipido-récepteurs linguaux sensibles aux acides gras à chaîne moyenne et chaîne courte ? Outre l'intérêt fondamental de cette thématique (*existe-t-il une sixième modalité gustative ?*), les pistes potentielles d'applications industrielles sont multiples. Citons, par exemple, l'optimisation de la qualité organoleptique (palatabilité) d'aliments allégés en lipides ou la mise au point de leurres lipidiques. Il paraît également important d'établir s'il existe un lien entre la prévalence de certaines pathologies (obésité, insulino-résistance, etc...) et la perception orale des graisses alimentaires (*une perturbation de la détection oro-sensorielle des lipides peut-elle contribuer à la mise en place d'une obésité ?*). Si c'est le cas, la mise au point d'agonistes ou d'antagonistes pharmacologiques spécifiques des lipido-récepteurs linguaux pourrait s'avérer intéressante. Des travaux dans ce sens sont actuellement en cours.

Références bibliographiques

- Benton R., Vannice K.S., Vosshall L.B., 2007. An essential role for a CD36-related receptor in pheromone detection in *Drosophila*. *Nature* 450, 289-293.
- Bernhardt S.J., 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 (Pt 2), 325-336.
- Briscoe C.P., Tadayyon M., Andrews J.L., Benson W.G., Chambers J.K., Eilert M.M., Ellis C., Elshourbagy N.A., Goetz A.S., Minnick D.T., Murdock P.R., Sauls H.R., Jr., Shabon U., Spinage L.D., Strum J.C., Szekeres P.G., Tan K.B., Way J.M., Ignar D.M., Wilson S., Muir A.I., 2003. The Orphan G Protein-coupled Receptor GPR40 Is Activated by Medium and Long Chain Fatty Acids. *J. Biol. Chem.* 278, 11303-11311.
- 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 J.R., Mattes R.D., 2007. Evidence for human orosensory (taste?) sensitivity to free fatty acids. *Chem Senses* 32, 423-431.
- Chavez-Jauregui R.N., Mattes R.D., Parks E.J., 2010. Dynamics of Fat Absorption and Effect of Sham Feeding on Postprandial Lipema. *Gastroenterology*.
- Crystal S.R., Teff K.L., 2006. Tasting fat: cephalic phase hormonal responses and food intake in restrained and unrestrained eaters. *Physiol Behav* 89, 213-220.
- El-Yassimi A., Hichami A., Besnard P., Khan N.A., 2008. Linoleic acid induces calcium signaling, Src kinase phosphorylation, and neurotransmitter release in mouse CD36-positive gustatory cells. *J Biol Chem* 283, 12949-12959.
- Febbraio M., Hajjar D.P., Silverstein R.L., 2001. CD36: a class B scavenger receptor involved in angiogenesis, atherosclerosis, inflammation, and lipid metabolism. *J Clin Invest* 108, 785-791.
- 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, 461-464.
- 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, 579-583.
- Gaillard D., Laugette F., Darcel N., El-Yassimi A., Passilly-Degrace P., Hichami A., Khan N.A., Montmayeur J.P., Besnard P., 2008. The gustatory pathway is involved in CD36-mediated orosensory perception of long-chain fatty acids in the mouse. *FASEB J* 22, 1458-1468.
- Gilbertson T.A., Boughter J.D., Jr., 2003. Taste transduction: appetizing times in gustation. *Neuroreport* 14, 905-911.

C. Martin et al.

- Gilbertson T.A., Fontenot D.T., Liu L., Zhang H., Monroe W.T., 1997. Fatty acid modulation of K⁺ channels in taste receptor cells: gustatory cues for dietary fat. *Am J Physiol* 272, C1203-1210.
- Gilbertson T.A., Liu L., Kim I., Burks C.A., Hansen D.R., 2005. Fatty acid responses in taste cells from obesity-prone and -resistant rats. *Physiol Behav* 86, 681-690.
- Greenwalt D.E., Lipsky R.H., Ockenhouse C.F., Ikeda H., Tandon N.N., Jamieson G.A., 1992. Membrane glycoprotein CD36: a review of its roles in adherence, signal transduction, and transfusion medicine. *Blood* 80, 1105-1115.
- Harmon C.M., Luce P., Beth A.H., Abumrad N.A., 1991. Labeling of adipocyte membranes by sulfo-N-succinimidyl derivatives of long-chain fatty acids: inhibition of fatty acid transport. *J Membr Biol* 121, 261-268.
- Harrer M.I., Travers S.P., 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.
- 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.
- 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.
- Huang M.M., Bolen J.B., Barnwell J.W., Shattil S.J., Brugge J.S., 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.
- Kawai T., Fushiki T., 2003. Importance of lipolysis in oral cavity for orosensory detection of fat. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 285, R447-454.
- Laugerette F., Passilly-Degrace P., Patris B., Niot I., Febbraio M., Montmayeur J.P., Besnard P., 2005. CD36 involvement in orosensory detection of dietary lipids, spontaneous fat preference, and digestive secretions. *J Clin Invest* 115, 3177-3184.
- Liu L., Hansen D.R., Kim I., Gilbertson T.A., 2005. Expression and characterization of delayed rectifying K⁺ channels in anterior rat taste buds. *Am J Physiol Cell Physiol* 289, C868-880.
- 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 R.D., 1996. Oral fat exposure alters postprandial lipid metabolism in humans. *Am J Clin Nutr* 63, 911-917.
- Mattes R.D., 2001a. Oral exposure to butter, but not fat replacers elevates postprandial triacylglycerol concentration in humans. *J Nutr* 131, 1491-1496.
- Mattes R.D., 2001b. The taste of fat elevates postprandial triacylglycerol. *Physiol Behav* 74, 343-348.
- Mattes R.D., 2002. Oral fat exposure increases the first phase triacylglycerol concentration due to release of stored lipid in humans. *J Nutr* 132, 3656-3662.
- Mattes R.D., 2005. Fat taste and lipid metabolism in humans. *Physiol Behav* 86, 691-697.
- McCormack D.N., Clyburn V.L., Pittman D.W., 2006. Detection of free fatty acids following a conditioned taste aversion in rats. *Physiol Behav* 87, 582-594.
- Pittman D.W., Labban C.E., Anderson A.A., O'Connor H.E., 2006. Linoleic and oleic acids alter the licking responses to sweet, salt, sour, and bitter tastants in rats. *Chem Senses* 31, 835-843.
- Rac M.E., Safranow K., Poncyljusz W., 2007. Molecular Basis of Human CD36 Gene Mutations. *Mol Med* 13, 288-296.
- Sato O., Takanashi N., Motojima K., 2007. Third promoter and differential regulation of mouse and human fatty acid translocase/CD36 genes. *Mol Cell Biochem* 299, 37-43.
- Schiffman S.S., Graham B.G., Sattely-Miller E.A., Warwick Z.S., 1998. Orosensory perception of dietary fat. *Current directions in Psychological Science*, 137-143.

- Sclafani A., 2007. Fat and sugar flavor preference and acceptance in C57BL/6J and 129 mice: experience attenuates strain differences. *Physiol Behav* 90, 602-611.
- Simons P.J., Kummer J.A., Luiken J.J., Boon L., 2010. Apical CD36 immunolocalization in human and porcine taste buds from circumvallate and foliate papillae. *Acta Histochem*.
- Smith J.C., Fisher E.M., Maleszewski V., McClain B., 2000. Orosensory factors in the ingestion of corn oil/sucrose mixtures by the rat. *Physiol Behav* 69, 135-146.
- Stewart J.E., Feinle-Bisset C., Golding M., Delahunty C., Clifton P.M., Keast R.S., 2010. Oral sensitivity to fatty acids, food consumption and BMI in human subjects. *Br J Nutr* 104, 145-152.
- Sugita M., 2006. Taste perception and coding in the periphery. *Cell Mol Life Sci* 63, 2000-2015.
- Takeda M., Imaizumi M., Fushiki T., 2000. Preference for vegetable oils in the two-bottle choice test in mice. *Life Sci* 67, 197-204.
- Takeda M., Sawano S., Imaizumi M., Fushiki T., 2001. Preference for corn oil in olfactory-blocked mice in the conditioned place preference test and the two-bottle choice test. *Life Sci* 69, 847-854.
- Tanaka T., Katsuma S., Adachi T., Koshimizu T.A., Hirasawa A., Tsujimoto G., 2008. Free fatty acids induce cholecystokinin secretion through GPR120. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 377, 523-527.
- Tsuruta M., Kawada T., Fukuwatari T., Fushiki T., 1999. The orosensory recognition of long-chain fatty acids in rats. *Physiol Behav* 66, 285-288.

Le "goût du gras": quoi, comment, pourquoi?

Taste of fat: what, how, why?

Céline Martin, Michael Chevrot, Patricia Passilly-Degrace et Philippe Besnard*

Le concept du goût est très variable selon le public concerné. Dans le langage commun, la gustation est une sensation globale induite par la libération lors de la mastication de diverses molécules alimentaires agissant sur de multiples capteurs orosensoriels (gustatifs, olfactifs, mécanorécepteurs, thermorécepteurs, nocicepteurs). Pour le spécialiste, la gustation se réduit aux effets physiologiques induits par l'interaction entre une molécule alimentaire et une structure de reconnaissance spécifique (récepteur) localisée au niveau des bourgeons du goût des papilles gustatives. L'information sensorielle résultante, une fois transmise au cerveau par l'intermédiaire des nerfs gustatifs, se traduit par un comportement stéréotypé (consommation ou rejet). En accord avec cette définition, quatre modalités gustatives de base (le sucré, le salé, l'amer et l'acide) ont été initialement décrites auxquelles est venu s'ajouter plus récemment l'*umami* (du japonais "savoureux"), goût induit par certains acides aminés comme le glutamate (1). Les travaux actuels réalisés à la fois chez l'homme et chez les rongeurs (rats/souris) supportent l'idée qu'il existe une sixième modalité gustative dévolue à la perception de certains lipides, les acides gras à longue chaîne ([AGLC], nombre de carbones ≥ 16). Quels sont les arguments supportant cette hypothèse? Comment les lipides sont-ils détectés? Quelles sont les conséquences physiologiques, voire physiopathologiques, de la perception gustative des lipides alimentaires? Cette mini revue tentera d'apporter des réponses à ces différentes questions.

Perception gustative des lipides alimentaires : état des lieux

L'homme semble être spontanément attiré par les lipides. Par exemple, le nouveau-né montre plus de vigueur à téter un lait supplémenté en lipides qu'un lait à moindre teneur en graisses (2). De même, on constate que des rats ou des souris consommeront préférentiellement les sources lipidiques en cas de libre choix alimentaire. Cette attirance est suffisamment forte

- » Il existe une préférence spontanée pour les lipides chez l'homme et les rongeurs de laboratoire (rats, souris).
- » Avec la texture et l'olfaction, la gustation joue un rôle dans la préférence pour les aliments riches en lipides.
- » Des récepteurs aux lipides (CD36, GPR120) ont été identifiés au niveau des bourgeons du goût.
- » Ce sont les acides gras à longue chaîne ([AGLC], nombre de carbones ≥ 16) qui sont détectés par les lipidorécepteurs linguaux.
- » Le signal lipidique secondaire à l'activation du CD36 lingual par les AGLC emprunte les voies nerveuses gustatives périphériques et centrales chez la souris.
- » L'activation du CD36 lingual participe à la préférence spontanée pour les lipides et à la phase céphalique de la digestion chez la souris.
- » Le "goût du gras" semble constituer une sixième modalité gustative participant à la couverture des besoins énergétiques de l'organisme en sélectionnant et en favorisant l'absorption des nutriments lipidiques.

Mots-clés : Lipides – Gustation – Comportement alimentaire – Santé.

Keywords: Lipids – Sense of taste – Eating behavior – Health.

pour que des souris deviennent rapidement obèses quand on leur propose systématiquement de l'huile de maïs comme supplément optionnel à leur régime alimentaire habituel (3). Ce comportement complexe est la conséquence de l'intégration de signaux multiples d'origine orosensorielle, postingestive et postabsorptive. Pendant longtemps on a considéré que seules la texture et l'odeur des lipides étaient responsables de leur perception orosensorielle. Les travaux actuels indiquent que la gustation joue également un rôle non négligeable dans la préférence spontanée pour les lipides.

L'homme perçoit (goûte?) les AGLC

Utilisant une approche psychophysique, Richard Mattes et al. du département aliments et nutrition de

* Physiologie de la nutrition, UMR U866 Inserm/ université de Bourgogne, AgroSup Dijon, Dijon.

l'université de Purdue aux États-Unis se sont focalisés sur la dimension orale de la perception des lipides alimentaires. Au moyen de tests sensoriels triangulaires permettant de mettre en évidence la différence ou la similitude entre deux produits (trois échantillons sont présentés, dont deux sont identiques), ces chercheurs ont montré que des sujets adultes en bonne santé sont capables de percevoir de façon spécifique la présence d'AGLC dans une solution texturée mise en bouche. Le protocole utilisé minimisant les influences olfactives et somesthésiques (texture, piquant), cette perception a été imputée à la gustation (4). Bien que les lipides alimentaires soient très majoritairement composés de triglycérides, les AGLC semblent donc jouer un rôle prépondérant dans la perception orosensorielle des lipides alimentaires chez l'homme. Il est intéressant de noter que le seuil de détection des AGLC trouvés lors de ces expériences (0,028 % m/v, en moyenne) est très inférieur à la quantité d'acides gras libres présents dans les aliments riches en lipides (jusqu'à 0,5 %, m/m) largement consommés dans le régime occidental. Ce constat est crucial compte tenu de la faible activité de la lipase linguale chez l'homme.

Chez les primates, une partie des informations orosensorielles d'origine olfactive, somesthésique et gustative déclenchées lors de la mise en bouche d'un aliment convergent vers le cortex orbito-frontal (i.e. cortex gustatif secondaire). Cette convergence anatomique rend complexe l'établissement du rôle respectif de ces différents signaux dans la perception orosensorielle des lipides alimentaires. Des enregistrements individuels de neurones chez le macaque (5) et des données d'IRM fonctionnelle chez l'homme (6) indiquent cependant que certains neurones du cortex orbito-frontal répondent à une stimulation orale avec de l'huile indépendamment de sa viscosité, confortant l'idée que les graisses pourraient ne pas être uniquement perçues par leurs caractéristiques texturales. En accord avec cette hypothèse, des neurones répondant spécifiquement à des acides gras libres ont été trouvés à la fois au niveau du cortex gustatif primaire (insula) et secondaire (cortex orbito-frontal) chez le macaque (7). Dans ces expériences, le pH restant stable et neutre en présence de l'acide gras, l'hypothèse d'une activation neuronale induite par une augmentation de l'acidité buccale semble exclue. Il a également été observé qu'il n'existe quasiment pas de recouvrement fonctionnel entre les neurones activés par un dépôt oral de graisse et ceux activés par dépôt d'acides gras libres (7). L'ensemble de ces résultats suggère qu'il pourrait exister, parallèlement à la perception texturale des graisses, un autre système dévolu à la perception orosensorielle (gustative ?) des

acides gras chez les primates. Pour étayer cette hypothèse et explorer les mécanismes moléculaires mis en jeu, un nombre croissant de travaux sont réalisés chez le rongeur de laboratoire (rats et souris).

Pour le rat et la souris le "gras" est aussi un saveur

Des études comportementales, réalisées notamment par l'équipe de Tohru Fushiki de l'université de Kyoto au Japon, indiquent que les AGLC sont également perçus comme des molécules sapides par les rongeurs de laboratoire. Le test du double choix (*two-bottle preference test*) est une méthode comportementale classique qui permet d'évaluer la préférence d'un animal pour une boisson donnée en mesurant sa consommation spontanée par rapport à une solution témoin présentée simultanément. Ce simple test montre clairement que les rats (8) et les souris (9) ont une forte attirance pour les AGLC. Cependant, l'interprétation de cette observation reste complexe, puisque le choix alimentaire résulte de l'intégration de stimuli orosensoriels précoces (odeur, texture, goût) et de signaux plus tardifs d'origine postingestive et postabsorptive (libération de peptides régulateurs par le tractus digestif, le tissu adipeux, le foie et le cerveau). Il est notable que l'exclusion simultanée des influences olfactives, texturales et postingestives reste insuffisante pour supprimer totalement l'attrait pour les AGLC (10, 11). On peut donc penser que la préférence spontanée pour les lipides comporte également une dimension gustative chez le rongeur. La capacité à percevoir de façon sélective les AGLC a été récemment confirmée en utilisant la méthode de l'aversion gustative conditionnée qui consiste à rendre un animal aversif vis-à-vis d'une molécule donnée en associant sa consommation avec un malaise digestif provoqué par voie chimique. Non seulement on peut facilement rendre des rats (12) ou des souris (13) aversifs vis-à-vis d'un AGLC, comme l'acide linoléique, mais encore son seuil de perception est extrêmement faible, puisqu'il est de l'ordre du nanomolaire (12).

