



La viscérosensibilité chimique intestinale: Mécanismes et implications dans le contrôle de la prise alimentaire chez le rat

Nicolas Darcel

► To cite this version:

Nicolas Darcel. La viscérosensibilité chimique intestinale: Mécanismes et implications dans le contrôle de la prise alimentaire chez le rat. Life Sciences [q-bio]. INAPG (AgroParisTech), 2005. English. NNT : 2005INAP0010 . pastel-00003115

HAL Id: pastel-00003115

<https://pastel.hal.science/pastel-00003115>

Submitted on 20 Nov 2007

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



INSTITUT NATIONAL AGRONOMIQUE PARIS-GRIGNON
ECOLE DOCTORALE ABIES

Rapport de THÈSE

pour l'obtention du diplôme de:

Docteur de l'Institut National Agronomique Paris-Grignon

présentée et soutenue par

Nicolas Darcel

novembre 2005

**La viscérosensibilité chimique intestinale:
Mécanismes et implications dans le contrôle de la
prise alimentaire chez le rat**

Doctorat effectué sous la direction de

Helen Raybould (UC Davis)

Daniel Tomé (INA-PG)

Daniel Tomé	Président du jury
André Bado	Rapporteur
Olivier Rampin	Rapporteur
Frédéric Marion-Poll	Examineur
Gilles Fromentin	Examineur

Résumé

INTRODUCTION : S'il est fortement pressenti que la viscerosensibilité chimique intestinale, c'est-à-dire la détection des macronutriments dans le contenu intestinal est un des paramètres clé de la régulation de la prise alimentaire pendant la digestion, nos connaissances sur ces phénomènes sont encore très fragmentaires. On ignore notamment les mécanismes précis responsables de la détection des nutriments dans l'intestin et les modalités de transmission (nerveuse ou humorale) des signaux ainsi générés vers les centres de régulation du comportement alimentaire. OBJECTIF : L'objet de ces travaux a été de préciser les mécanismes de la détection des nutriments dans l'intestin et de déterminer l'implication du nerf vague dans la transmission des informations de la viscerosensibilité chimique intestinale vers le système nerveux central. RESULTATS : Les résultats obtenus ici confirment le modèle selon lequel l'intestin peut être perçu comme un organe sensoriel capable, pendant la digestion, de détecter la présence de certains macronutriments. Le nerf vague participe activement à la transmission de l'information générée au niveau de l'intestin vers le système nerveux central. CONCLUSIONS : Le système viscérosensoriel chimique intestinal est une composante sensorielle à part entière qui exerce un puissant rôle dans le contrôle de la prise alimentaire. Les avancées dans la compréhension de ces mécanismes et de leur rôle dans l'homéostasie énergétique ouvriront sans nul doute de nouvelles voies dans le développement de thérapies contre l'obésité.

Mots clés : Prise alimentaire, intestin grêle, CCK, nerf vague, cerveau, cellules entéroendocrines.

Abstract

INTRODUCTION: Although, the implication of intestinal chemosensitivity in the control of food intake is now widely accepted, its precise mechanisms and its modalities of communication with the central nervous system remain poorly understood. OBJECTIVE: the aim of this study was to refine our understanding of nutrient detection within the intestine and to determine the involvement of vagal pathways in the transfer of visceral information from the gastrointestinal tract to the brain. RESULTS: the present study supports the hypothesis proposing that the intestine can be considered also as a sensory organ. It also appeared that the vagus nerve does play a role in transmitting visceral information to the brain. CONCLUSIONS: Vagally mediated intestinal chemosensitivity should be regarded as a sensory system having a strong influence on food intake control. Understanding its implications in energy homeostatic control will undoubtedly lead to develop new therapies to fight the present obesity epidemics.

Keywords: food intake, small intestine, CCK, vagus nerve, brain, enteroendocrine cells.

Remerciements:

Je remercie tout d'abord, les institutions qui ont assuré mon financement au cours de ces trois années de thèse. Merci, à la Société Française de Nutrition, à l'école doctorale ABIES et au département d'Anatomie de Physiologie et de Biologie Cellulaire de l'Université de Californie à Davis.

First of all I would like to thank, the three institutions that provided me with financial support along these 3 years. Therefore I thank "la Société Française de Nutrition" ABIES graduate school and The University of California at Davis, Especially the Department of Anatomy Physiology and Cell Biology of the School of Veterinary Medicine.

Je tiens à remercier très chaleureusement le Docteur Helen Raybould, pour m'avoir accueilli dans son laboratoire à UC Davis. J'ai beaucoup apprécié de travailler dans son laboratoire, Helen est autant un chercheur de très grande qualité qu'elle est une personne très agréable et sympathique. J'ai gardé un excellent souvenir de mon passage dans son laboratoire.

I would like to thank warmly Dr Helen Raybould, for having invited me to work for two years in her laboratory, I loved working in her lab. Helen is both a terrific scientist and a fantastic person to know. I loved working for her. It was a real pleasure to work with Helen.

Merci au Pr. Daniel Tomé et au Dr Gilles Fromentin pour m'avoir accueilli dans leur unité, suivi et soutenu au cours de cette thèse depuis mon stage de DEA jusqu'aux dernières corrections. Sans eux rien n'aurait été possible. C'est un plaisir de travailler avec eux. Tous deux ont multiplié leurs efforts pour me permettre de réaliser ce doctorat dans de bonnes conditions.

Thank you to Pr Daniel Tomé and Dr Gilles Fromentin for supporting me from the very beginning of my research work until the very last remarks on the thesis. They worked hard to provide me with a good environment to realise this work.

Merci à tout mes collaborateurs aux États Unis avec qui j'ai travaillé pour cette thèse. Merci à: Alice Liou, Melissa Valdellon, Diana Chavez, Jim Sharp, Donia Bohan, Adam Rechs, Samara Freeman, Kellie Whited, Tim Hayes, Gabriel Paulino, Florence Milhas and Jock Hamilton.

I would like to thank my collaborators in the US: Alice Liou, Melissa Valdellon, Diana Chavez, Jim Sharp, Donia Bohan, Adam Rechs, Samara Freeman, Kellie Whited, Tim Hayes, Gabriel Paulino, Florence Milhas and Jock Hamilton. (please forgive me I probably forgot to include many people)

Merci à mes collaborateurs en France avec qui j'ai réalisé les travaux de cette thèse. Merci à: Syvette Gougis, Marie-Jeanne Prud'homme, Benjamin Guesdon, et l'ensemble de l'unité INRA 914.

I would like to thank my collaborators in France: Syvette Gougis, Marie-Jeanne Prud'homme, Benjamin Guesdon, and all my labmates from unité INRA 914.

Merci beaucoup au Dr Dorothy Gietzen, grâce à qui tout a commencé, qui s'est toujours montrée disponible et dont les conseils m'ont été fort utiles lors de mon séjour aux États Unis. Le Dr Gietzen est un chercheur qui impose le respect mais c'est aussi une personne très agréable et chaleureuse.

Many thanks to Dr Dorothy Gietzen, without whom nothing would have been possible, Dr Gietzen has always been a very good advisor along these years in the US. Dr Gietzen is not only a very good scientist she is also a very nice person.

Le Dr John Horowitz a aussi très fortement marqué ces trois années de thèse. Je lui suis infiniment reconnaissant. Le Dr Horowitz est un de ces scientifiques passionnés comme on en rencontre rarement. J'ai énormément appris avec lui.

Dr Horowitz is together with Dr Raybould and Dr Gietzen the scientist who influenced me the most over the last three years, I am infinitely thankful to him, Dr Horowitz is one of these passionate scientists one rarely meet, I learned a lot working with him.

Enfin merci à mes proches, ma famille et mes amis...

Many thanks to my relatives, friends and family...

Table des matières

Table des matières.....	5
Table des illustrations et figures.....	10
Enjeux.....	13
.....	13
De l'intérêt de comprendre les bases neurophysiologiques du comportement alimentaire.....	13
Principes et fondements de la science du comportement alimentaire.....	14
L'obésité, un problème global majeur de santé publique	14
Vers une lutte thérapeutique contre l'obésité.....	15
Introduction.....	16
Le comportement alimentaire, définitions, principes de base, approche expérimentale et mécanismes biologiques de contrôle	16
Régulation du poids corporel et comportement alimentaire.....	17
Définitions du comportement alimentaire.....	20
Les différentes composantes du comportement alimentaire	20
Principes de base du contrôle du comportement alimentaire	23
Le contrôle du comportement alimentaire.....	23
Le comportement alimentaire est influencé par de nombreux facteurs	25
Deux déterminants principaux dirigent le comportement alimentaire	27
Les mécanismes du contrôle du comportement alimentaire.....	28
L'hypothalamus: le chef d'orchestre du comportement alimentaire.....	28
Présentation de l'hypothalamus.....	29
Le système mélanocortine central.....	32
Le système mélanocortine central hypothalamique.....	33
Le système mélanocortine central hypothalamique est influencé par la disponibilité en énergie et par les informations émises au cours des repas.	36
Gestion des réserves en énergie à long terme: influence de la disponibilité en énergie sur le fonctionnement du système mélanocortine central hypothalamique: exemple de la leptine et de l'insuline.....	36
Action immédiate de signaux digestifs sur le système mélanocortine central hypothalamique pendant la digestion: exemple de la ghréline.....	39
Le système mélanocortine central hypothalamique, un processeur central du comportement alimentaire....	39
Le système mélanocortine central du tronc cérébral.....	40
L'axe tube digestif-cerveau et le contrôle de l' ingestion pendant la digestion	46
Le tube digestif sous surveillance	46
L'innervation du tractus digestif	48
La détection des nutriments dans l'intestin et la génération de signaux anorexigènes depuis le tube digestif ..	54
Principes généraux de la détection de macronutriments dans la lumière intestinale.....	54
Exemple de la CCK	55
Présentation des études	57
Enjeux: Intéroception intestinale et comportement alimentaire.....	58
L'étude des mécanismes biologiques précis de la détection des macronutriments dans l'intestin	61
Implications de la sensibilité viscérale dans le contrôle de la prise alimentaire et plasticité à long terme du système intéroceptif.....	62

Première Partie:	63
Mécanismes cellulaires et moléculaires responsables de la détection du glucose dans l'intestin au cours de la digestion	63
Introduction	64
La détection du glucose dans l'intestin	65
Rôle de la sérotonine	65
Implication des transporteurs membranaires du glucose	68
Etude 1: Caractérisation du transporteur impliqué dans la détection du glucose dans l'ingesta, approche électrophysiologique	69
Introduction	69
Matériels et méthodes	71
Animaux et préparations de solutions	71
Enregistrement des décharges spontanées des afférences vagales	72
Analyse des enregistrements	72
Enregistrement des décharges spontanées des afférences vagales en réponse à la perfusion de glucose et de galactose	73
Résultats	74
Discussion	75
Perspectives	76
Etude 2: Les mécanismes cellulaires responsables de l'induction de la libération de sérotonine par les cellules entéroendocrines lors de l'action du glucose sur le transporteur de glucose SGLT3.	77
Introduction	77
Biologie cellulaire de la libération de médiateurs	77
Deux mécanismes possibles pour la libération de sérotonine induite par la présence de glucose	78
Objectif de l'étude	81
Présentation de la démarche expérimentale	83
Matériel et méthodes	83
Culture de cellules	83
Solutions	84
Enregistrement du potentiel transmembranaire par la technique du patch clamp	85
Protocole expérimental	86
Résultats	86
Cellules de type BON	86
Cellules de type STC1	86
Discussion	90
Conclusion sur les mécanismes cellulaires de la détection du glucose dans l'intestin.	92
Deuxième Partie:	94
Mécanismes cellulaires responsables de la détection des acides gras à chaîne longue dans l'intestin au cours de la digestion	94
Introduction	95
La détection des acides gras par l'organisme	95
Les mécanismes de détection des acides gras à chaîne longue dans l'intestin, au cours de la digestion.	96
Apo A-IV et détection des acides gras à chaîne longue	99
Par quelles voies l'apo A-IV influence-t-elle le comportement alimentaire et le fonctionnement digestif?	100