Comment les AGLC sont-ils détectés au niveau des papilles gustatives ?

La première étape de la perception gustative requiert l'interaction entre une molécule sapide et une protéine de reconnaissance spécifique (récepteur) localisée à l'apex des cellules chimioréceptrices des bourgeons du goût. En théorie, la perception gustative des lipides doit donc être générée par l'interaction d'un AGLC avec un lipidorécepteur spécifique porté par les papilles

Le "goût du gras": quoi, comment, pourquoi?

gustatives. Les travaux dans ce domaine ont permis de cibler au moins deux candidats plausibles: le récepteur GPR120 et la glycoprotéine CD36.

Le GPR120

Comme les récepteurs au sucré, à l'amer et à l'*umami*, le GPR120 fait partie de la famille des récepteurs couplés aux protéines G (GPCR). Ce récepteur, qui est abondamment exprimé au niveau de cellules entéro-endocrines localisées principalement dans la partie distale de l'intestin grêle (iléon) et le côlon chez la souris et l'homme, lie spécifiquement les AGLC provoquant la sécrétion d'incrétines impliquées dans le contrôle de la prise alimentaire comme le *glucagon-like peptide-1* (GLP-1) [14] et la cholécystokinine (CCK) [15]. Des études préliminaires montrent que la protéine GPR120 est aussi trouvée dans certaines cellules réceptrices gustatives des papilles caliciformes et fongiformes chez le rat [16] et la souris [17]. On ignore actuellement quel est le rôle du GPR120 au niveau des papilles gustatives. Compte tenu de ses affinités de liaison, une implication dans la perception orale des lipides alimentaires est plausible. Des études réalisées sur la lignée de cellules entéro-endocrines de souris STC-1 montrent que la liaison des acides gras sur le GPR120 entraîne une élévation de la concentration intracellulaire de calcium ionisé ($[Ca^{2+}]_i$) [14]. Ce résultat rappelle l'induction de la $[Ca^{2+}]_i$ induite par les molécules sapides dans les cellules réceptrices gustatives. Ce rapprochement est d'autant plus intéressant que les cellules STC-1 partagent avec les cellules gustatives certaines caractéristiques génétiques. Elles expriment, par exemple, les récepteurs au sucré T1R2 et T1R3. La manipulation de l'expression du gène codant pour le GPR120 chez la souris devrait permettre de vérifier son implication potentielle en tant que récepteur dans la perception gustative des lipides alimentaires.

La glycoprotéine CD36

Le CD36 est une glycoprotéine membranaire qui lie les AGLC avec une très haute affinité. Elle a une structure de type récepteur avec une large poche hydrophobe extracellulaire flanquée de deux courts segments transmembranaires plongeant dans le cytoplasme (figure 1A). Son extrémité C-terminale peut s'associer avec des Src kinases constituant ainsi un ensemble fonctionnel pouvant potentiellement permettre la transduction d'un signal lipidique (pour revue voir la référence 18). Dans l'épithélium lingual, l'expression du gène du CD36 est strictement restreinte à certaines cellules réceptrices des bourgeons du goût chez le rat et chez la souris. Dans cette dernière espèce, nous avons trouvé que la protéine CD36 est principalement localisée au niveau

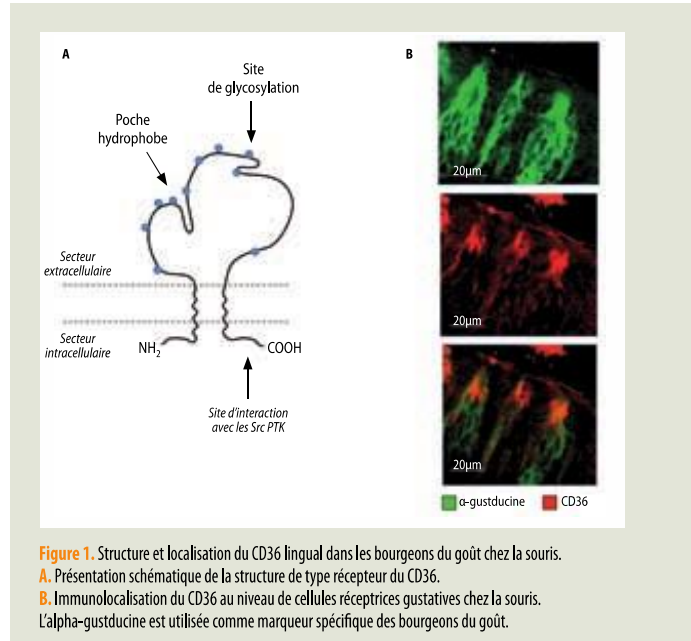


Figure 1. Structure et localisation du CD36 lingual dans les bourgeons du goût chez la souris.
A. Présentation schématique de la structure de type récepteur du CD36.
B. Immunolocalisation du CD36 au niveau de cellules réceptrices gustatives chez la souris. L'alpha-gustducine est utilisée comme marqueur spécifique des bourgeons du goût.

de la partie apicale de certaines cellules sensorielles bordant le pore gustatif de la papille caliciforme [19] (figure 1B). Ce positionnement est particulièrement adéquat pour générer un signal gustatif (figure 2A). En accord avec cette hypothèse, nous avons démontré en utilisant un test à double choix l'implication du CD36 lingual dans la préférence spontanée pour les lipides. En effet, les souris dont le gène codant pour le CD36 a été invalidé perdent la préférence pour la source de boisson contenant un AGLC [19]. En revanche, elles conservent leur appétence pour le sucré et leur aversion pour l'amer. En absence de CD36, le système gustatif semble donc fonctionner normalement sauf pour la détection des AGLC.

Le signal lipidique dépendant du CD36 lingual emprunte la voie gustative

La question cruciale à ce stade de l'investigation était de savoir si la perception orale CD36-dépendante des AGLC relevait réellement de la gustation. Quel que soit le mode de détection d'une molécule sapide, il aboutit au final à une variation de la $[Ca^{2+}]_i$. Pour explorer si le CD36 lingual assume cette fonction, nous avons

entrepris la purification des cellules CD36-positives par immunomagnétisme à partir de papilles caliciformes de souris (13). Utilisant ce modèle, on a pu montrer que les AGLC saturés ou non induisent de façon sélective, rapide et importante une élévation du $[Ca^{2+}]_i$ dans les cellules gustatives CD36-positives. Cet effet est strictement dépendant de cette protéine, 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) supprime totalement la réponse calcique induite par les AGLC (13). En bref, les AGLC sont bien capables d'activer des cellules réceptrices gustatives via le CD36 chez la souris (figure 2B). Cette variation de la $[Ca^{2+}]_i$ est la deuxième étape importante de la perception gustative, puisqu'elle est à l'origine de l'activation des voies nerveuses afférentes : la corde du tympan (CT) et le glossopharyngien (GL). La dénervation sélective de ces nerfs gustatifs a été utilisée pour déterminer leur implication dans le transfert d'un signal lipidique vers le cerveau. Chez le rat,

la section bilatérale de la corde du tympan (CTX) fait perdre aux animaux leur appétit spécifique pour les solutions enrichies en lipides (20). Chez la souris, l'absence totale de nerfs gustatifs fonctionnels (animaux CTX + GLX) provoque une perte de la reconnaissance pour la boisson contenant un AGLC (acide linoléique) lors des tests à double choix (13). En cohérence avec ce dernier résultat, on constate une perte de l'aversion vis-à-vis de l'acide linoléique chez les animaux préalablement conditionnés pour éviter cet AGLC (13). L'ensemble de ces résultats démontre le rôle joué par les nerfs gustatifs dans la perception des lipides alimentaires chez le rat et la souris (figure 2C).

Les fibres gustatives périphériques rejoignent au niveau bulbaire le noyau du tractus solitaire (NTS) qui constitue le premier relais nerveux de la chaîne sensorielle gustative. À ce titre, il était légitime de se demander si la perception orale des lipides pouvait affecter l'activité du NTS. Ce paramètre peut être étudié en regardant l'expression du facteur de transcription Fos. En effet, cette protéine, qui est le produit du gène *c-fos*, est un marqueur précoce de l'activité neuronale. Comme espéré, on a pu constater qu'un dépôt oral d'acide linoléique est suffisant pour entraîner une forte activation des parties rostrales et caudales du NTS, correspondant aux zones innervées par les nerfs gustatifs (13). Bien que des axones de la branche mandibulaire du nerf trigéminal, qui innerve la langue antérieure, se projettent dans le NTS dans les zones innervées par les nerfs gustatifs (21), une stimulation du NTS 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 neuronale au niveau du NTS (13). Il est notable que l'activation du NTS par le dépôt lingual d'acide linoléique est strictement dépendante de la présence du CD36 lingual. En effet, elle n'est plus reproduite chez des animaux $CD36^{-/-}$ (13). Ainsi, l'information déclenchée par l'interaction CD36-acide linoléique au niveau lingual transite par le NTS (figure 2D).

En bref, l'ensemble de ces résultats inédits démontre donc qu'il existe chez la souris, et probablement chez le rat, une perception gustative des lipides alimentaires impliquant le CD36 lingual.

Conséquences physiologiques

Il est connu que les informations issues du NTS peuvent affecter l'activité de centres nerveux connus pour être impliqués dans le comportement alimen-

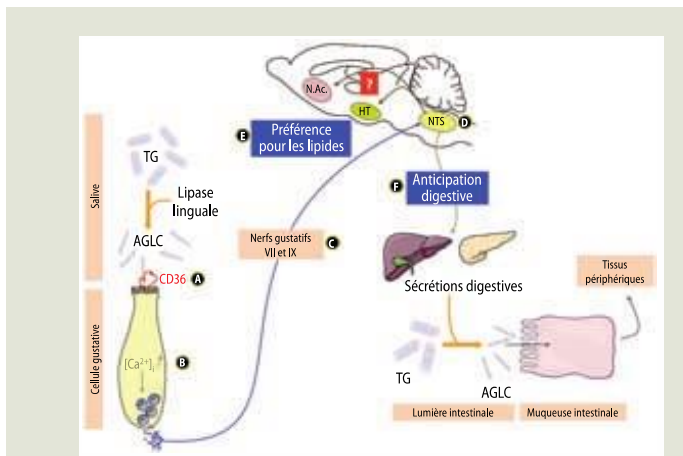


Figure 2. Perception gustative des lipides alimentaires chez la souris : rôle du CD36 lingual. Chez la souris, la protéine CD36 se présente comme le récepteur aux lipides impliqué dans la détection des acides gras à longue chaîne (AGLC) issus de l'hydrolyse des triglycérides (TG) alimentaires par la lipase linguale. La reconnaissance des AGLC par le CD36 (A) induit une augmentation de la concentration intracellulaire en calcium ($[Ca^{2+}]_i$) (B), phénomène connu pour déclencher la sécrétion de neuromédiateurs au pôle basolatéral des cellules gustatives. L'information est ensuite transmise par les nerfs gustatifs (corde du tympan, nerf VII et glossopharyngien, nerf IX) (C) au cerveau, puis transite par les zones gustatives du noyau du tractus solitaire (NTS) (D). Les projections efférentes centrales vers des zones impliquées dans le comportement alimentaire (hypothalamus [HT]; noyau accumbens [N.Ac.]) et périphériques vers le tractus digestif peuvent expliquer respectivement la préférence vis-à-vis des lipides (E) et l'induction des sécrétions digestives (F) observées chez la souris.



Le "goût du gras": quoi, comment, pourquoi?

taire (hypothalamus, noyau accumbens) [figure 2E] et réguler les sécrétions digestives (figure 2F). Ces caractéristiques fonctionnelles pourraient expliquer pourquoi on observe chez les souris CD36^{-/-} une perte de la préférence spontanée pour les lipides (19, 22) et une absence de la phase céphalique de la digestion induite chez les souris CD36^{+/+} par le dépôt oral d'AGLC (19). En bref, ces résultats inédits indiquent que le CD36 lingual joue un rôle prépondérant dans la perception orale et le devenir des lipides alimentaires au niveau de l'organisme chez la souris.

Chez l'homme, l'exposition orale à des lipides s'accompagne également d'effets physiologiques notables indépendamment de toute ingestion. Chez des volontaires sains et à jeun la présence de lipides en bouche affecte la triglycéridémie. En effet, à la suite d'une prise de lipides encapsulés (pour éviter tout contact oral et mimer une charge lipidique postprandiale), on constate une augmentation plus soutenue de la triglycéridémie chez les sujets ayant reçu un repas fictif (car non ingéré) contenant des corps gras que chez les témoins recevant le même repas dépourvu de lipides. Ce changement est indépendant de la texture de matrice alimentaire utilisée et de toute perception olfactive (pour une revue voir la référence 23). Il serait, selon les auteurs de ces travaux, la conséquence du relargage intestinal de lipides résiduels issus de repas précédents (24). Le mécanisme à l'origine de ces changements est actuellement inconnu. On ignore notamment s'il est dépendant ou non des lipidorécepteurs linguaux. Il a été également rapporté que l'ajout de lipides dans un aliment test mastiqué lors de repas fictifs induit une augmentation de la concentration plasmatique du peptide pancréatique, plus importante que celle trouvée avec l'aliment alipidique témoin (25). Cet effet endocrine est rapide puisqu'il est de 4 minutes, au maximum, après la stimulation orale. De plus amples explorations devraient permettre dans un avenir proche de comprendre les mécanismes intrinsèques à ce système de perception.

Conclusion et perspectives

La perception orosensorielle des lipides alimentaires est clairement multiparamétrique. Les travaux actuels indiquent qu'il existe, parallèlement à la texture et à l'olfaction, une dimension gustative à ce phénomène. Chez la souris, nos travaux montrent que le CD36 lingual se comporte comme un lipidorécepteur gustatif participant à la couverture des besoins énergétiques de l'organisme en sélectionnant et en favorisant l'absorption des nutriments lipidiques. Cette fonction inédite pourrait constituer un avantage nutritionnel non négligeable dans un contexte de précarité alimentaire. En effet, les aliments riches en lipides sont connus pour avoir une forte densité énergétique et être les vecteurs des acides gras indispensables (acides linoléique et linoléique) et des vitamines liposolubles (A, D, E, K) dont les rôles biologiques sont essentiels et multiples. En revanche, elle pourrait participer à la mise en place d'une surcharge pondérale, voire d'une obésité, en cas de pléthore permanente.