Étude 3: Evaluation du rôle des afférences vagales dans la détection des acides gras à chaîne longue.....	102
.....	102
Résumé de l'article	102
Discussion.....	103
Action directe ou libération de CCK.....	105
De l'apo A-IV à la libération de CCK par les cellules entéroendocrines.....	105
Conclusion.....	106
Article: Glatzle J, Darcel N, Rechs AJ, Kalogeris TJ, Tso P and Raybould HE. Apolipoprotein A-IV stimulates duodenal vagal afferent activity to inhibit gastric motility via a CCK1 pathway. 107	
Troisième Partie:.....	114
Mécanismes cellulaires responsables de la détection des oligopeptides dans l'intestin au cours de la digestion	114
Introduction.....	115
De l'intérêt de détecter la présence et la disponibilité des protéines	115
Les stratégies mises en place par l'organisme pour s'informer de la disponibilité en protéines et/ou en acides aminés sont nombreuses.....	116
Les protéines alimentaires sont détectées lors de leur absorption dans l'intestin.....	116
Les mécanismes de la détection des protéines dans l'intestin.....	117
Les hypothèses proposées pour la détection des protéines dans l'intestin.....	118
L'activité de PEPT1 au cours de la digestion initie-t-elle la détection des oligopeptides dans l'intestin ?.....	120
Étude 4: Détermination du rôle du transporteur d'oligopeptides PEPT1 dans la détection des oligopeptides du contenu digestif	121
Résumé de l'étude	121
Discussion.....	121
Relation entre activité de PEPT1 et libération de CCK.....	123
Comment l'activité de PEPT1 peut-elle générer un signal cellulaire ?.....	123
Où est localisé PEPT1 ?	125
Conclusion	128
Article: Darcel NP, Liou AP, Tome D and Raybould HE. Activation of vagal afferents in the rat duodenum by protein digests requires PepT1.....129	
Quatrième partie:	135
Implication du nerf vague dans le contrôle de la prise alimentaire par la détection des protéines dans l'intestin.....	135
Étude 5: Effets d'un régime hyper-protéique sur l'activation des régions du système nerveux central impliquées dans la régulation de la balance énergétique.....	136
Introduction	136
Description de l'étude	138
Dicussion.....	141
Conclusion.....	142
Article: Darcel N, Fromentin G, Raybould HE, Gougis S, Gietzen DW and Tome D. Fos-positive neurons are increased in the nucleus of the solitary tract and decreased in the ventromedial hypothalamus and amygdala by a high-protein diet in rats.....143	

<u>Étude 6: Participation du nerf vague à la satiété induite par les protéines alimentaires.....</u>	<u>149</u>
<u>Introduction.....</u>	<u>150</u>
<u>Objet de l'étude.....</u>	<u>151</u>
<u>Méthodes</u>	<u>151</u>
Principes	151
Animaux.....	152
Traitement à la capsaïcine.....	153
Traitement statistique.....	156
<u>Résultats.....</u>	<u>156</u>
Suivi des traitements	156
Prise alimentaire	156
Prise de poids	157
<u>Conclusion générale.....</u>	<u>163</u>
Vers une physiologie intégrative	166
Nos résultats et les modèles que nous proposons	167
Perspectives	172
<u>Annexes.....</u>	<u>174</u>
Annexe 1: Enregistrement de l'activité spontanée des afférences vagales à partir d'une préparation isolée de duodénum:.....	175
Annexe 2: Le patch clamp	178
Annexe 3: Le c-fos, un marqueur de l'activation des neurones.....	181
Annexe 4: Capsaïcine et excitotoxicité	186
Annexe 5: Publications et communications	188
Annexe 7: Glossaire.....	222
<u>Références bibliographiques.....</u>	<u>233</u>

Table des illustrations et figures

Figure 1: La régulation du poids corporel	19
Figure 2: les différentes phases du comportement alimentaire.....	22
Figure 3: modélisation basique d'un comportement, le schéma entrées-intégration-sorties.....	24
Figure 4: Les facteurs influençant le comportement alimentaire.....	26
Figure 5: Localisation de l'hypothalamus (homme).....	30
Figure 6: Localisation de l'hypothalamus (Rat).....	30
Figure 7: Localisation de l'hypothalamus (Rat).....	31
Figure 8: Localisation des principaux noyaux de l'hypothalamus impliqués dans l'homéostasie énergétique.....	31
Figure 9: Fonctionnement du système mélanocortine hypothalamique.....	35
Figure 10: La leptine comme indicateur des réserves en énergies.....	37
Figure 11: Influence de la leptine sur le système mélanocortine hypothalamique.....	38
Figure 12: Le Noyau du Faisceau Solitaire.....	41
Figure 13: Facteurs influençant l'activité du Noyau du Tractus Solitaire.....	44
Figure 14: Surveillance du tube digestif par le nerf vague.....	45
Figure 15: L'axe tube digestif cerveau, principe de fonctionnement.....	47
Figure 16: L'axe tube digestif cerveau, surveillance du tube digestif par le système nerveux autonome.....	50
Figure 17: Les modalités de l'innervation de l'intestin par le nerf vague.....	53
Figure 18: La détection des nutriments dans l'intestin.....	56
Figure 19: Les questions.....	60
Figure 20: Principe général de la détection du glucose dans l'intestin.....	67
Figure 21: Deux candidats pour la détection des glucides simples dans l'intestin.....	70
Table 1 Résultats de l'enregistrement électrophysiologique de l'activité du nerf vague.....	74
Figure 22: La détection du glucose par les cellules bêta du pancréas.....	80
Figure 23: Deux Hypothèses pour la détection du glucose par les CEECs de l'intestin.....	82
Table 2: Paramètres d'acquisition des enregistrements de patch clamp.....	87
Table 3: résultats des expériences de patch clamp.....	88
Figure 24: Effet du glucose sur le potentiel transmembranaire de deux types de cellules entéroendocrines.....	89
Figure 25: Mécanisme proposé de la détection du glucose dans l'intestin.....	93
Figure 26: La détection des acides gras à chaîne longue au cours de la digestion	98
Figure 27: modalités d'action de l'APO A-IV.....	101
Figure 28: Comment l'apo A-IV agit-elle sur le nerf vague?.....	104
Figure 29: La détection des protéines alimentaires au cours de la digestion.....	122
Figure 30: Co-localisation de PEPT1 et de la CCK dans une crypte intestinale d'un duodénum de rat.....	126