Bien que l'homme soit aussi capable de percevoir la présence d'AGLC dans une matrice alimentaire complexe, on ignore actuellement si ce phénomène relève de la perception gustative. Une telle perspective permettrait pourtant d'éclairer d'un jour nouveau certains résultats. Par exemple, le fait que certains sujets obèses aient une préférence accrue pour les aliments gras comparativement à des sujets minces pourrait être la conséquence d'une perception gustative inappropriée des lipides alimentaires (26). En accord avec cette hypothèse, des travaux récents suggèrent qu'il existe une relation entre le seuil de perception orosensoriel des AGLC, la préférence pour les aliments gras et l'indice de masse corporelle (IMC). Les sujets qui perçoivent le plus difficilement les lipides seraient ceux qui en consomment plus et présenteraient un IMC plus élevé (27). Il faut cependant confirmer ce résultat compte tenu des limites de cette étude liées au petit nombre de sujets inclus et l'absence d'une étude comparative entre sujets minces et obèses. S'il s'avère exact, les retombées technologiques et économiques pourraient être importantes tant dans le domaine de l'agroalimentaire que pharmaceutique. ■

Récepteurs aux goûts
et préférences alimentaires

RÉFÉRENCES

1. Beauchamp GK. Sensory and receptor responses to umami: an overview of pioneering work. *AM J Clin Nutr* 2009;63:723-7.
2. Nysenbaum AN, Smart JL. Suckling behaviour and milk intake of neonates in relation to milk fat content. *Early Hum Develop* 1982;6:205-13.
3. Takeda M, Imazumi M, Sawano S et al. Long-term optional ingestion of corn oil induces excessive caloric intake and obesity in mice. *Nutrition* 2001;17:117-20.
4. Chalé-Rush A, Burgess JR, Mattes RD. Evidence for human orosensory (taste?) sensitivity to free fatty acids. *Chem Senses* 2007;32:423-31.
5. Verhagen JV, Rolls ET, Kadohisa M. Neurons in the primate orbitofrontal cortex respond to fat texture independently of viscosity. *J Neurophysiol* 2003;90:1514-25.
6. De Araujo IE, Rolls ET. Representation in the human brain of food texture and oral fat. *J Neurosci* 2004;24:3086-93.
7. Kadohisa M, Rolls ET, Verhagen JV. Neuronal representations of stimuli in the mouth: the primate insular taste cortex, orbitofrontal cortex and amygdala. *Chem Senses* 2005;30:401-19.
8. Tsuruta M, Kawada T, Fukuwatari T et al. The orosensory recognition of long-chain fatty acids in rats. *Physiol Behav* 1999;66:285-8.
9. Takeda M, Imazumi M, Fushiki T. Preference for vegetable oils in the two-bottle choice test in mice. *Life Sci* 2000;67:197-204.
10. Takeda M, Sawano S, Imazumi M et al. Preference for corn oil in olfactory-blocked mice in the conditioned place preference test and the two-bottle choice test. *Life Sci* 2001;69:847-54.
11. Fukuwatari T, Shibata K, Iguchi K et al. Role of gustation in the recognition of oleate and triolein in anosmic rats. *Physiol Behav* 2003;78:579-83.
12. Mc Cormack DN, Clyburn VL, Pittman DW. Detection of free fatty acids following a conditioned taste aversion in rats. *Physiol Behav* 2006;87:582-94.
13. Gaillard D, Laugerette F, Darcel N et al. The gustatory pathway is involved in CD36-mediated orosensory perception of long-chain fatty acids in the mouse. *Faseb J* 2008;22:1458-68.
14. Hirasawa A, Tsumaya K, Awaji T et al. Free fatty acids regulate gut incretin glucagon-like peptide-1 secretion through GPR120. *Nature Med* 2005;11:90-4.
15. Tanaka T, Katsuma S, Adachi T et al. Free fatty acids induce cholecystokinin secretion through GPR120. *Naunyn-Schmiedeberg Arch Pharmacol* 2008;377:523-7.
16. Matsumura S, Mizushige T, Yoneda T et al. GPR expression in the rat taste bud relating to fatty acid sensing. *Biomed Res* 2007;28:49-55.
17. Matsumura S, Eguchi A, Mizushige T et al. Colocalization of GPR120 with phospholipase-Cbeta2 and alpha-gustducin in the taste bud cells in mice. *Neurosci Lett* 2009;450:186-90.
18. Rac ME, Safranow K, Pencyljusz W. Molecular Basis of Human CD36 Gene Mutations. *Mol Med* 2007;13:288-96.
19. Laugerette F, Passilly-Degrace P, Patris B et al. CD36 involvement in orosensory detection of dietary lipids, spontaneous fat preference, and digestive secretions. *J Clin Invest* 2005;115:3177-84.
20. Pittman D, Crawley ME, Corbin CH et al. Chorda tympani nerve transection impairs the gustatory detection of free fatty acids in male and female rats. *Brain Res* 2007;1151:74-83.
21. Hamilton RB, Norgren R. Central projections of gustatory nerves in the rat. *J Comp Neurol* 1984;222:560-77.
22. Sclafani A, Ackroff K, Abumrad NA. CD36 gene deletion reduces fat preference and intake but not post-oral fat conditioning in mice. *Am J Physiol* 2007;293:R1823-32.
23. Mattes RD. Fat taste and lipid metabolism in humans. *Physiol Behav* 2005;86:691-7.
24. Mattes RD. Oral fat exposure increases the first phase triacylglycerol concentration due to release of stored lipid in humans. *J Nutr* 2002;132:3656-62.
25. Crystal SR, Teff KL. Tasting fat: cephalic phase hormonal responses and food intake in restrained and unrestrained eaters. *Physiol Behav* 2006;89:213-20.
26. Bartoshuk LM, Duffy VB, Hayes JE et al. Psychophysics of sweet and fat perception in obesity: problems, solutions and new perspectives. *Phil Trans R Soc B* 2006;361:1137-48.
27. Stewart JE, Feinle-Bisset C, Golding M et al. Oral sensitivity to fatty acids, food consumption and BMI in human subjects. *Br J Nutr* 2010;3:1-8. [Epub ahead of print].

Abonnez-vous
aux **Correspondances en Métabolismes
Hormones Diabète et Nutrition**



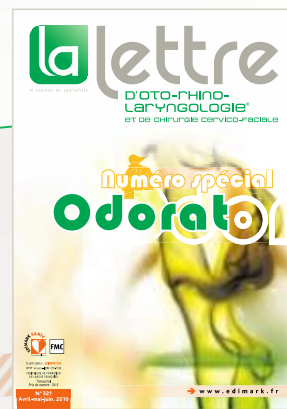
Abonnement en ligne

→ www.edimark.fr

ou par téléphone (service abonnement):
01 46 67 62 87



Découvrez sur notre site
plus de **20 revues**
dont **La Lettre d'ORL**



Review**Fat and taste perception**

Philippe Besnard*, Dany Gaillard, Patricia Passilly-Degrace, Céline Martin and Michael Chevrot

Address: Physiologie de la Nutrition, UMR INSERM U886/Université de Bourgogne, AgroSup Dijon, 1, Esplanade erasme, F-21000 Dijon, France.***Correspondence:** Philippe Besnard. Tel/Fax. [+33] (0)380 396 691. Email: pbesnard@u-bourgogne.fr**Received:** 14 September 2009**Accepted:** 15 January 2010

doi: 10.1079/PAVSNR20105032

The electronic version of this article is the definitive one. It is located here: <http://www.cabi.org/cabreviews>

© CAB International 2010 (Online ISSN 1749-8848)

Abstract

An obesity epidemic is spreading rapidly across the world, especially in children. It constitutes a major risk in serious diet-related chronic diseases, thus decreasing life expectancy. The origin of the obesity epidemic is clearly dependent on multiple parameters. Increased consumption of more energy-dense, nutrient-poor foods might be a contributory factor to the epidemic. Behavioural experiments in rats and mice show that both have a spontaneous preference for fatty foods. This lipid attraction is so strong that a mouse with free access to a source of oil in addition to standard laboratory chow becomes rapidly obese. In humans, studies also report that obese subjects have a greater preference than lean subjects for lipids. This last observation suggests that an inappropriate lipid perception might influence obesity risk by impacting feeding behaviour. Why we like fatty foods is not yet fully understood. Recent data demonstrate that low quantities of long-chain fatty acids can be specifically detected in the oral cavity by humans and laboratory rodents. Interestingly, lipid sensors have been found in rodent taste buds, suggesting that gustation can also play a role in the orosensory perception of lipids in combination with textural and olfactory cues. The sense of taste informs the organism about the quality of ingested food. It encompasses five sub-modalities: allowing the perception of sweet, salt, sour, bitter and umami stimuli. The discovery of lipid sensors raises the possibility for a sixth taste modality ('fatty') directed to dietary fat detection. This mini-review highlights recent findings in this new field of investigation in both rodents and humans.

Keywords: Dietary lipids, Lipid sensors, CD36, GPR120, Taste buds, Gustation, Fatty taste, Feeding behaviour, Obesity**Introduction**

In recent years, obesity has reached epidemic proportions across the world, with more than 1 billion adults overweight and at least 300 million of them clinically obese (body mass index ≥ 30). This phenomenon affects both adults and children [1]. Recent data suggest that the increase in prevalence of obesity is associated with a decrease in life expectancy in children [2]. Indeed, overweight and obesity constitute a major risk for serious diet-related chronic diseases, including type 2 diabetes, cardiovascular diseases, hypertension and certain forms of cancer. Genes are known to play an important role in the susceptibility to weight gain. Nevertheless, the profound changes in our way of life over recent decades, which

have led to a progressive decline in the physical activity associated with an overconsumption of diets high in energy, mainly explain this phenomenon.

An abundance of food has obvious consequences: it promotes our specific appetites. Lipids account for about 40% of the calories ingested in Western countries, whereas nutritional recommendations are 5–10% lower. The mechanism responsible for this fat preference is a complex phenomenon that is not fully understood. It results from integration of multiple signals triggered by the chemoreception of lipids along the digestive tract (oral cavity, stomach and intestine) and by post-absorptive lipid-sensing by various organs including adipose tissue, liver and brain. In this system, detection of lipids in the oral cavity appears to be essential for determining the

2 Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources

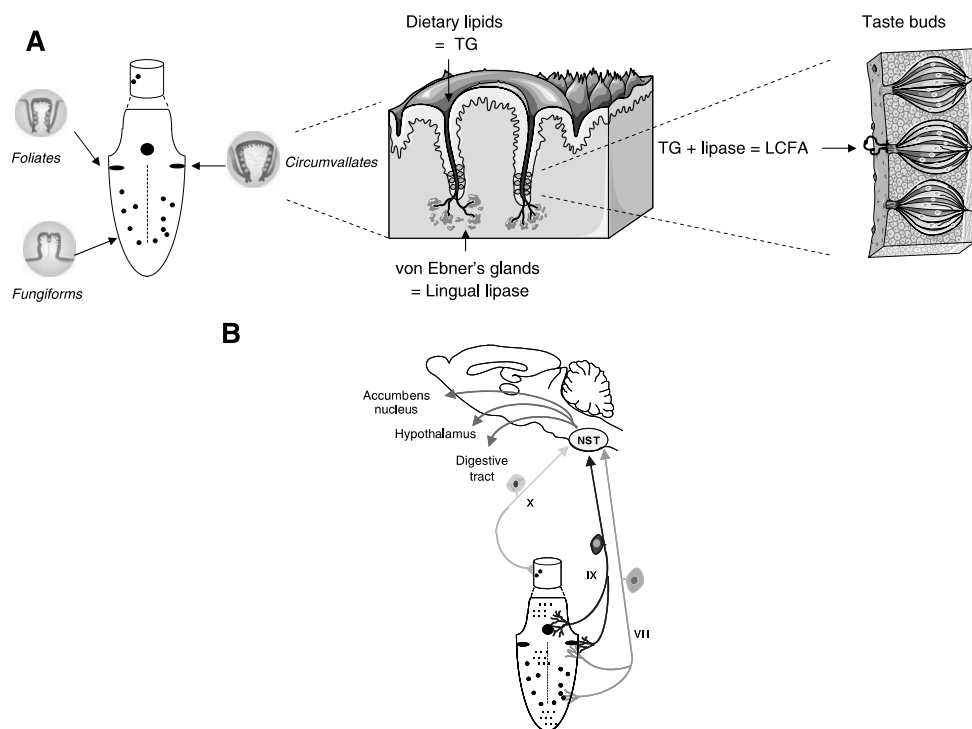


Figure 1 Anatomy and physiology of the gustatory system. (a) Localization of gustatory papillae in the mouse tongue and specific anatomic features of circumvallate papillae. (b) Main nervous circuitry involved in the sense of taste

choice to consume fat-rich foods preferentially. Orosensory perception of lipids was long thought to involve only textural and olfactory cues. Recent findings challenge this limited viewpoint, strongly suggesting that the sense of taste also plays a significant role in dietary lipid perception and might therefore be involved in the preference for fatty foods and, hence, might contribute to lipid-induced chronic diseases. This minireview analyses recent data relating to the molecular mechanisms and physiological consequences of orosensory lipid perception.

There is a Spontaneous Preference for Lipids

Compelling evidence strongly suggests that laboratory rodents have an orosensory system devoted to lipid detection. The two-bottle preference test is a classical method for studying the feeding behaviour of animals in a free-choice situation. This simple paradigm shows clearly that rats [3] and mice [4] display a strong preference for lipid-rich solutions. Although dietary lipids are mainly composed of triglycerides (TG), long-chain fatty acids (LCFA; number of carbons is >16) seem to be responsible

for oral lipid perception. In a free-choice situation, rats have a weaker preference for TG and medium-chain fatty acids (number of carbons ranges from 8 to 14) than for LCFA [3, 5]. This chemical selectivity is very tight, as LCFA derivatives, such as methyl-LCFA, are not recognized [3]. The ability of rodents to detect LCFA specifically has also been confirmed with the conditioned taste aversion (CTA) paradigm in which a naive animal learns to avoid a newly encountered tastant after suffering adverse post-ingestive effects triggered by an intraperitoneal injection of LiCl. Both rats and mice can be conditioned to avoid specific LCFA [6, 7], with a submicromolar detection threshold [6, 8]. Lingual lipase, which is responsible for an efficient release of LCFA from TG in rodents, seems to play a significant role in oral fat perception. Indeed, its pharmacological inhibition leads to a dramatic decrease in lipid preference in the mouse [9]. This may explain why mineral oil, which is not digestible, is not as attractive as vegetable oil in a free-choice situation [9]. Interestingly, lingual lipase is known to be released directly into the clefts of foliate and circumvallate papillae by von Ebner's glands in rodents (Figure 1a). This anatomical feature appears to be ideal for the efficient

hydrolysis of TG and generates high LCFA levels close to the taste buds, facilitating their subsequent detection by the taste receptor cells (TRC).

Far fewer studies have been carried out on humans, but psychophysical studies carried out by Richard Mattes and co-workers strongly suggest that taste plays a role in fat perception in humans [10]. Healthy adult subjects can specifically detect the presence of saturated and unsaturated LCFA in the oral cavity. The detection threshold for LCFA is much lower (0.028%, w/v, on average) [11] than that for TG (5.6 and 17.3%, w/v, on average, in young and old subjects, respectively) [12]. Lipid-rich foods may contain up to 0.5% free fatty acids [10], so TG hydrolysis by lingual lipase does not seem to be required for orosensory fat detection. This point is important, given continuing debate concerning whether humans have an efficient lingual lipase [13, 14].

Why Might We Think that Sense of Taste Plays a Role in the Fat Preference?

However, the interpretation of these observations remains complex because the spontaneous food attraction is known to result from the integration of olfactory, somesthetic, gustatory and post-ingestive signals. Thus, to explore whether gustation plays a role in fat preference, the relative importance of each of these parameters for the spontaneous lipid attraction has been systematically explored in rodents. Firstly, spontaneous fat attraction is maintained in anosmic rats and mice, in which olfaction is blocked by chemical or surgical (i.e. section of olfactory nerve) means, demonstrating that smell does not play a significant role in this behaviour [5, 15, 16]. Secondly, the two-bottle preference test clearly reveals that mice prefer vegetable oils to texturing agents, such as xanthan gum or mineral oil, suggesting that texture is not a major cue in orosensory fat perception [4]. Thirdly, fat preference is not abolished in very-short-term experiments (0.5–5 min) designed to minimize post-ingestive effects [3, 6, 17]. The persistence of an attraction for lipids in rats and mice in which textural, olfactory and post-ingestive cues have been simultaneously minimized strongly suggests that the sense of taste plays a significant role in the spontaneous fat preference in rodents [5, 15].

In humans, the fact that the orosensory perception of LCFA is conserved in subjects in which olfactory and somatosensory (post-ingestive) cues are minimized also suggests the involvement of gustation in this phenomenon [11].

Anatomy and Physiology of the Gustatory System

The sense of taste is ensured by TRC, which are clustered in specialized onion-shaped structures: the taste buds. They are found at high density on the tongue and at low

density in the soft palate, larynx, pharynx and the upper part of the oesophagus. In the lingual epithelium, taste buds are located in three types of gustatory papillae with different spatial distributions (Figure 1a). Most are the fungiform papillae, which cover the front two-thirds of the tongue. These papillae are mushroom-shaped and have a small number (1–3) of taste buds on their apical surface. The circumvallate and foliate papillae are located on the central and lateral regions, respectively, of the posterior third of the tongue. The circumvallate papillae consist of a circular depression, the walls of which contain a few hundred taste buds. Humans have about ten circumvallate papillae, whereas rodents have only one, in a central position. Foliate papillae are located at the posterior lateral edge of the tongue and contain hundreds of taste buds. Chemosensitive proteins (ion channels, metabotropic and ionotropic receptors) located on the apical side of the TRC are responsible for taste reception. Interactions between a tastant and its specific detection system lead to changes in intracellular free calcium concentration ($[Ca^{2+}]_i$), resulting in depolarization of TRC. This change leads to neurotransmitter release, which generates, in turn, the firing of gustatory afferent nerve fibres [18, 19]. TRC from fungiform papillae and some of the anterior foliate papillae establish synaptic contacts with the chorda tympani nerve (i.e. VII pair of cranial nerves), whereas the posterior parts of the foliate and circumvallate papillae are innervated by the glossopharyngeal nerve (i.e. IX pairs of cranial nerves). Vagus fibres from the X pairs of cranial nerves innervate taste buds found outside of the oral cavity. Afferent fibres carry taste information from the tongue to the brain via the nucleus of the solitary tract (NST) in the brainstem, which constitutes the first synaptic relay in the nervous gustatory pathway. NST is connected to different brain areas involved in the feeding behaviour, reward and memorization, as well as to the digestive tract through efferent fibres of vagus nerves. This last circuitry is responsible for the cephalic phase of digestion induced by taste sensory input and leading to early digestive secretions, preparing the body to the food arrival (Figure 1b).