<i>Figure 31: Une hypothèse alternative pour la détection des protéines alimentaires au cours de la digestion.....</i>	<i>127</i>
<i>Figure 32: Résumé des activations observées dans le cerveau en réponse à une charge protéique.</i>	<i>140</i>
<i>Table 4: Composition des régimes expérimentaux (poudres).....</i>	<i>155</i>
<i>Figure 33: Une déafférentation ne modifie pas la consommation d'un régime hyper-protéique.....</i>	<i>158</i>
<i>Figure 34: Une déafférentation augmente le gain de poids chez des rats soumis à un régime HP.</i>	<i>159</i>
<i>Figure 35: Hypothèse: mécanisme général de la détection des macronutriments au cours de la digestion.....</i>	<i>169</i>
<i>Figure A: Préparation électrophysiologique.....</i>	<i>177</i>
<i>Figure B: Principe du patch clamp en mode « current clamp » et en configuration « cellule entière ».....</i>	<i>180</i>
<i>Figure C: exemple des mécanismes de l'induction du gène c-fos dans les neurones du NTS.....</i>	<i>183</i>
<i>Figure D: exemple d'expression de c-fos dans le NTS.</i>	<i>184</i>
<i>Figure E: expression relative de c-fos dans le temps.....</i>	<i>185</i>
<i>Figure F: Le récepteur VR-1.....</i>	<i>187</i>

Enjeux

De l'intérêt de comprendre les bases neurophysiologiques du comportement alimentaire.

Principes et fondements de la science du comportement alimentaire

Nombre de travaux récents indiquent que le poids corporel est un paramètre biologique important, voire déterminant pour la santé humaine (2) . Par exemple, il est désormais admis que surpoids et obésité ont des conséquences délétères sur la santé humaine. Un poids corporel excessif augmente la prévalence de pathologies telles que les diabètes de type 2, les maladies cardiovasculaires ou certains cancers. Les facteurs influençant le poids corporel sont donc perçus comme autant de cibles thérapeutiques probables dans la lutte contre ces pathologies.

L'obésité, un problème global majeur de santé publique

La prévalence du surpoids et de l'obésité augmente partout dans le monde à un rythme inquiétant. Les pays riches comme les pays pauvres sont touchés. En outre, comme ce problème semble progresser rapidement aussi bien chez l'enfant que chez l'adulte, ses conséquences réelles pour la santé risquent de n'apparaître dans toute leur ampleur que dans le futur.

Les conséquences de l'obésité pour la santé sont nombreuses et variées, allant d'un risque accru de décès prématuré à des maladies non mortelles ayant des effets indésirables sur la qualité de la vie. Parmi les conséquences les plus notables du surpoids et de l'obésité pour la santé, le diabète, l'augmentation des risques de maladies cardiovasculaires et l'augmentation des risques d'apparition de certains

cancers sont les plus souvent cités. Par exemple, en 2000, surpoids et obésité étaient tenus pour responsables de près de 17% des décès aux Etats-Unis. Par voie de conséquence, les dépenses de santé liées à l'obésité représentent jusqu'à 7% des dépenses de santé globales dans certains pays, et ce chiffre ne fait malheureusement qu'augmenter.

Vers une lutte thérapeutique contre l'obésité

Elaborer des stratégies thérapeutiques efficaces pour lutter contre la survenue du surpoids et de l'obésité est donc devenu une priorité de la communauté scientifique internationale. S'il est largement reconnu que l'obésité a pour origine principale une alimentation pléthorique, il est aussi clair que l'obésité survient parce que les processus physiologiques en jeu dans la régulation du poids corporel fonctionnent mal. Parmi ces processus physiologiques, la prise alimentaire semble jouer un rôle de tout premier ordre, obésité et surpoids ayant en effet très souvent pour origine un apport énergétique excessif. Malheureusement, notre compréhension des mécanismes qui contrôlent le comportement alimentaire est encore très fragmentaire. Pourtant la compréhension de ces processus offrirait sans nul doute nombre de précieuses cibles thérapeutiques.

Si on sait aujourd'hui que le cerveau orchestre le comportement alimentaire, le fonctionnement précis des processus physiologiques et neurophysiologiques sous-jacents est encore largement incompris. C'est pourtant là que se trouvent les applications thérapeutiques de demain.

Introduction

*Le comportement alimentaire, définitions, principes de base,
approche expérimentale et mécanismes biologiques de contrôle*

Régulation du poids corporel et comportement alimentaire

Introduite par Claude Bernard au XIX^e siècle (12), sous le concept de milieu intérieur, puis reprise par Walter Cannon (24) au début du XX^e siècle sous le concept d'homéostasie, l'idée que les paramètres biologiques sont soumis à une régulation visant à les maintenir constants est un des principes fondateurs de la physiologie moderne.

L'idée que le poids corporel soit ainsi soumis à un contrôle homéostatique a été avancée depuis longtemps. Dans le cas précis du poids corporel la présence d'une régulation stricte est toutefois à nuancer. Une régulation stricte ne présente en effet que très peu de sens d'un point de vue évolutif, car au cours de l'histoire de l'humanité, l'homme a été confronté à des situations de faible abondance de nourriture bien plus qu'il n'a été en présence de nourriture en quantité excessive. A cet égard, les situations d'abondance voire d'excès de nourriture que nous connaissons actuellement dans certains pays riches font figure d'heureux accidents. Pendant très longtemps, tout au long de l'histoire de l'homme, la capacité de l'organisme à accumuler rapidement une grande quantité d'énergie s'est révélée être un avantage évolutif majeur. Dans ce contexte, une régulation homéostatique stricte du poids corporel limitant la capacité du corps à stocker de l'énergie et limitant le gain de poids dans le seul but de le maintenir stable est peu vraisemblable.

Les lois de l'homéostasie obéissent à des règles simples: un paramètre est contrôlé par un système régulateur qui s'informe constamment sur la valeur de ce paramètre et peut générer des actions dont l'effet va être de maintenir l'homéostasie, c'est-à-dire la stabilité du paramètre réglé.

La régulation du poids corporel, comme toute autre régulation de type homéostatique, obéit à cette règle. Le contrôle homéostatique du poids corporel est assimilé au contrôle de la balance énergétique. Pour assurer la stabilité du poids corporel il s'agit de maintenir un équilibre entre les apports en énergie vers l'organisme et la dépense d'énergie par l'organisme. La dépense énergétique de l'organisme (les sorties d'énergie) est constituée de plusieurs composantes comme l'activité physique ou l'énergie utilisée par le métabolisme. Les apports en énergie disponible pour l'organisme sont assurés par l'alimentation et reposent entièrement sur le comportement alimentaire. En somme, c'est l'équilibre entre entrées et sorties, entre dépenses énergétiques et ingestion d'énergie qui détermine l'évolution du poids corporel (figure 1).

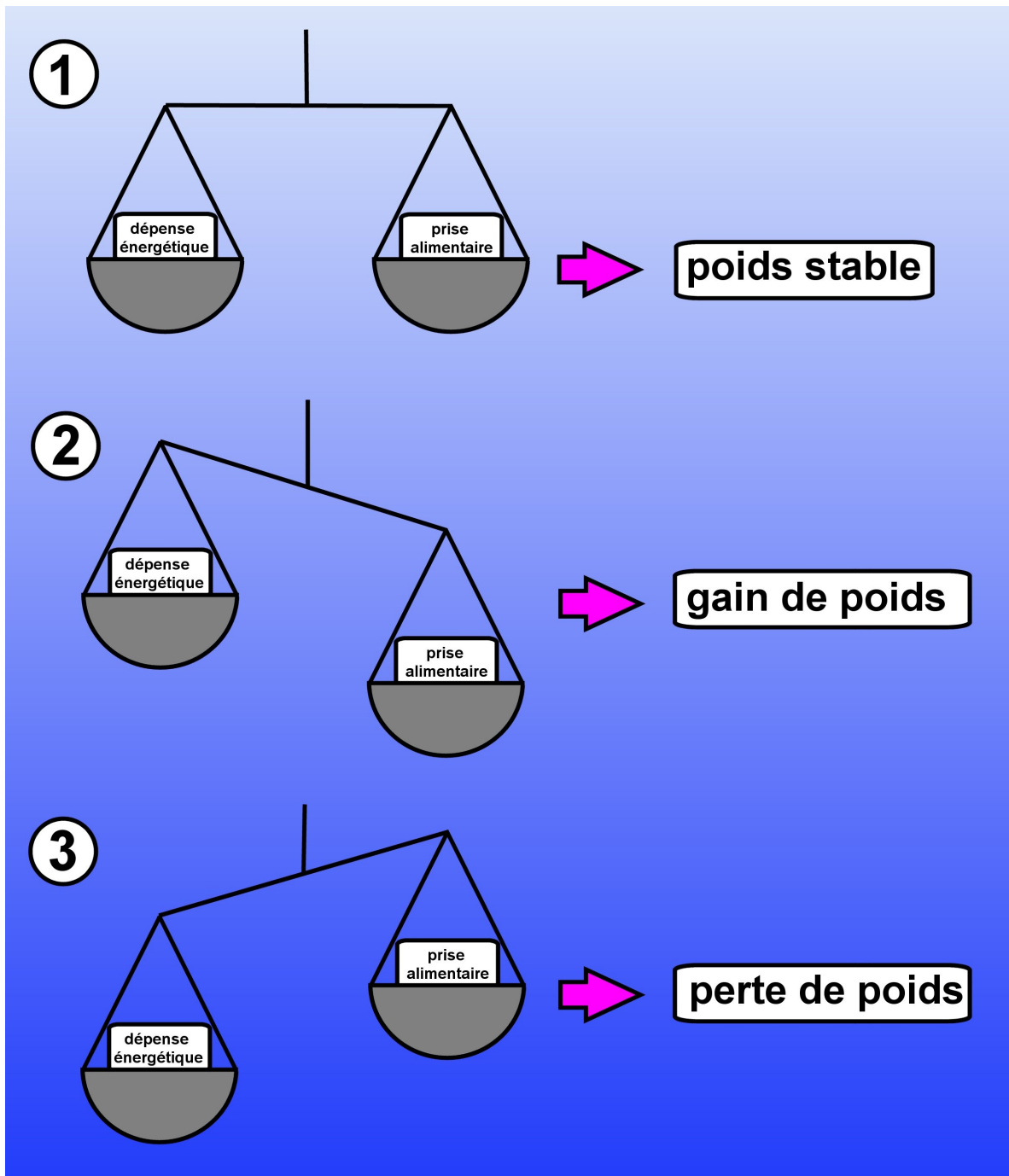


Figure 1: La régulation du poids corporel.