Lingual CD36 Displays the Properties of a Gustatory Lipid Sensor

Since chemosensitive proteins located at the apical side of TRC are responsible for taste reception, gustatory perception of lipids must also require the existence of specific receptors displaying a high affinity for LCFA in TRC. A plausible candidate for this function has recently been identified in rodent taste buds: the glycoprotein CD36 [20].

CD36 is a plasma membrane glycoprotein expressed in a wide variety of tissues. It is a multifunctional protein belonging to the family of class-B scavenger receptors. It increases the uptake of LCFA by cardiomyocytes and

4 Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources

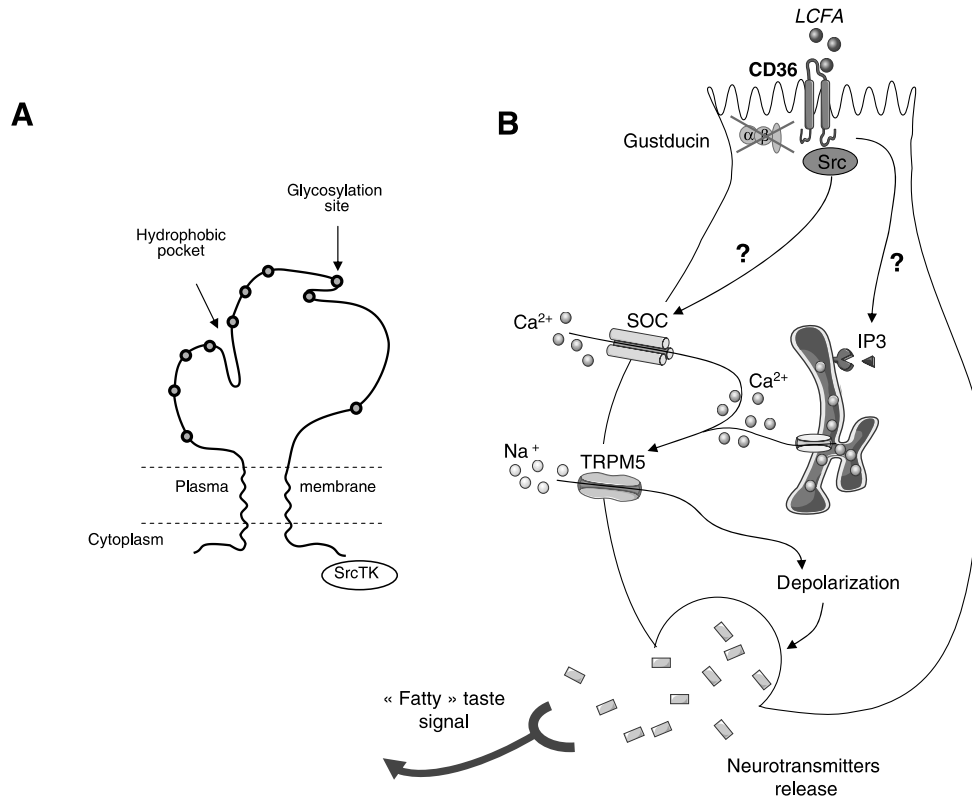


Figure 2 Predictive structure of CD36 and the putative CD36-mediated fat taste transduction pathway. (a) The glycoprotein CD36 displays a receptor-like structure, with a large extracellular hydrophobic pocket located between two short cytoplasmic tails. The existence of a physical interaction between the intracellular C-terminal tail of CD36 and Src protein-tyrosine kinases can result in the formation of a functional complex which appears to be especially adequate to transfer an exogenous lipid signal to TRC. (b) In CD36-positive TRC immunomagnetically isolated from mouse circumvallate papillae, Src-protein tyrosine kinases (Src-PTK) Yes and Fyn are activated when long-chain fatty acids (LCFA) bind to CD36, leading to a rise in $[Ca^{2+}]_i$ secondary to the opening of SOC channels. LCFA-CD36 interaction also increases IP3 expression level, suggesting that mobilization of endoplasmic reticulum Ca^{2+} could also contribute to the increase in $[Ca^{2+}]_i$. Like sweet taste transduction, $[Ca^{2+}]_i$ rise can activate the TRPM5 channels, leading to a cellular depolarization at the origin of the neurotransmitters release

adipocytes [21, 22] and that of oxidized LDL by macrophages [23], modifies platelet aggregation by binding to thrombospondin and collagen [24], facilitates the phagocytosis of apoptotic cells by macrophages [25] and increases the cyto-adhesion of erythrocytes infected with *Plasmodium falciparum* [26]. CD36 is also a receptor-like protein that binds saturated and unsaturated LCFA with an affinity in the nanomolar range [27]. Interestingly, this plasma membrane lipid-binding protein displays the structural and functional features required for being a taste-based lipid receptor. Firstly, CD36 appears to be restricted to the gustatory epithelium in the mouse and rat tongues [20, 28]. Immunohistochemical staining has

shown that the CD36 protein is present mostly at the apical side of some of the TRC lining the taste pores in the mouse [20]. This distribution of a protein with a very high affinity for LCFA is particularly suitable for the generation of a lipid signal by taste buds. Indeed, CD36-positive TRC is directly exposed to a microclimate potentially rich in LCFA, because of the local release of lingual lipase in the clefts of circumvallate papillae (Figure 1a). Secondly, a role for CD36 as a lipid sensor is also supported by the predicted structure of this protein (Figure 2a). This plasma membrane protein has a hairpin structure, with a large extracellular hydrophobic pocket located between two short cytoplasmic tails [29]. The existence of a

physical interaction between the intracellular C-terminal tail of CD36 and Src protein-tyrosine kinases [30] results in the formation of a functional complex, allowing the transfer of an exogenous lipid signal into the TRC (Figure 2a). Thirdly, CD36 gene invalidation abolishes both fat preference [20, 31] and the cephalic phase of digestion triggered by an oral LCFA deposition [20]. Taken together, these findings strongly suggest that CD36 is likely to be a lipid receptor involved in the orosensory perception of dietary lipids in rodents.

Evidence for the Involvement of the Gustatory Pathway in CD36-Mediated Fat Perception

The key question at this stage concerned the possible mediation of oral lipid detection by the gustatory pathway. Studies of the lipid transduction signal in TRC and of the afferent nerve route used to transfer the fat signal to the central nervous system were required to address this question.

Mechanisms of Fat Signal Transduction

The tastant-induced release of neurotransmitters towards afferent nerve fibres leads to the orosensory perception of sapid molecules. As mentioned above, this event is known to be mediated by changes in $[Ca^{2+}]_i$ in TRC [18]. If lingual CD36 acts as a lipid receptor, LCFA binding to CD36 may also affect $[Ca^{2+}]_i$. We tested this hypothesis by determining $[Ca^{2+}]_i$ in CD36-positive TRC isolated from mouse circumvallate papillae by affinity purification with magnetic beads [7]. Saturated and unsaturated LCFA triggered a rapid and robust increase in $[Ca^{2+}]_i$ in CD36-positive cells. This effect was strictly CD36 dependent, as it was not observed in CD36-negative cells. Moreover, addition of the specific CD36-binding inhibitor sulfo-*N*-succinimidyl oleic acid ester (SSO) [32] to the culture medium completely abolished the linoleic acid-mediated rise in $[Ca^{2+}]_i$ in CD36-positive cells. These data provided the first demonstration that LCFA increases $[Ca^{2+}]_i$ in the taste bud cells and that this event is CD36 dependent.

The reception of tastes other than salty and sour requires the heterotrimeric gustducin complex [33]. CD36-expressing TRC also contain the α -subunit of gustducin [7, 20], but this G-protein complex is not involved in fat preference. Indeed, attraction for LCFA-enriched solutions is maintained in α -gustducin-null mice [34]. This result was expected, because CD36 does not belong to the G-protein-coupled receptor family, unlike the T1R and T2R receptors responsible for sweet, umami and bitter taste detection. Since interactions between CD36 and Src protein-tyrosine kinases Fyn, Lyn and Yes have been reported in other cell types, an alternative mechanism for the transduction of lipid signal was

possible. Using CD36-positive TRC isolated from mouse circumvallate papillae, we have found that linoleic acid (C18:2, *n*-6) induced the phosphorylation of Src protein-tyrosine kinases Fyn and Yes [35]. It has also been shown that this event was responsible for the rapid and huge rise in the $[Ca^{2+}]_i$, which is known to be a necessary step for the neurotransmitter release by TRC. Transient receptor potential protein-5 (TRPM-5) is known to play an important role in taste transduction. This Na^+/K^+ channel responds to rapid changes in $[Ca^{2+}]_i$ by inducing transient membrane depolarization leading to neurotransmitter release. Interestingly, it has been reported that in TRPM5^{-/-} mice, the attraction for LCFA is weaker than that in controls [34]. Taken together, these findings provide the first evidence that LCFA affect the function of mouse TRC via the activation of a signalling cascade dependent on CD36 (Figure 2b).

Gustatory Nerves Convey the Fat Signal

The potential involvement of gustatory nerves in the LCFA-mediated fat preference has recently been explored in rodents by studying the impact of bilateral transection of the gustatory nerves: chorda tympani (CTX) and/or glossopharyngeal (GLX) nerves.

In rats, CTX decreases fat preference in a free-choice situation [36, 37]. Consistent with these data, CTX rats display much weaker conditioned aversion to linoleic acid than control rats [38]. Paradoxically, the impact of total denervation of the peripheral gustatory nerves (CTX+GLX) was not investigated in these rat studies, although such an exploration would be required for a full demonstration. In mice, the lack of functional peripheral gustatory nerves (CTX+GLX animals) fully abolishes both spontaneous linoleic acid preference and conditioned aversion [7]. These findings demonstrate that afferent gustatory nerve fibres play a crucial role in the orosensory perception of LCFA in rodents. Although CD36 in TRC probably acts as a lipid receptor in these mammals, the link between lingual CD36 and transfer of a fat signal by gustatory nerves remains to be demonstrated by using a direct electrophysiological recording in CD36^{+/+} and CD36^{-/-} mice subjected to an oral lipid load.

Oral Lipid Deposition and Brain Activation

Lipid signals therefore appear to be transmitted by a peripheral nerve route known to be involved in the transfer of gustatory information to the brain. The NST in the brainstem is the first synaptic relay in the nervous gustatory cascade. Immunohistochemical detection of Fos, the protein encoded by the immediate early gene *c-fos*, has been successfully used to identify populations of neurons activated by LCFA in the NST. In mice, oral linoleic acid deposition triggers the activation of NST

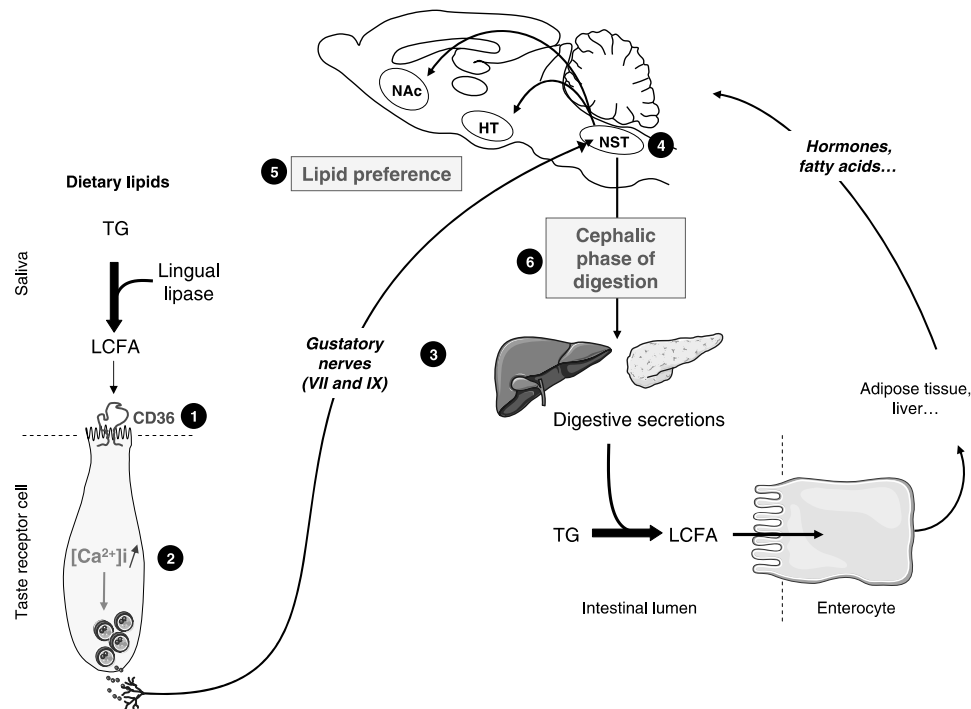


Figure 3 Working model for the gustatory perception of LCFA in the mouse. ❶ LCFA released from triglycerides (TG) by lingual lipase bind to CD36, which acts as a gustatory lipid receptor in taste receptor cells. ❷ The recognition of LCFA by CD36 induces an increase in $[Ca^{2+}]_i$, an event known to generate the release of neurotransmitters by TRC. ❸ Lipid taste signal is then transmitted by the gustatory nerves, the chorda tympani nerve (VII) and the glossopharyngeal nerve (IX), to the gustatory area in the nucleus of the solitary tract (NST) in the brainstem (❹). The projections of the NST to central nuclei involved in eating behaviour and to peripheral tissues, including the digestive tract, could account for the CD36-mediated attraction for lipids (❺) and cephalic phase of digestion (❻) reported in mice subjected to an oral lipid stimulation. HT, hypothalamus; NAc, nucleus accumbens

areas known to receive CT and GL afferent fibres. This activation appears to be CD36 dependent, as it is not observed in CD36-null mice subjected to oral stimulation with linoleic acid [7].

The known involvement of the lateral hypothalamus and nucleus accumbens in food intake and reward, respectively, and in the reception of synaptic inputs from the NST [38] might account for the spontaneous preference for LCFA-rich food observed in mice. The digestive projections of the NST [38] might also contribute to a lipid-mediated reflex, controlling pancreato-biliary secretions directly and/or indirectly, through the production of intestinal hormones. Axons from the mandibular branch of the trigeminal nerve innervating the anterior tongue project into taste areas of the NST [39], but mechanical or textural stimulation is unlikely. Indeed, water alone or mixed with xanthan gum to mimic the texture of lipids does not affect neuronal activity in the NST [7]. Thus, the fat signal triggered by the interaction of LCFA

with CD36 in the oral cavity is transmitted through the NST, the central and peripheral projections of which affect the activity of nervous nuclei known to be involved in feeding behaviour and the cephalic phase of digestion. A working model for the gustatory perception of LCFA in the mouse is shown in Figure 3.

Other Lingual Lipid-Sensor Candidates

Two other candidates for the chemioreception of dietary lipids have been identified in rodent tongues: the delayed-rectifying potassium channel Kv1.5 and the G-protein-coupled receptor GPR120.

Delayed-Rectifying Potassium Channels

In TRC, various voltage-activated ion channels (K^+ , Na^+ and Ca^{2+}) contribute to the release of neurotransmitters

after chemical stimulation [19, 20]. LCFA are known to regulate ion channels in various cell types. Gilbertson and his colleagues from the University of Utah (USA) therefore used patch-clamp recording to explore the putative effect of free fatty acids (FFA) on membrane potential in TRC isolated from rat fungiform papillae. They reported that FFA are able to inhibit the delayed rectifying K^+ (DRK) channels, which are known to be involved in the transduction pathways for various taste stimuli [40]. This action is direct and strictly mediated by polyunsaturated fatty acids (PUFA). PUFA inhibition is effective only if these molecules are applied extracellularly, as in the physiological context. This suggests that the responsiveness to PUFA of taste cells may contribute to fat preference, thereby indirectly affecting body mass. To explore this hypothesis, the effect of PUFA on DRK currents was explored by patch-clamp recording in isolated fungiform TRC from obesity-resistant (S5B/P1) and obesity-prone (Osborne–Mendel) rats. Unexpectedly, PUFA-mediated depolarization was greater in TRC from obesity-resistant rats, which are known to prefer carbohydrates, than in those from obesity-prone animals, which prefer fats [41]. This strain-specific response was attributed to a difference in the pattern of expression of DRK channel isoforms in TRC, with obesity-resistant rats having more K^+ channels responsive to PUFA than obesity-prone animals [41]. Various DRK channels are found in rat fungiform papillae [42], but the *shaker* Kv1.5 channel, specifically inhibited by PUFA in cardiac cells [43], has been shown to be strongly expressed in TRC from obesity-resistant S5B/P1 rats [42]. The mechanism by which PUFA inhibit Kv1.5 channels in taste bud cells remains unknown. However, a direct effect is likely, since a physical interaction between PUFA and the extracellular domain of the Kv1.5 protein has already been reported in cardiomyocytes [43]. The Kv1.5 channel may therefore be considered as an ionotropic receptor in TRC. Taken together, these data suggest that the control of Kv1.5 channels in TRC by PUFA does not explain the spontaneous fat preference observed in rodents.

G-Protein-Coupled Receptors (GPCR): GPR120

GPR120 belongs to the GPCR family [44, 45]. It is abundantly expressed in enteroendocrine cells, particularly in the distal part of the small intestine (ileum) and the colon, in both mice and humans. In these cells, GPR120 functions as a receptor for unsaturated LCFA, leading to the secretion of incretins such as glucagon-like peptide-1 [46] and cholecystokinin [47]. Preliminary studies have shown that GPR120 is also expressed in TRC in rats [48] and mice [49]. To date, the physiological role of this receptor in the taste buds remains unknown.

GPR120 is also found in the mouse enteroendocrine STC-1 cell line. Interestingly, STC1 cells have several genotypic and phenotypic features in common with TRC.

For instance, they also express the genes encoding receptors for sweet taste, T1R2 and T1R3 [50], and for bitter taste, T2R [51], and the five basic taste stimuli induce an increase in $[Ca^{2+}]_i$ [52]. *In vitro* studies in STC-1 cells have shown that unsaturated LCFA–GPR120 interaction also leads to an increase in $[Ca^{2+}]_i$ [47]. This result is reminiscent of the tastant-mediated increase in $[Ca^{2+}]_i$ in TRC. GPR120 is a receptor for unsaturated fatty acids [47] and its involvement in the orosensory perception of dietary lipids is thus plausible. However, further studies including the effect of GPR120 gene manipulation (inactivation or overexpression) on fat preference are required to validate this hypothesis.

Conclusion and Perspectives

Dietary lipid perception clearly depends on multiple factors. Recent data show that a gustatory cue devoted to fat perception operates in mice and likely in humans, in parallel with texture and olfaction. LCFA play the role of tastants that provide the stimulus for fat perception. In mice, CD36 acts as a gustatory lipid receptor, enabling the organism to obtain sufficient energy by selecting and promoting the digestion of lipids (Figure 2). This system, which might be considered as a sixth taste modality, would clearly be advantageous in times of food scarcity. Indeed, fat-rich foods are an important source of energy, contain essential fatty acids and carry lipid-soluble vitamins (A, D, E and K) with many important, fundamental biological functions. Conversely, this ‘fatty’ taste might contribute to obesity risk during periods of food abundance. Attraction for lipids is so strong that mice given free access to oil as an optional diet rapidly become obese [53]. In humans, there is a positive correlation between liking fat and body mass index [54]. However, the origin of this correlation remains unclear. It has also been reported that obese individuals like fat to a greater extent than lean subjects do [55, 56], suggesting that obese people live in a different orosensory world.

Several questions are raised by these findings. What is the physiological significance of the presence of several putative lipid sensors (CD36, Kv1.5 channels and GPR120) in rodent taste buds? How can we account for the multifunctionality of CD36? What are the molecular mechanisms responsible for the chemodetection of LCFA in the oral cavity in humans? Are they related to what is found in rodents? The identification of relevant, non-invasive biological markers in humans may make it possible to answer this last question in the near future.

Acknowledgements

This work was supported by the French National Research Agency (ANR) through the Research Program in Nutrition, grants from INRA/INSERM (SensoFAT) and

8 Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources

from the Burgundy Council. D.G. and M.C. are supported by a fellowship from the French Ministry of Research and Technology and C.M. by the ANR.

References

1. Malecka-Tendera E, Mazur A. Childhood obesity: a pandemic of the twenty-first century. *International Journal of Obesity* (London) 2006;30:S1–3.
2. Olshansky SJ, Passaro DJ, Hershow RC, Layden J, Carnes BA, Brody J, *et al.* A potential decline in life expectancy in the United States in the 21st century. *New England Journal of Medicine* 2005;352:1138–45.
3. Tsuruta M, Kawada T, Fukuwatari T, Fushiki T. The orosensory recognition of long-chain fatty acids in rats. *Physiology and Behavior* 1999;66:285–8.
4. Takeda M, Imaizumi M, Fushiki T. Preference for vegetable oils in the two-bottle choice test in mice. *Life Sciences* 2000;67:197–204.
5. Fukuwatari T, Shibata K, Iguchi K, Saeki T, Iwata A, Tani K, *et al.* Role of gustation in the recognition of oleate and triolein in anosmic rats. *Physiology and Behavior* 2003;78:579–83.
6. McCormack DN, Clyburn VL, Pittman DW. Detection of free fatty acids following a conditioned taste aversion in rats. *Physiology and Behavior* 2006;87:582–94.
7. Gaillard D, Laugerette F, Darcel N, El-Yassimi A, Passilly-Degrace P, Hichami A, *et al.* The gustatory pathway is involved in CD36-mediated orosensory perception of long-chain fatty acids in the mouse. *FASEB Journal* 2008;22:1458–68.
8. Yoneda T, Saitou K, Mizushige T, Matsumura S, Manabe Y, Tsuzuki S, *et al.* The palatability of corn oil and linoleic acid to mice as measured by short-term two-bottle choice and licking tests. *Physiology and Behavior* 2007;91:304–9.
9. Kawai T, Fushiki T. Importance of lipolysis in oral cavity for orosensory detection of fat. *American Journal of Physiology* 2003;285:R447–54.
10. Mattes RD. Fat taste and lipid metabolism in humans. *Physiology and Behavior* 2005;86:691–7.
11. Chale-Rush A, Burgess JR, Mattes RD. Evidence for human orosensory (taste?) sensitivity to free fatty acids. *Chemical Senses* 2007;32:423–31.
12. Schiffman SS, Graham BG, Sattely-Miller EA, Warwick ZS. Orosensory perception of dietary fat. *Current Directions in Psychological Science* 1998;7:137–43.
13. Moreau H, Laugier R, Gargouri Y, Ferrato F, Verger R. Human preduodenal lipase is entirely of gastric fundic origin. *Gastroenterology* 1988;95:1221–6.
14. Hamosh M. Lingual and gastric lipases. *Nutrition* 1990;6:421–8.
15. Takeda M, Sawano S, Imaizumi M, Fushiki T. Preference for corn oil in olfactory-blocked mice in the conditioned place preference test and the two-bottle choice test. *Life Science* 2001;69:847–54.
16. Saitou K, Yoneda T, Mizushige T, Asano H, Okamura M, Matsumura S, *et al.* Contribution of gustation to the palatability of linoleic acid. *Physiology and Behavior* 2009;96:142–8.
17. Smith JC, Fisher EM, Maleszewski V, McClain B. Orosensory factors in the ingestion of corn oil/sucrose mixtures by the rat. *Physiology and Behavior* 2000;69:135–46.
18. Gilbertson TA, Boughter Jr JD. Taste transduction: appetizing times in gustation. *Neuroreport* 2003;14:905–11.
19. Sugita M. Taste perception and coding in the periphery. *Cellular and Molecular Life Sciences* 2006;63:2000–15.
20. Laugerette F, Passilly-Degrace P, Patris B, Niot I, Febbraio M, Montmayeur JP, *et al.* CD36 involvement in orosensory detection of dietary lipids, spontaneous fat preference, and digestive secretions. *Journal of Clinical Investigation* 2005;115:3177–84.
21. Coburn CT, Knapp Jr FF, Febbraio M, Beets AL, Silverstein RL, Abumrad NA. Defective uptake and utilization of long chain fatty acids in muscle and adipose tissues of CD36 knockout mice. *Journal of Biological Chemistry* 2000;275:32523–9.
22. Hajri T, Ibrahim A, Coburn CT, Knapp Jr FF, Kurtz T, Pravenec M, *et al.* Defective fatty acid uptake in the spontaneously hypertensive rat is a primary determinant of altered glucose metabolism, hyperinsulinemia, and myocardial hypertrophy. *Journal of Biological Chemistry* 2001;276:23661–6.
23. Febbraio M, Hajjar DP, Silverstein RL. CD36: a class B scavenger receptor involved in angiogenesis, atherosclerosis, inflammation, and lipid metabolism. *Journal of Clinical Investigation* 2001;108:785–91.
24. Chen H, Herndon ME, Lawler J. The cell biology of thrombospondin-1. *Matrix Biology* 2000;19:597–614.
25. Ren Y, Silverstein RL, Allen J, Savill J. CD36 gene transfer confers capacity for phagocytosis of cells undergoing apoptosis. *Journal of Experimental Medicine* 1995;181:1857–62.
26. Oquendo P, Hundt E, Lawler J, Seed B. CD36 directly mediates cytoadherence of *Plasmodium falciparum* parasitized erythrocytes. *Cell* 1989;58:95–101.
27. Baillie AG, Coburn CT, Abumrad NA. Reversible binding of long-chain fatty acids to purified FAT, the adipose CD36 homolog. *Journal of Membrane Biology* 1996;153:75–81.
28. Fukuwatari T, Kawada T, Tsuruta M, Hiraoka T, Iwanaga T, Sugimoto E, *et al.* Expression of the putative membrane fatty acid transporter (FAT) in taste buds of the circumvallate papillae in rats. *FEBS Letters* 1997;414:461–4.
29. Rac ME, Safranow K, Poncyljusz W. Molecular basis of human CD36 gene mutations. *Molecular Medicine* 2007;13:288–96.
30. Huang MM, Bolen JB, Barnwell JW, Shattil SJ, Brugge JS. Membrane glycoprotein IV (CD36) is physically associated with the Fyn, Lyn, and Yes protein-tyrosine kinases in human platelets. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 1991;88:7844–8.
31. Sciafani A, Ackroff K, Abumrad NA. CD36 gene deletion reduces fat preference and intake but not post-oral fat conditioning in mice. *American Journal of Physiology* 2007;293:R1823–32.
32. Harmon CM, Luce P, Beth AH, Abumrad NA. Labeling of adipocyte membranes by sulfo-*N*-succinimidyl derivatives of long-chain fatty acids: inhibition of fatty acid transport. *Journal of Membrane Biology* 1991;121:261–8.

Philippe Besnard, Dany Gaillard, Patricia Passilly-Degrace, Céline Martin and Michael Chevrot 9

33. Wong GT, Gannon KS, Margolskee RF. Transduction of bitter and sweet taste by gustducin. *Nature* 1996;381:796–800.
34. Sclafani A, Zukerman S, Glendinning JI, Margolskee RF. Fat and carbohydrate preferences in mice: the contribution of alpha-gustducin and Trpm5 taste-signaling proteins. *American Journal of Physiology* 2007;293:R1504–13.
35. El-Yassimi A, Hichami A, Besnard P, Khan NA. Linoleic acid induces calcium signaling, SRC-kinase phosphorylation and neurotransmitters release in mouse CD36-positive gustatory cells. *Journal of Biological Chemistry* 2008;283:12949–59.
36. Stratford JM, Curtis KS, Contreras RJ. Chorda tympani nerve transection alters linoleic acid taste discrimination by male and female rats. *Physiology and Behavior* 2006;89:311–9.
37. Pittman D, Crawley ME, Corbin CH, Smith KR. Chorda tympani nerve transection impairs the gustatory detection of free fatty acids in male and female rats. *Brain Research* 2007;1151:74–3.
38. Berthoud HR. Multiple neural systems controlling food intake and body weight. *Neuroscience Biobehavior Review* 2002;26:393–428.
39. Hamilton RB, Norgren R. Central projections of gustatory nerves in the rat. *Journal of Comparative Neurology* 1984;222:560–77.
40. Gilbertson TA, Fontenot DT, Liu L, Zhang H, Monroe WT. Fatty acid modulation of K⁺ channels in taste receptor cells: gustatory cues for dietary fat. *American Journal of Physiology* 1997;272:C1203–10.
41. Gilbertson TA, Liu L, Kim I, Burks CA, Hansen DR. Fatty acid responses in taste cells from obesity-prone and -resistant rats. *Physiological Behavior* 2005;86:681–90.
42. Liu L, Hansen DR, Kim I, Gilbertson TA. Expression and characterization of delayed rectifying K⁺ channels in anterior rat taste buds. *American Journal of Physiology* 2005;289:C868–80.
43. Honore E, Barhanin J, Attali B, Lesage F, Lazdunski M. External blockade of the major cardiac delayed-rectifier K⁺ channel (Kv1.5) by polyunsaturated fatty acids. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 1994;91:1937–41.
44. Fredriksson R, Hoglund PJ, Gloriam DE, Lagerstrom MC, Schioth HB. Seven evolutionarily conserved human rhodopsin G protein-coupled receptors lacking close relatives. *FEBS Letters* 2003;554:381–8.
45. Rayasam GV, Tulasi VK, Davis JA, Bansal VS. Fatty acid receptors as new therapeutic targets for diabetes. *Expert Opinions on Therapeutic Targets* 2007;11:661–71.
46. Hirasawa A, Tsumaya K, Awaji T, Katsuma S, Adachi T, Yamada M, *et al.* Free fatty acids regulate gut incretin glucagon-like peptide-1 secretion through GPR120. *Nature Medicine* 2005;11:90–4.
47. Tanaka T, Katsuma S, Adachi T, Koshimizu TA, Hirasawa A, Tsujimoto G. Free fatty acids induce cholecystokinin secretion through GPR120. *Naunyn Schmiedebergs Archives of Pharmacology* 2008;377:523–7.
48. Matsumura S, Mizushige T, Yoneda T, Iwanaga T, Tsuzuki S, Inoue K, *et al.* GPR expression in the rat taste bud relating to fatty acid sensing. *Biomedical Research* 2007;28:49–5.
49. Matsumura S, Eguchi A, Mizushige T, Kitabayashi N, Tsuzuki S, Inoue K, *et al.* Colocalization of GPR120 with phospholipase-C beta2 and alpha-gustducin in the taste bud cells in mice. *Neuroscience Letters* 2009;450:186–90.
50. Dyer J, Salmon KS, Zibrik L, Shirazi-Beechey SP. Expression of sweet taste receptors of the T1R family in the intestinal tract and enteroendocrine cells. *Biochemical Society Transactions* 2005;33:302–5.
51. Wu SV, Rozengurt N, Yang M, Young SH, Sinnott-Smith J, Rozengurt E. Expression of bitter taste receptors of the T2R family in the gastrointestinal tract and enteroendocrine STC-1 cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 2002;99:2392–7.
52. Saitoh O, Hirano A, Nishimura Y. Intestinal STC-1 cells respond to five basic taste stimuli. *Neuroreport* 2007;18:1991–5.
53. Takeda M, Imaizumi M, Sawano S, Manabe Y, Fushiki T. Long-term optional ingestion of corn oil induces excessive caloric intake and obesity in mice. *Nutrition* 2001;17:117–20.
54. Barthoshuk LM, Duffy VB, Hayes JE, Moskowitz HR, Snyder DJ. Psychophysics of sweet and fat perception in obesity: problems, solutions and new perspectives. *Philosophical Transactions of the Royal Society B* 2006;361:1137–48.
55. Drewnowski A, Brunzell JD, Sande K, Iverius PH, Greenwood MR. Sweet tooth reconsidered: taste responsiveness in human obesity. *Physiology and Behavior* 1985;35:617–22.
56. Mela DJ. Sensory assessment of fat content in fluid dairy products. *Appetite* 1988;10:37–44.