1, lorsque la dépense énergétique est égale à la prise alimentaire, le poids est stable. 2, lorsque la prise alimentaire est plus importante que la dépense énergétique, le sujet subit un gain de poids. 3, lorsque la dépense énergétique est plus importante que la prise alimentaire, le sujet subit une perte de poids.

Parce qu'il est une des deux composantes constituant le bilan énergétique, le comportement alimentaire apparaît alors comme un facteur déterminant dans la régulation du poids corporel.

Définitions du comportement alimentaire

Un comportement se définit par les actions ou les réactions d'un sujet. Dans le cas du comportement alimentaire les actes sont relatifs à l'ingestion d'aliments. On définit donc le comportement alimentaire comme l'ensemble des actes, actions ou réactions, relatifs à l'ingestion de nourriture.

Les différentes composantes du comportement alimentaire

On distingue généralement cinq phénomènes successifs (13; 109) constituant deux types d'évènements: (1) les périodes où l'animal s'alimente appelées les repas et (2) les périodes où l'animal ne s'alimente pas ; il s'agit alors des périodes dites de latence (figure 2).

Le repas se compose de quatre phénomènes successifs, la phase d'initiation, la phase de procuration, la phase de consommation et la terminaison. La phase d'initiation consiste en la prise de décision de s'alimenter. Vient ensuite la phase de procuration au cours de laquelle le sujet va chercher à se procurer de la nourriture.

Enfin, la phase de consommation correspond à l'ingestion d'aliment à proprement parler. La consommation s'achève par le phénomène de terminaison, coïncidant souvent avec le rassasiement.

Le temps de latence séparant la fin d'un repas du début du repas suivant est la conséquence du phénomène de satiété. Le phénomène de satiété se définit par une sensation prolongée de non faim de telle sorte que le sujet ne s'alimente pas ni ne cherche à s'alimenter.

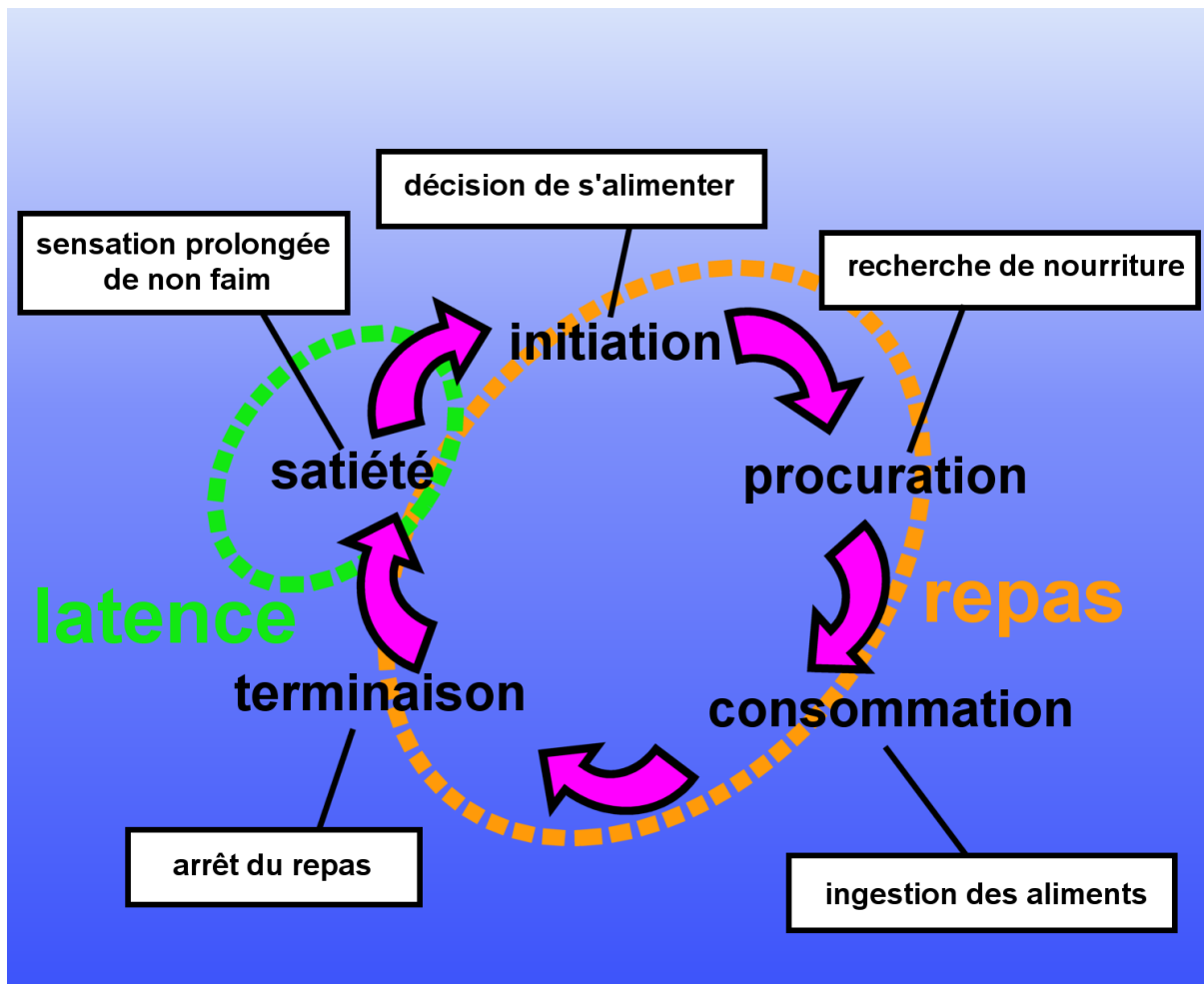


Figure 2: les différentes phases du comportement alimentaire.