Different effects of pioglitazone and rosiglitazone on lipid metabolism in mouse cultured liver explants

Louiza Djaouti
Tony Jourdan
Laurent Demizieux
Michaël Chevrot
Joseph Gresti
Bruno Vergès
Pascal Degrace*

UMR 866 INSERM-UB, Team
Physiopathology of dyslipidemias,
Faculty of Sciences Gabriel, University
of Burgundy, Dijon 21000, France

*Correspondence to:
Pascal Degrace, UMR 866
INSERM-UB, Equipe
Physiopathologie des dyslipidémies,
Faculté des Sciences Gabriel,
Université de Bourgogne, 6
Boulevard Gabriel, Dijon 21000,
France. E-mail:
pascal.degrace@u-bourgogne.fr

Received: 29 June 2009
Revised: 15 January 2010
Accepted: 25 March 2010

Abstract

Background Pioglitazone (PIO) and rosiglitazone (ROSI) are widely used as oral antidiabetic agents for treatment of type 2 diabetes. Although these medications exert similar effects on blood glucose, recent clinical studies indicated that PIO has a more pronounced beneficial effect on lipid parameters than ROSI. In order to get further insight into the lipid effects of both drugs, we tested whether PIO, compared to ROSI, could exert direct effects on lipid liver metabolism in relation with plasma lipids.

Methods We performed *in vitro* studies using mice liver slices incubated 21 h either with ROSI (1 $\mu\text{mol/L}$) or PIO (7.5 $\mu\text{mol/L}$).

Results We showed that both glitazones slightly reduced HMG-CoA reductase mRNA levels at the same degree but only PIO reduced intracellular cholesterol content, suggesting an alteration of cholesterol uptake rather than an inhibition of cholesterol biosynthesis. This concept was supported by the reduction of scavenger receptor class B type I expression, hepatic lipase activity and high-density lipoprotein cholesterol uptake in PIO-treated liver explants. Conversely, hepatic lipase mRNA levels were increased 3.5-fold. ROSI, but not PIO, induced acetyl-CoA carboxylase and fatty acid synthase gene expression and increased apoB secretion suggesting a stimulation of lipogenesis. Concurrently, peroxisome proliferator-activated receptor- γ mRNA levels were induced by ROSI and not significantly changed by PIO. Besides, PIO appeared to be a more potent activator of AMP-Activated Protein Kinase than ROSI.

Conclusions PIO and ROSI exert specific direct effects on liver and extrapolating these data to humans could explain the significant improvements in plasma lipids observed in diabetic patients treated with PIO. Copyright © 2010 John Wiley & Sons, Ltd.

Keywords glitazones; liver explants; lipid metabolism; HDL-C uptake; PPAR; cholesterol

Introduction

Pioglitazone (PIO) and rosiglitazone (ROSI), two members of the thiazolidinediones (TZDs) family, are widely used as oral antidiabetic agents for treatment of type 2 diabetes [1,2]. These medications have both a glucose-lowering effect and the potential to modify lipid metabolism. Despite

the widespread clinical use of these drugs, the precise molecular mechanisms by which TZDs exert their effects remain largely unknown. TZDs are known to be specific ligands for the gamma isoform of the peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR), a family of nuclear receptors controlling the transcription of genes involved in preadipocyte differentiation [3,4], fatty acid (FA) transport, synthesis and storage [5,6]. The stimulation of adipogenesis may promote the incorporation of free FAs from the circulation into adipose tissue [7] lowering plasma free FA levels [8] and providing a putative mechanism for increased insulin sensitivity [9–11]. Indeed, it has been reported that treatment with TZDs decreases ectopic lipid deposition in diabetic rats [12–14] and humans with non-alcoholic fatty liver disease [15,16]. More recently, evidence has accumulated that TZDs treatment also increases the production of fat-derived signalling molecules including leptin [17,18] and adiponectin [19,20], which may affect metabolic function of liver and skeletal muscle and improve FA and glucose metabolism [21].

Thus, TZDs appear to exert their insulin sensitizing effects by acting as selective ligands of the PPAR γ receptors primarily in adipose tissue [22]. Nevertheless, recent data suggested that TZDs treatment could improve systemic parameters of insulin sensitization independently of PPAR [23,24] supporting the concept of a direct effect of TZDs.

As far as lipid effects are concerned, clinical studies have shown differences between PIO and ROSI. Indeed, PIO decreases triglycerides when ROSI does not and the increase in plasma high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C) is significantly greater with PIO than with ROSI [25]. In addition, plasma low-density lipoprotein cholesterol is increased with ROSI but not with PIO [25]. The mechanisms by which PIO and ROSI exert different effects on lipid parameters are not clearly understood. Furthermore, the direct action of TZDs on hepatocytes has been poorly studied and should be considered in regard to the central role of liver on lipid homeostasis.

Thus, the aim of this study was to determine, using cultured liver explants, a model retaining intact cell structure, whether PIO and ROSI could exert direct effects on liver lipid metabolism independently of factors related to adipocytes. We further comparatively examined the impact of PIO and ROSI with regard to the mechanisms by which the two medications differently affect plasma lipids in humans.

Materials and methods

Animal experiment and treatments

Official French regulations (n° 87848) for the use and care of laboratory animals were followed throughout, and experimental protocol was approved by the local ethic committee for animal experimentation. C57BL/6 male mice (Janvier, Le Genest Saint Isle, France) were

housed in individual plastic cages and fed with standard diet (AO4, UAR, Epinay-sur-Orge, France) until the preparation of liver slices.

Cultured liver explants

C57BL/6 male mice (13 week old) were anaesthetized with intraperitoneal injection of ketamine/xylazine (7.5 mg/1 mg for 100 g body weight). The liver was perfused with cold and oxygenated Hanks' balanced salt solution (HBS) to clear the organ of blood before slicing using a Brendel/Vitron slicer (Tucson, AZ) in the same medium. Thin slices (about 200 μ m) from each liver were rinsed and pre-incubated 30 min at 37 °C in HBS before being randomly distributed in 50-mL culture tubes containing 10 mL of oxygenated William's Medium E (WME) supplemented with heat-inactivated calf serum (10%), antibiotic–antifungal cocktail (1%). Concentrated suspensions of glitazones in WME were prepared from commercial pills (Avandia® for ROSI, Glaxo-SmithKline, Marly-le-Roi, France and Actos® for PIO, Laboratoires Takeda, Puteaux, France) using a mini-beadbeater homogenizer (BioSpec Products, Bartlesville, OK) and added under a small volume to the culture tubes to reach a final concentration of 1 μ mol/L for ROSI or 7.5 μ mol/L for PIO. As glitazones bind serum proteins with high affinity [26], the compounds were made soluble binding calf serum proteins in the medium. Tubes were then installed horizontally on a rocking shaker, pierced on the top to allow gas exchange and incubated for 21 h in a 5% CO₂ and 37 °C atmosphere under slight agitation. At the end of the incubation period, slices were randomly allocated to the different experiments described thereafter. Chemicals and mediums used in this procedure were supplied by Sigma (Saint-Quentin-Fallavier, France).

Lipid parameters

At the end of the incubation period, 4–5 explants from each tube were submitted to lipid extraction according to the method of Folch *et al.* [27]. One mL of organic phase was transferred to a clean tube containing 1 mL of 1% Triton X-100 in chloroform and dried down under nitrogen. The residue was re-solubilized in 0.25 mL distilled water and used for determination of triglyceride and cholesterol contents using a commercial kit (BioMérieux, Marcy l'Etoile, France).

FA incorporation, FA oxidation and lipoprotein secretion

After the 21-h incubation period, three other slices from each tube were rinsed with WME and placed in 3.5 mL of serum-free WME oxygenated and supplemented with the different treatments and L-carnitine (0.5 mmol/L). 0.2 mmol/L of [1-¹⁴C] palmitic acid (55.5 GBq/mol, PerkinElmer, Courtaboeuf, France) complexed to albumin

[FA/bovine serum albumin (BSA) molar ratio 2.5/1] was added to the medium. After 4 h of incubation at 37 °C under slight agitation, slices were rinsed with cold WME and immediately submitted to lipid extraction [27]. Lipid classes were then separated by thin-layer chromatography on silica gel and radioactivity was measured with an AR-2000 imaging scanner (BioScan, Washington, DC). Oxidation rates were estimated measuring labelled CO₂ and acid-soluble products contents recovered in the incubation medium [28]. Apolipoprotein B and A1 secreted in the medium were determined with commercial kits from Orion Diagnostica (Espoo, Finland). Protein concentrations in liver explants were estimated by the bicinchoninic acid procedure using BSA as a standard (Sigma).

Hepatic lipase activity

Hepatic lipase (HL) activity was measured from fresh liver slices following the procedure described by Iverius and Ostlund-Lindquist [29] using 1.67 mmol/L triolein emulsified in WME with tri-9,10-[³H]oleoyl-glycerol (22 KBq/assay; PerkinElmer) as substrate. After a 2-h incubation at 37 °C, HL activity was estimated from the radioactivity of [³H]oleate released in the medium and incorporated into liver explants.

[³H]-cholesteryl ether-HDL uptake

First, a HDL fraction was isolated from human plasma by sequential flotation ultracentrifugations as described previously [30]. HDL was then radiolabelled with [³H]-cholesteryl ether (CE) as following. Briefly, [³H]cholesteryl hedacyl ether was combined with L- α -phosphatidylcholine and butylhydroxytoluene in a 500:1:6 molar ratio and sonicated to form liposomes. HDL-[³H]CE was obtained by addition of liposomes to the HDL fraction in presence of lipoprotein-free plasma as cholesteryl ester transfer protein (CETP) source after an overnight incubation at 37 °C under light agitation. Labelled HDL were separated from remaining liposomes by another sequential flotation ultracentrifugation and washed twice in KBr (density 1.21). Finally, HDL-[³H]CE were aliquoted and stored at -80 °C until used. Measurement of the uptake was carried out at 37 °C by incubating two liver slices in 1 mL of WME containing 40 μ g of proteins (0.3 mCi of HDL-[³H]CE), under slight agitation. After 3 h, slices were removed from medium, washed three times, and homogenized in 400 mL of phosphate saline buffer (PBS) with a mini-beadbeater (BioSpec Products). Then, the radioactivity recovered in the homogenate was estimated, representing the amount of HDL-C uptaken by the liver cells.

Immunoblotting

Fresh liver slices allocated for immuno-detection of phosphorylated AMP-Activated Protein Kinase (AMPK)

were placed in oxygenated WME supplemented with ROSI (1 μ mol/L) or PIO (7.5 μ mol/L) or vehicle as described above. After incubation from 0 to 1 h, slices were homogenized in a Potter-Elvehjem homogenizer in saline phosphate buffer containing protease and phosphatase inhibitor cocktails (Roche diagnostic) and diluted into 2 \times sample buffer (125 mmol/L Tris-HCl, pH 6.8, 20% glycerol, 4% sodium dodecyl sulfate (SDS), 5 mmol/L dithiothreitol (DTT) and 5% β -mercaptoethanol). Equal amounts of proteins were separated by electrophoresis on 8% polyacrylamide gels containing 0.1% SDS and transferred onto Hybond-ECL nitrocellulose membranes (GE Healthcare, Saclay, France). Membranes were then blocked for 1 h at room temperature with 5% BSA in Tris/tween buffered saline solution (TBST), 20 mmol/L Tris-HCl, pH 7.4, 500 mmol/L NaCl and 0.1% tween 20. Membranes were incubated either overnight at 4 °C with a phospho(p)-AMPK α (Thr172) antibody (dilution 1 : 1000; Cell Signalling, Danvers, MA), or 1 h at room temperature with a β -actin antibody (dilution 1 : 10 000; Sigma). Blots were washed with TBST for 1 h and incubated with secondary antibody, horseradish peroxidase linked to anti-IgG (dilution 1 : 10 000) for 1 h. After incubation, blots were washed with TBST and visualized with ECL reagents (GE Healthcare).

Gene expression

Total mRNA from cultured liver explants were extracted with Tri-Reagent (Euromedex, Souffelweyheim, France). Total mRNA was reverse-transcribed using the Iscript cDNA kit (Bio-Rad, Marnes-La Coquette, France). Real-time polymerase chain reaction was performed as described previously [31] in a 96-well plate using an iCycler iQ (Bio-Rad). The sequences of the forward and reverse primers used are described in Table 1. The relative gene expression was calculated from standard curves for each gene established using four dilutions (1/10 to 1/10 000) of cDNA positive controls and normalized with 18S and TATA box binding protein.

Statistical analysis

Results are expressed as means \pm SEM. Data were subjected to one-way analysis of variance followed by Tukey-Kramer *post hoc* test. Differences were considered significant at $p < 0.05$.

Results

PIO reduced intracellular triglyceride and cholesterol content in liver explants

Consistent with the notion of a direct effect of TZDs on lipid metabolism, we investigated the measure of some parameters related to FA oxidation and esterification.

Table 1. Primers for real-time polymerase chain reaction

Gene	5'-Sense primer-3'	5'-Antisense primer-3'	Length of polymerase chain reaction products (bp)
18S	GTGTGGGGAGTGAATGGT	GCGAGACAGTCAAACCCAG	60
ACC1	ACACCATGTTGGGAGTTGTG	GCTGTCCTCAGGTCACAT	64
ACC2	CATGGTAGTGGCTTTGAAGGA	CGTGTGATATCGTTGTTCTG	114
ACO	ATTTACGTACGTTTACCCCG	ATACCACCCACGAGTCC	127
CPT-1	GGATCTACAATCCCTCTGC	ATCTAACTGCCGGATCCAC	110
FAS	GGCTGCAGTGAATGAATTTG	TTCGTACCTCTTGGCAAAC	55
FAT/CD36	AATTAGTAGAACCGGGCCAC	CCAACCTCCAGGTACAATCA	67
HMG-CoAred	GCCTGGATGGGAAGGAGTA	CTTATGGCTCTGCAGCTCT	90
HL	GTGAATGTGGGGTTAGTGGAC	ACTTCGCAGATTCTCCAGC	129
LDLR	CATAGGCTATCTGCTTACC	TTGGGGAGCAGACTGTTGTA	89
PPAR α	GTTTTCAACAAGTGCCTGTCTGT	GTATGAACAAAAGCGGGTTG	87
PPAR γ	ATCTAACTGCCGGATCCAC	AGGCACCTCTGAAACCGACA	69
SR-BI	TCCCTTCGTGCATTTCTCA	GTTTCATCCCAACAACAGGC	86
TPB	ACGGCACAGGACTTACCA	GCTGCTTTGTGCTCTCCAA	77

Primer pairs were designed using Primers! software and were synthesized by MWG-Biotech AG (Ebersberg, Germany). 18S, 18S ribosomal RNA; ACC, acetyl-CoA carboxylase; ACO, acyl-CoA oxidase; CPT-1, carnitine palmitoyltransferase I; FAS, fatty acid synthase; FAT/CD36, fatty acid translocase; HMG-CoAred, hydroxymethylglutaryl-CoA reductase; HL, hepatic lipase; LDLR, low-density lipoprotein receptor; PPAR, peroxisome proliferator-activated receptor; SR-BI, scavenger receptor class B type I; TPB, TATA box binding protein.

Table 2. Effects of pioglitazone and rosiglitazone on triglyceride and cholesterol content in liver explants

	Control	Rosiglitazone	Pioglitazone
Liver explants			
Triglycerides (mg/g protein)	132.4 ± 4.3 ^a	139.6 ± 12.3 ^a	105.5 ± 8.4 ^b
Cholesterol (mg/g protein)	17.0 ± 1.8 ^a	21.0 ± 4.2 ^a	13.5 ± 1.5 ^b

Liver explants were treated 21 h with either rosiglitazone (1 µmol/L), pioglitazone (7.5 µmol/L) or vehicle and submitted to lipid extraction as described in Materials and Methods section. Values are means ± SEM (n = 6). ^{a,b}Values in each row that do not share a superscript letter differ (p < 0.05).

First, we measured the consequences of a 21-h treatment with PIO or ROSI on triglyceride and cholesterol content in liver slices. Incubation with PIO caused a significant reduction in triglyceride and cholesterol contents compared with ROSI and control (Table 2). We concomitantly observed that treatments did not alter the capacity of liver slices to oxidize palmitic acid (Figure 1A) nor to esterify it into phospholipids (Figure 1B) and triglycerides (Figure 1C). As lipid and cholesterol synthesis are closely related to lipoprotein secretion, we also explored the possibility that treatment with glitazones may modify the capacity of liver explants to produce apolipoprotein B and apolipoprotein A1 (Figure 1D and E). In our conditions, neither PIO nor ROSI significantly changed these parameters except for apolipoprotein B secretion that was slightly stimulated by ROSI when compared to PIO.

PIO reduced HL activity and HDL-CE uptake in liver explants

When measured on liver explants with triglycerides as substrate, the result of HL activity is the hydrolysis of FA that may be released in the medium or successively incorporated into hepatocytes. So both parameters

were investigated and presented in Figure 2A and B, respectively. PIO treatment led to a lesser FA hydrolysis and release in the medium than ROSI and control indicating a reduction in HL activity, whereas FA recovered into tissues were not significantly modified whatever the treatment.

We also wanted to determine whether ROSI and PIO affected HDL-CE uptake in our model. We observed that PIO decreased HDL-CE recovery in liver explants when compared with ROSI and control (Figure 3).

PIO was a more potent activator of AMPK than ROSI

The central role of AMPK in the regulation of carbohydrate and lipid metabolism prompted us to investigate whether PIO and ROSI could differently activate AMPK in liver explants. In a recent study, it has been demonstrated that the activation process of AMPK by TZDs is direct, rapid (5–15 min) and gives rise to metabolic effects such as increased glucose disposal within 30 min [32]. Thus, in the present work, we analyzed the effects of PIO and ROSI on AMPK activation from 0 to 1 h. Kinetics data indicated that PIO increased levels of phosphorylated AMPK more rapidly and more intensively than ROSI (Figure 4).

PIO and ROSI specifically modified expression of genes involved in lipid metabolism

In accordance with the reduction of intracellular cholesterol content observed after PIO treatment, we measured the expression of genes involved in cholesterol metabolism (Figure 5). We showed that both treatments decreased hydroxymethylglutaryl-CoA reductase (HMG-CoA red) expression suggesting a similar impact of both glitazones on the regulation of endogenous cholesterol

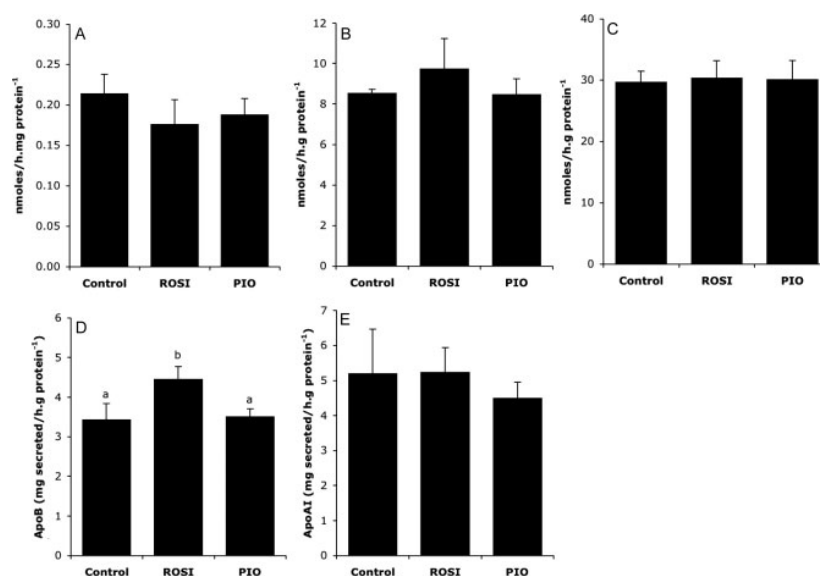


Figure 1. Metabolic fate of palmitic acid and apolipoprotein secretion by liver explants. Liver explants were first treated 21 h with either rosiglitazone (1 $\mu\text{mol/L}$), pioglitazone (7.5 $\mu\text{mol/L}$) or vehicle and incubated for four supplementary hours in the presence of 0.2 mmol/L [^{14}C] palmitic acid/BSA (2.5/1) as described in Materials and Methods section. (A) Fatty acid oxidation activity calculated from catabolism of [^{14}C] palmitic acid in $^{14}\text{CO}_2$ and ^{14}C -acid-soluble products recovered in the incubation medium. (B) Incorporation of palmitic acid into phospholipids and (C) into triglycerides. (D) Apolipoprotein B and (E) apolipoprotein A1 secretion rates by liver slices. Values are means \pm SEM ($n = 6$ per series). Columns that do not share a superscript letter differ ($p < 0.05$)

production. Some data relative to gene expression also supported that cholesterol supply to hepatocytes was modified by treatments. Thus, PIO specifically inhibited scavenger receptor class B type 1 (SR-B1) and highly induced the expression of HL, whereas no difference was detected with ROSI. In our conditions, both glitazones were ineffective on low-density lipoprotein receptor mRNA levels.

The current data also indicated that ROSI coordinately induced the expression of PPAR γ , acetyl-CoA carboxylase isoforms (ACC1 and 2) and FA synthase (FAS) mRNA levels suggesting a PPAR γ -dependent activation of lipogenesis. On the other hand, glitazones increased carnitine palmitoyltransferase I (CPT-I) gene expression, with a more marked effect for ROSI and did not alter FA translocase (FAT/CD36) gene expression.

Interestingly, mRNA levels of PPAR α and of acyl-CoA oxidase, a direct target of PPAR α , were modified neither by ROSI nor PIO.

Discussion

PIO and ROSI are the two members of the TZDs class currently used for the treatment of type 2 diabetes. Although PIO and ROSI induced similar effects on glycemic control, it has been reported that PIO

is associated with significant improvements in lipid parameters *versus* ROSI [25,33]. A body of evidence suggests that both medications primarily act on adipose tissue through PPAR γ activation where they induce the release of adiponectin and limit that of free FA. Thus, it has been proposed that adiponectin could mediate part of the beneficial effects of TZDs [19]. Nevertheless, a direct action of these compounds on tissues other than adipose cannot be excluded. Thus, this study was undertaken to explore the possibility that PIO and ROSI treatments induce direct and specific effects on liver lipid metabolism. In this way, we comparatively tested the effects of PIO and ROSI on lipid metabolism in mouse liver explants. In Human, PIO and ROSI are administered daily respectively at 30 and 4 mg for type 2 diabetes therapy and clinical studies. In our experiments, tissue explants were treated with 1 $\mu\text{mol/L}$ of ROSI and 7.5 $\mu\text{mol/L}$ of PIO to mimic therapeutic doses and physiological concentration ranges [34,35].

In the present study, we showed that PIO decreased cholesterol content in liver explants. Hepatic cellular cholesterol levels are controlled by coordinated regulation of biosynthesis, uptake and secretion. The ability of TZDs to inhibit cholesterol synthesis in different cell types has been previously demonstrated by Wang *et al.* [36]. The authors reported that PIO and ROSI were only weak inhibitors of cholesterol synthesis and that the

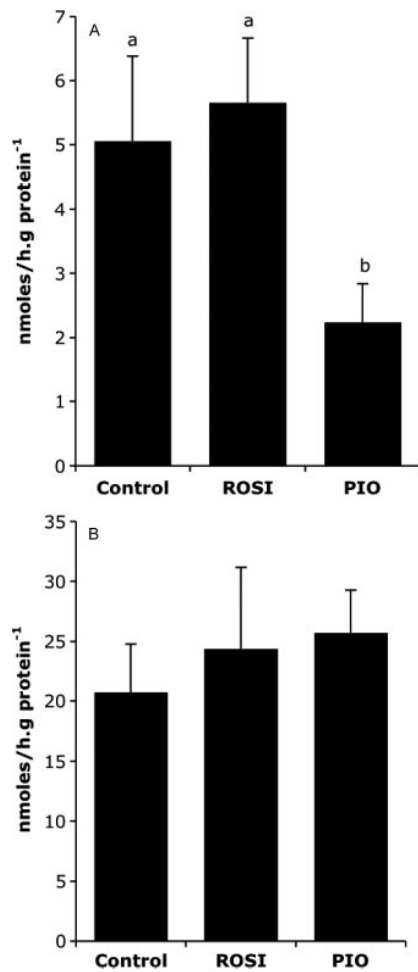


Figure 2. Hepatic lipase activity. Liver explants were first treated 21 h with either rosiglitazone (1 $\mu\text{mol/L}$), pioglitazone (7.5 $\mu\text{mol/L}$) or vehicle and incubated for two supplementary hours in the presence of 9,10[^3H]oleoyl-glycerol (1.67 mmol/L) as described in Materials and Methods section. Hepatic lipase activity was estimated from the radioactivity of [^3H]oleate released in the medium (A) and further incorporated in liver explants (B). Values are means \pm SEM ($n = 6$ per series). Columns that do not share a superscript letter differ ($p < 0.05$)

mechanisms of inhibition were independent of PPAR γ . In accordance, in our model of liver explants, both glitazones slightly reduced HMG-CoA reductase mRNA levels at the same degree suggesting that mechanisms underlying the reduction of cholesterol content in explants treated with PIO are not related to an inhibition of cholesterol biosynthesis but rather an alteration of cholesterol uptake. This concept is supported both by the reduction of HDL-CE uptake and by the reduction of HL activity observed

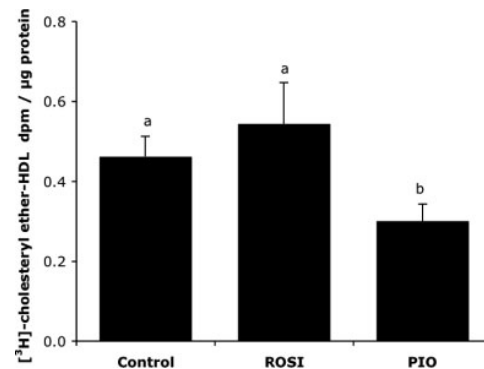


Figure 3. High-density lipoprotein-cholesteryl ether uptake. Liver explants were first treated 21 h with either rosiglitazone (1 $\mu\text{mol/L}$), pioglitazone (7.5 $\mu\text{mol/L}$) or vehicle and incubated for three supplementary hours in the presence of [^3H]cholesteryl ether-high-density lipoprotein (40 $\mu\text{g/mL}$) as described in Materials and Methods section. High-density lipoprotein-cholesteryl ether uptaken by the liver cells was represented by the radioactivity recovered in tissues. Values are means \pm SEM ($n = 3$ per series). Columns that do not share a superscript letter differ ($p < 0.05$)

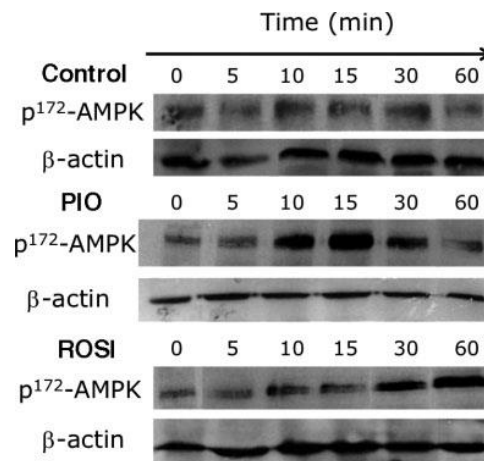


Figure 4. Immunoblot of phospho(p)-AMPK α . Liver explants were incubated from 0 to 1 h with either rosiglitazone (1 $\mu\text{mol/L}$), pioglitazone (7.5 $\mu\text{mol/L}$) or vehicle. Representative blots of phospho(p)-AMPK α and β -actin from two independent experiments

after PIO treatment. HL is involved at different steps of lipoprotein metabolism since it exerts both triglyceride lipase and phospholipase activities [37,38]. Thus, HL can catalyze the hydrolysis of phospholipids from HDL [37,38] and give rise to a remodelling of HDL favorable to cholesterol uptake by hepatocytes [39,40]. Thus, we may think that the alteration of HL activity induced by PIO may reduce cell cholesterol delivery, decrease

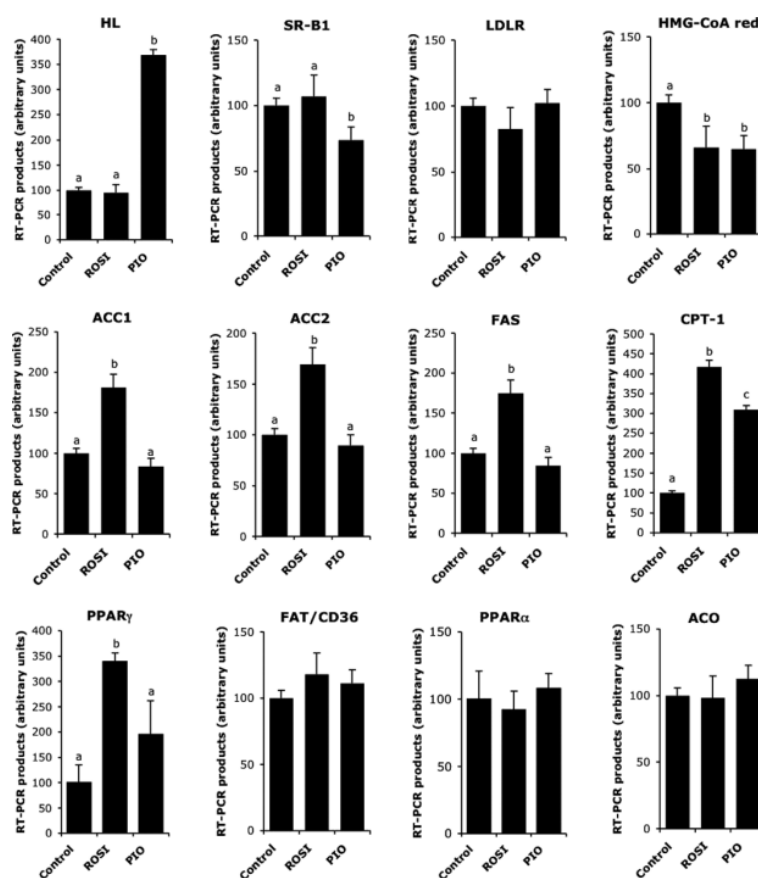


Figure 5. mRNA expression of genes involved in liver lipid metabolism. Liver explants were treated 21 h with either rosiglitazone (1 μ mol/L), pioglitazone (7.5 μ mol/L) or vehicle and used for real-time polymerase chain reaction analysis as described in Materials and Methods section. Values are means \pm SEM ($n = 4$ per series). Columns that do not share a superscript letter differ ($p < 0.05$)

cholesterol content and generate a compensatory effect on HL mRNA transcription. This consideration is in accordance with other works demonstrating the existence of an inverse relationship between HL expression and cellular cholesterol content [41]. In addition to its lipolytic activity, HL has been shown to exert a ligand-binding function towards HDL which may enhance the interaction of the lipoprotein with SR-BI, thus facilitating cholesterol uptake [42,43]. In our study, we show a reduction of SR-BI transcript levels induced by PIO which may also account for the decrease in cholesterol uptake by hepatocytes. The mechanism underlying the alteration of HL activity by PIO remains to be explored. As compared with ROSI, PIO reduces HL activity, decreases SR-BI expression and hepatic cholesterol uptake. Extrapolating these data to humans, these differences could explain the higher increase in plasma HDL-C in patients treated with PIO compared with those treated with ROSI.

Our data also support the notion of a distinct effect of these drugs on lipogenesis since only ROSI increased ACC1, ACC2 and FAS expression, cellular triglyceride content and apolipoprotein B secretion. In line with this, a recent pilot study indicated that PIO but not ROSI reduces hepatic *de novo* lipogenesis in subjects with type 2 diabetes mellitus [44].

As TZDs are potent PPAR γ activators in adipose tissue, it was reasonable to hypothesize that some of the effects induced by PIO and ROSI on liver may be mediated through PPAR γ activation. PPAR γ is expressed at low levels in the liver under physiological conditions [45]. Nevertheless, some studies have demonstrated that PPAR γ expression was induced in animal models of steatotic liver and associated with the transcriptional activation of lipogenic and adipogenic genes important for lipid accumulation [46–48]. In line with this, concomitant inductions of PPAR γ and lipogenic genes (ACC and

FAS) by ROSI are consistent with a stimulation of *de novo* lipogenesis involving a PPAR γ -dependent regulation process. The fact that FAT/CD36 was not modified by ROSI likely concurs with its dramatically low expression level in the liver of normal mice. Ectopic induction of FAT/CD36 occurs in the liver when cells are supplied with a high FA flux causing TG accumulation [31] suggesting a specific PPAR γ activation pathway that did not concern our model. Conversely, as PIO treatment did not modify the expression of PPAR γ and related genes, it can be reasoned that the effects of PIO on lipid metabolism are PPAR γ -independent. Our findings also suggest that the effects induced by both glitazones in liver explants were PPAR α -independent since the expression of PPAR α and acyl-CoA oxidase, a well-known PPAR α -responsive-gene [49] were unchanged.