L'initiation du repas correspond à la décision de s'alimenter, au cours de la phase de procuration le sujet recherche et se procure de la nourriture. Une fois disponible la nourriture est ingérée au cours de la phase de consommation. L'arrêt du repas est aussi appelé terminaison. Enfin une période de latence sépare la fin d'un repas du début (initiation) du repas suivant.

Principes de base du contrôle du comportement alimentaire

Le contrôle du comportement alimentaire

Nombre de phénomènes comportementaux peuvent être décrits simplement comme des systèmes entrées-intégration-sorties dans lesquels des déterminants aussi appelés entrées ou encore stimuli sont reçus et traités par un système dit intégrateur dont la fonction est de générer des sorties ou réponses (figure 3). Chacun des phénomènes présentés plus haut peut être étudié à la lumière de cette approche. Chaque système possède des déterminants multiples et c'est particulièrement la connaissance de ces déterminants et de leurs conséquences sur le comportement alimentaire qui constitue notre compréhension du comportement alimentaire.

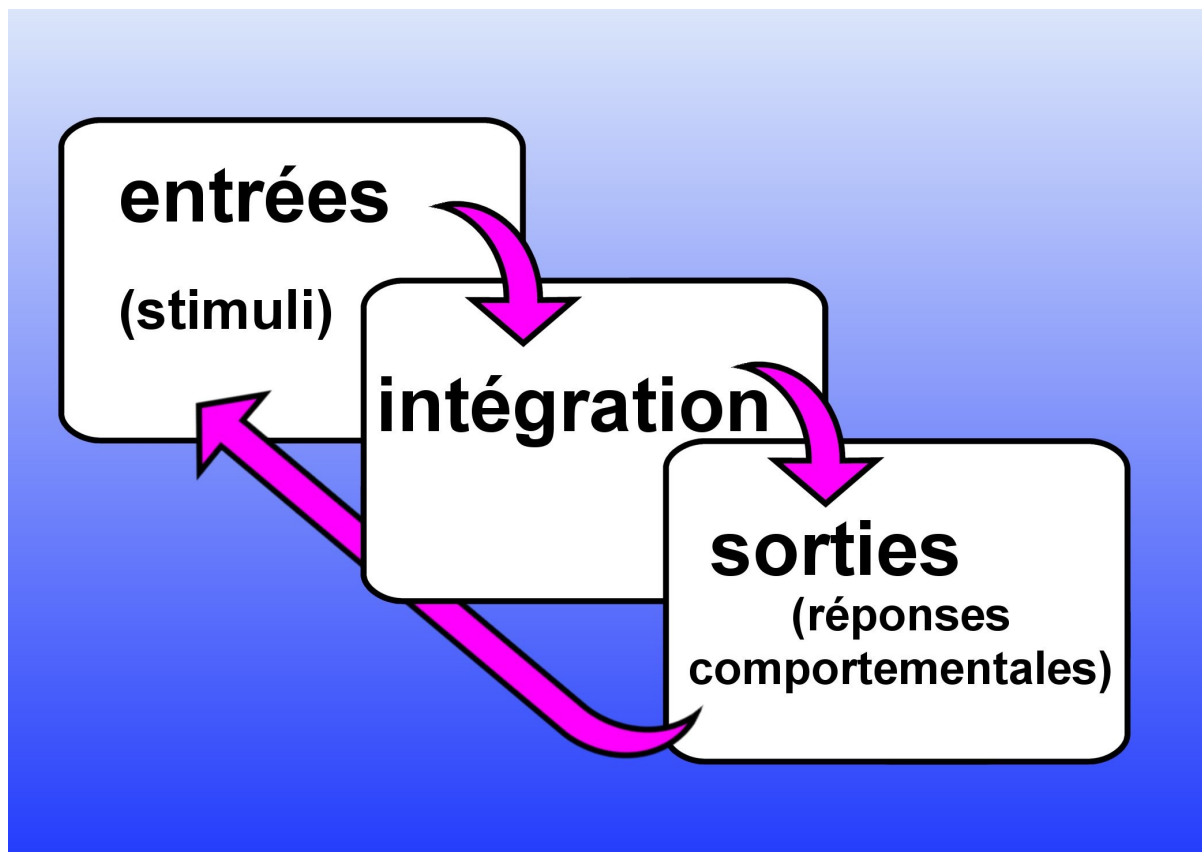


Figure 3: modélisation basique d'un comportement, le schéma entrées-intégration-sorties.

Les stimuli sont collectés puis traités par un système intégrateur qui va générer des réponses comportementales.

Le comportement alimentaire est influencé par de nombreux facteurs

Divers facteurs peuvent influencer le comportement alimentaire (13) . Parmi les plus souvent cités, on trouve l'effet de la disponibilité ou de la demande en énergie, les conséquences mêmes de la prise alimentaire (la digestion), l'influence d'autres comportements entrant en compétition avec le comportement alimentaire (comme la fuite par exemple), l'influence de pathogènes ou d'inflammations, l'influence du cycle nycthéméral, l'influence de l'âge et du vieillissement, l'état de motivation, le contexte social ou encore la valeur émotionnelle ou hédonique des aliments (figure 4).