In the same way as metformin, another antidiabetic drug, TZDs, may act at the junction of carbohydrate and lipid pathway, by activating the AMPK pathway [50]. Thus, TZDs have been shown to activate AMPK in mammalian tissues [32,51] inducing an activation of FA oxidation and a decrease in glycerolipid synthesis in association with a change in cellular energy state [52,53]. In accordance with these previous data, the present work indicates that both PIO and ROSI treatments gave rise to an increase in protein level of p-AMPK favourable to an inhibition of ACC activity resulting in a decrease in the concentration of malonyl-CoA, an allosteric inhibitor of the rate-limiting enzyme of mitochondrial beta-oxidation, CPT-I. PIO and ROSI also concomitantly induced CPT-I mRNA levels suggesting an increase in FA oxidation capacities. Nevertheless, it is not clear why activation of AMPK and induction of CPT-I gene expression were not associated with increased palmitate oxidation rates in liver explants. However, the capacity of PIO and ROSI to regulate carbohydrate-lipid metabolism pathways through AMPK appeared to be different. Thus, part of the molecular and metabolic changes induced by PIO might be consecutive to the stronger and faster activation of AMPK by this drug.

In summary, in addition to provide supporting evidence that TZDs exert direct effects on liver lipid metabolism, our findings demonstrate that PIO and ROSI differ in their actions. Of particular note is the impact of PIO on HL activity, SR-BI expression and HDL-C uptake which would result to an increase in HDL-C levels *in vivo*. Keeping in mind that the transposition of data from murine to human species remains questionable, we suggest that, compared to ROSI, PIO involves more direct hepatocellular mechanisms which could explain, at least in part, the significant improvements in triglyceridemia and HDL-C observed in diabetic patients treated with PIO.

Acknowledgements

The authors thank Prof Laurence Perségol for her helpful assistance with HDL preparation, Monique Baudoin for figure

construction and typing of the manuscript and Dr Chad Stroud for proofreading.

Conflict of interest

None declared.

References

1. Saltiel AR. New perspectives into the molecular pathogenesis and treatment of type 2 diabetes. *Cell* 2001; **104**: 517–529.
2. Yki-Jarvinen H. Thiazolidinediones. *N Engl J Med* 2004; **351**: 1106–1118.
3. Gurnell M, Wentworth JM, Agostini M, *et al.* A dominant-negative peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) mutant is a constitutive repressor and inhibits PPARgamma-mediated adipogenesis. *J Biol Chem* 2000; **275**: 5754–5759.
4. Hallakou S, Doare L, Foufelle F, *et al.* Pioglitazone induces *in vivo* adipocyte differentiation in the obese Zucker *fa/fa* rat. *Diabetes* 1997; **46**: 1393–1399.
5. Castelein H, Gulick T, Declercq PE, Mannaerts GP, Moore DD, Baes MI. The peroxisome proliferator activated receptor regulates malic enzyme gene expression. *J Biol Chem* 1994; **269**: 26754–26758.
6. Tontonoz P, Hu E, Spiegelman BM. Regulation of adipocyte gene expression and differentiation by peroxisome proliferator activated receptor gamma. *Curr Opin Genet Dev* 1995; **5**: 571–576.
7. Yamauchi T, Kadowaki T. The molecular mechanisms by which PPAR gamma/RXR inhibitors improve insulin resistance. *Nippon Rinsho* 2001; **59**: 2245–2254.
8. Saltiel AR, Olefsky JM. Thiazolidinediones in the treatment of insulin resistance and type II diabetes. *Diabetes* 1996; **45**: 1661–1669.
9. Berger J, Moller DE. The mechanisms of action of PPARs. *Annu Rev Med* 2002; **53**: 409–435.
10. Sharma AM, Staels B. Review: peroxisome proliferator-activated receptor gamma and adipose tissue—understanding obesity-related changes in regulation of lipid and glucose metabolism. *J Clin Endocrinol Metab* 2007; **92**: 386–395.
11. Ye JM, Frangioudakis G, Iglesias MA, *et al.* Prior thiazolidinedione treatment preserves insulin sensitivity in normal rats during acute fatty acid elevation: role of the liver. *Endocrinology* 2002; **143**: 4527–4535.
12. Kim HJ, Jung TW, Kang ES, *et al.* Depot-specific regulation of perilipin by rosiglitazone in a diabetic animal model. *Metabolism* 2007; **56**: 676–685.
13. Lessard SJ, Rivas DA, Chen ZP, *et al.* Tissue-specific effects of rosiglitazone and exercise in the treatment of lipid-induced insulin resistance. *Diabetes* 2007; **56**: 1856–1864.
14. Unger RH. Lipotoxic diseases. *Annu Rev Med* 2002; **53**: 319–336.
15. Bajaj M, Suraamornkul S, Pratipanawatr T, *et al.* Pioglitazone reduces hepatic fat content and augments splanchnic glucose uptake in patients with type 2 diabetes. *Diabetes* 2003; **52**: 1364–1370.
16. Mayerson AB, Hundal RS, Dufour S, *et al.* The effects of rosiglitazone on insulin sensitivity, lipolysis, and hepatic and skeletal muscle triglyceride content in patients with type 2 diabetes. *Diabetes* 2002; **51**: 797–802.
17. De Vos P, Lefebvre AM, Miller SG, *et al.* Thiazolidinediones repress *ob* gene expression in rodents via activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *J Clin Invest* 1996; **98**: 1004–1009.
18. Kallen CB, Lazar MA. Antidiabetic thiazolidinediones inhibit leptin (*ob*) gene expression in 3T3-L1 adipocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; **93**: 5793–5796.
19. Kubota N, Terauchi Y, Kubota T, *et al.* Pioglitazone ameliorates insulin resistance and diabetes by both adiponectin-dependent and -independent pathways. *J Biol Chem* 2006; **281**: 8748–8755.
20. Maeda N, Takahashi M, Funahashi T, *et al.* PPARgamma ligands increase expression and plasma concentrations of adiponectin, an adipose-derived protein. *Diabetes* 2001; **50**: 2094–2099.

21. Guerre-Millo M. Adiponectin: an update. *Diabetes Metab* 2008; **34**: 12–18.
22. Kintscher U, Law RE. PPARgamma-mediated insulin sensitization: the importance of fat versus muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2005; **288**: E287–E291.
23. Hevener AL, He W, Barak Y, et al. Muscle-specific Pparg deletion causes insulin resistance. *Nat Med* 2003; **9**: 1491–1497.
24. Norris AW, Chen L, Fisher SJ, et al. Muscle-specific PPARgamma-deficient mice develop increased adiposity and insulin resistance but respond to thiazolidinediones. *J Clin Invest* 2003; **112**: 608–618.
25. Goldberg RB, Kendall DM, Deeg MA, et al. A comparison of lipid and glycemic effects of pioglitazone and rosiglitazone in patients with type 2 diabetes and dyslipidemia. *Diabetes Care* 2005; **28**: 1547–1554.
26. Cox PJ, Ryan DA, Hollis FJ, et al. Absorption, disposition, and metabolism of rosiglitazone, a potent thiazolidinedione insulin sensitizer, in humans. *Drug Metab Dispos* 2000; **28**: 772–780.
27. Folch J, Lees M, Sloane-Stanley GH. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem* 1957; **226**: 497–509.
28. Degrace P, Demizieux L, Gresti J, Chardigny JM, Sebedio JL, Clouet P. Hepatic steatosis is not due to impaired fatty acid oxidation capacities in C57BL/6J mice fed the conjugated trans-10,cis-12-isomer of linoleic acid. *J Nutr* 2004; **134**: 861–867.
29. Iverius PH, Ostlund-Lindqvist AM. Preparation, characterization, and measurement of lipoprotein lipase. *Methods Enzymol* 1986; **129**: 691–704.
30. Persegol L, Verges B, Foissac M, Gamber P, Duvillard L. Inability of HDL from type 2 diabetic patients to counteract the inhibitory effect of oxidized LDL on endothelin-dependent vasorelaxation. *Diabetologia* 2006; **49**: 1380–1386.
31. Degrace P, Moindrot B, Mohamed I, et al. Upregulation of liver VLDL receptor and FAT/CD36 expression in LDLR-/-apob100/100 mice fed trans-10,cis-12 conjugated linoleic acid. *J Lipid Res* 2006; **47**: 2647–2655.
32. LeBrasseur NK, Kelly M, Tsao TS, et al. Thiazolidinediones can rapidly activate AMP-activated protein kinase in mammalian tissues. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2006; **291**: E175–E181.
33. Chiquette E, Ramirez G, Defronzo R. A meta-analysis comparing the effect of thiazolidinediones on cardiovascular risk factors. *Arch Intern Med* 2004; **164**: 2097–2104.
34. Chu KM, Hu OY, Pao LH, Hsiong CH. Pharmacokinetics of oral rosiglitazone in Taiwanese and post hoc comparisons with Caucasian, Japanese, Korean, and mainland Chinese subjects. *J Pharm Pharm Sci* 2007; **10**: 411–419.
35. Wittayalerpanya S, Chompootaweep S, Thaworn N. The pharmacokinetics of pioglitazone in Thai healthy subjects. *J Med Assoc Thai* 2006; **89**: 2116–2122.
36. Wang M, Wise SC, Leff T, Su TZ. Troglitazone, an antidiabetic agent, inhibits cholesterol biosynthesis through a mechanism independent of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. *Diabetes* 1999; **48**: 254–260.
37. Groot PH, Jansen H, Van Tol A. Selective degradation of the high density lipoprotein-2 subfraction by heparin-releasable liver lipase. *FEBS Lett* 1981; **129**: 269–272.
38. Kuusi T, Saarinen P, Nikkila EA. Evidence for the role of hepatic endothelial lipase in the metabolism of plasma high density lipoprotein2 in man. *Atherosclerosis* 1980; **36**: 589–593.
39. Jansen H, van Tol A, Hulsmann WC. On the metabolic function of heparin-releasable liver lipase. *Biochem Biophys Res Commun* 1980; **92**: 53–59.
40. Kadowaki H, Patton GM, Robins SJ. Metabolism of high density lipoprotein lipids by the rat liver: evidence for participation of hepatic lipase in the uptake of cholesteryl ester. *J Lipid Res* 1992; **33**: 1689–1698.
41. Perret B, Mabille L, Martinez L, Terce F, Barbaras R, Collet X. Hepatic lipase: structure/function relationship, synthesis, and regulation. *J Lipid Res* 2002; **43**: 1163–1169.
42. Bengtsson G, Olivecrona T. The hepatic heparin releasable lipase binds to high density lipoproteins. *FEBS Lett* 1980; **119**: 290–292.
43. Lambert G, Chase MB, Dugi K, Bensadoun A, Brewer HB Jr, Santamarina-Fojo S. Hepatic lipase promotes the selective uptake of high density lipoprotein-cholesteryl esters via the scavenger receptor B1. *J Lipid Res* 1999; **40**: 1294–1303.
44. Beysen C, Murphy EJ, Nagaraja H, et al. A pilot study of the effects of pioglitazone and rosiglitazone on de novo lipogenesis in type 2 diabetes. *J Lipid Res* 2008; **49**: 2657–2663.
45. Vidal-Puig AJ, Considine RV, Jimenez-Linan M, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor gene expression in human tissues. Effects of obesity, weight loss, and regulation by insulin and glucocorticoids. *J Clin Invest* 1997; **99**: 2416–2422.
46. Gavrilova O, Haluzik M, Matsusue K, et al. Liver peroxisome proliferator-activated receptor gamma contributes to hepatic steatosis, triglyceride clearance, and regulation of body fat mass. *J Biol Chem* 2003; **278**: 34268–34276.
47. Schadinger SE, Bucher NL, Schreiber BM, Farmer SR. PPARgamma2 regulates lipogenesis and lipid accumulation in steatotic hepatocytes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2005; **288**: E1195–E1205.
48. Yu S, Matsusue K, Kashireddy P, et al. Adipocyte-specific gene expression and adipogenic steatosis in the mouse liver due to peroxisome proliferator-activated receptor gamma1 (PPARgamma1) overexpression. *J Biol Chem* 2003; **278**: 498–505.
49. Frederiksen KS, Wulff EM, Sauerberg P, Mogensen JP, Jeppesen L, Fleckner J. Prediction of PPAR-alpha ligand-mediated physiological changes using gene expression profiles. *J Lipid Res* 2004; **45**: 592–601.
50. Zhou G, Myers R, Li Y, et al. Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. *J Clin Invest* 2001; **108**: 1167–1174.
51. Saha AK, Avilucea PR, Ye JM, Assifi MM, Kraegen EW, Ruderman NB. Pioglitazone treatment activates AMP-activated protein kinase in rat liver and adipose tissue in vivo. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; **314**: 580–585.
52. Muoio DM, Seefeld K, Witters LA, Coleman RA. AMP-activated kinase reciprocally regulates triacylglycerol synthesis and fatty acid oxidation in liver and muscle: evidence that sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase is a novel target. *Biochem J* 1999; **338**(Pt 3): 783–791.
53. Winder WW, Hardie DG. AMP-activated protein kinase, a metabolic master switch: possible roles in type 2 diabetes. *Am J Physiol* 1999; **277**: E1–10.

RESUME

La gustation est une composante essentielle de la détection oro-sensorielle des lipides alimentaires. La liaison des AGLC sur le récepteur CD36 joue un rôle prépondérant dans cette lipido-détection orale chez la souris et très probablement chez l'Homme. En effet, elle intervient dans le choix alimentaire (sensibilité aux lipides) ainsi que dans la préparation de l'organisme à l'arrivée de lipides. Ce « sensing » oral des lipides est fortement régulé. Comme l'obésité semble être responsable d'une altération de la détection des saveurs primaires, l'objectif de cette thèse a été d'explorer si l'obésité peut également être à l'origine de perturbations de la détection orale des lipides à la fois chez l'Homme et chez la souris. Nos résultats chez l'Homme indiquent qu'il existe une altération de la lipido-détection orale chez certains sujets obèses. Nous avons montré que ces derniers présentaient une consommation accrue en lipides. De plus, la sécrétion précoce de triglycérides plasmatiques induite par une stimulation orale observée chez les sujets minces n'est plus reproduite chez les sujets obèses. Chez la souris, il a été montré que l'obésité provoque une diminution de la sensibilité gustative aux lipides alimentaires. Ce phénomène est la conséquence d'une dérégulation de la signalisation calcique CD36-dépendante au niveau des cellules gustatives. Chez ces animaux, la stimulation orale lipidique entraîne, comme chez l'Homme, une augmentation transitoire de la triglycéridémie qui pourrait être responsable d'une réduction de la taille du repas (rassasiement). En conclusion, l'obésité affecte la lipido-détection orale chez l'Homme et la souris. Le défaut de détection des lipides alimentaires associé à l'abolition de la sécrétion précoce de triglycérides plasmatiques chez les sujets obèses pourrait être à l'origine d'une perturbation de la régulation de la prise alimentaire, entraînant une surconsommation d'aliments riches en lipides et renforçant ainsi l'obésité.

Mots-clés : Obésité, goût, préférence, lipides, régulation, CD36, souris, Homme.

Gustation is an essential parameter in the oro-sensory detection of dietary lipids. In mice and most likely in humans, the binding of long-chain fatty acids to the CD36 receptor plays a major role in this oral fat detection. Gustation is involved in the food choice (fat sensitivity) as well as in the preparation of the body to the fat inflow. This oral lipid sensing is highly regulated. As obesity seems to be responsible for an alteration of the basic tastes detection, the aim of this thesis was to investigate whether obesity can impair the oral lipid detection in both mice and humans. In humans, our data show that there is an alteration of the oral fat detection in some obese subjects who have a higher lipid consumption than the other subjects. Besides, an early secretion of plasma triglycerides induced by an oral fat stimulation was observed in lean subjects but not in obese ones. In mice, a decrease in the dietary lipids taste sensitivity was shown to be caused by obesity. This is the consequence of a deregulation of the CD36-dependent calcium signalling in taste cells. In these mice, as in humans, the oral fat stimulation leads to a temporary increase in the blood triglyceride level which might be responsible for a reduced meal size (satiety). To conclude, obesity impairs oral lipid detection in both mice and humans. An altered dietary fat detection associated with an abolition of the early secretion of plasma triglycerides in obese people might induce an impaired regulation of the food intake, leading to an overconsumption of lipid-rich foods, and so a reinforcement of obesity.

Keywords: Obesity, taste, preference, lipids, regulation, CD36, mouse, Human.