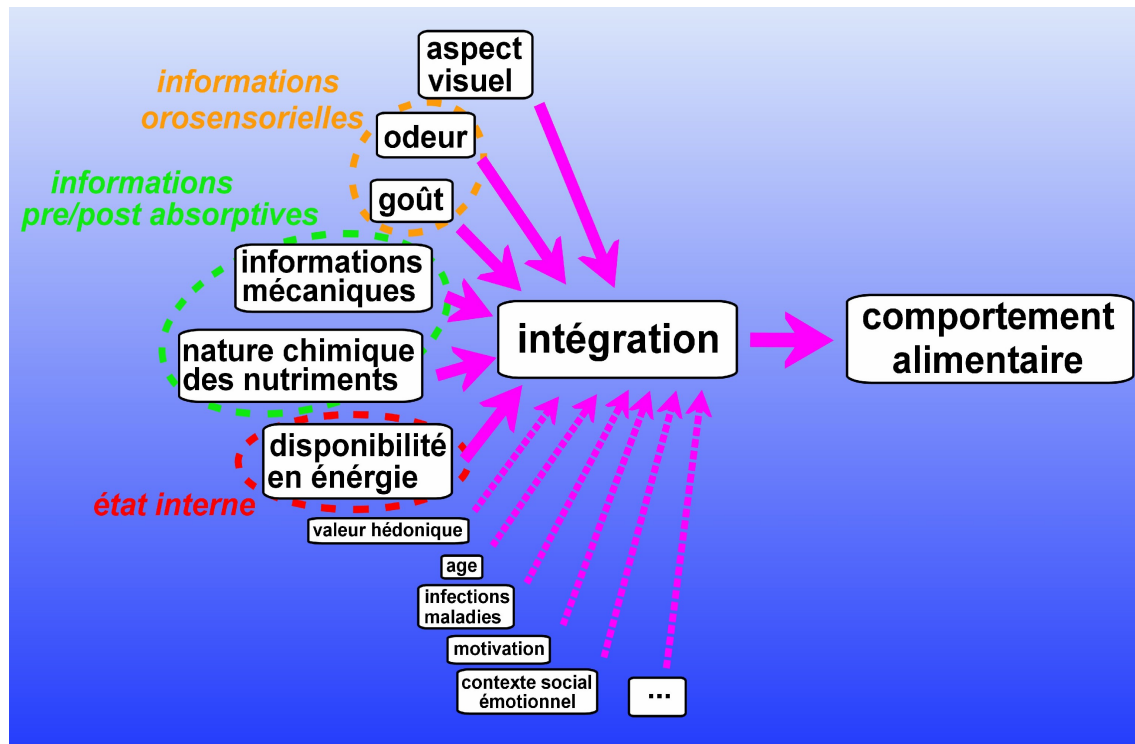


Figure 4: Les facteurs influençant le comportement alimentaire

Deux déterminants principaux dirigent le comportement alimentaire

Parmi tous ces facteurs, dans des conditions physiologiques normales, deux paramètres semblent influencer le comportement alimentaire de façon importante. Il s'agit de la disponibilité en énergie d'une part et des phénomènes liés à la digestion d'autre part.

La disponibilité en énergie exerce une influence prédominante pendant la période de latence, en augmentant par exemple le temps de latence entre les repas lorsque les réserves en énergie sont élevées (26) . A l'inverse les informations générées au cours de la digestion participent à un rétrocontrôle immédiat des événements internes au repas en déterminant, par exemple, la durée de la phase de consommation ou en réglant la survenue de la terminaison du repas (rassasiement) (75).

Les deux déterminants cités ici revêtent un caractère d'autant plus important que c'est principalement ces phénomènes qui sont en cause dans la survenue de l'obésité. En effet un mauvais fonctionnement du rétrocontrôle exercé lors de la digestion conduit à une augmentation significative de la taille des repas, et il a par ailleurs été constaté que des repas trop grands sont une des raisons premières de la survenue de l'obésité (2;102).

Nous avons jusqu'à maintenant présenté les principaux déterminants du comportement alimentaire. Il s'agit désormais de comprendre comment, à partir de ces informations que nous venons de décrire, l'organisme va générer une réponse comportementale adaptée. Autrement dit comment, à partir des informations qui lui sont disponibles l'organisme va prendre des décisions liées à son alimentation.

Les mécanismes du contrôle du comportement alimentaire

L'hypothalamus: le chef d'orchestre du comportement alimentaire

Chez certains mollusques et chez les vertébrés, le cerveau est l'organe capable d'intégrer des informations et de générer en retour des réponses comportementales. C'est donc dans le cerveau que se trouvent les structures à même de diriger le comportement alimentaire. Une structure centrale semble jouer un rôle particulièrement important dans le comportement alimentaire, c'est l'hypothalamus. Cette structure est aujourd'hui considérée comme le chef d'orchestre du comportement alimentaire (52).

Déjà dans les années 1940 des scientifiques se sont aperçus que des lésions de l'hypothalamus induisaient, selon le sous-noyau lésé, une hyperphagie ou une hypophagie suggérant ainsi que parmi les nombreuses régions du cerveau, l'hypothalamus était impliqué dans le contrôle du comportement alimentaire (38). Près

de 50 ans plus tard, la découverte en 1994 du gène codant pour la leptine, a constitué le premier pas vers une compréhension précise du fonctionnement hypothalamique comme coordinateur central du comportement alimentaire (114). A de nombreuses reprises, l'hypothalamus a été proposé comme un site majeur de convergence de signaux provenant par exemple de la disponibilité en énergie ou de la présence de certains macronutriments dans le contenu digestif (1; 6-10; 13; 16; 17; 101; 112).

Présentation de l'hypothalamus

L'hypothalamus des mammifères est une région qui, comme son nom l'indique, est située sous le thalamus, (figures 5-7). Elle est constituée de plus de 40 noyaux, eux-mêmes pouvant être sous-divisés en de nombreux sous-noyaux (13) . Nous allons nous pencher plus en détail sur deux noyaux hypothalamiques qui semblent jouer un rôle majeur dans le contrôle de la prise alimentaire et plus généralement dans la régulation de l'homéostasie énergétique : il s'agit du noyau arqué (ARC) et du noyau paraventriculaire (PVN), (figure 8). Deux populations de neurones situés dans ces régions constitueraient l'élément central du contrôle du comportement alimentaire: ils forment un système de contrôle bien connu aujourd'hui: le système mélanocortine central. Il semble bien que ce réseau neuronal puisse être considéré comme le principal circuit réglant le comportement alimentaire.

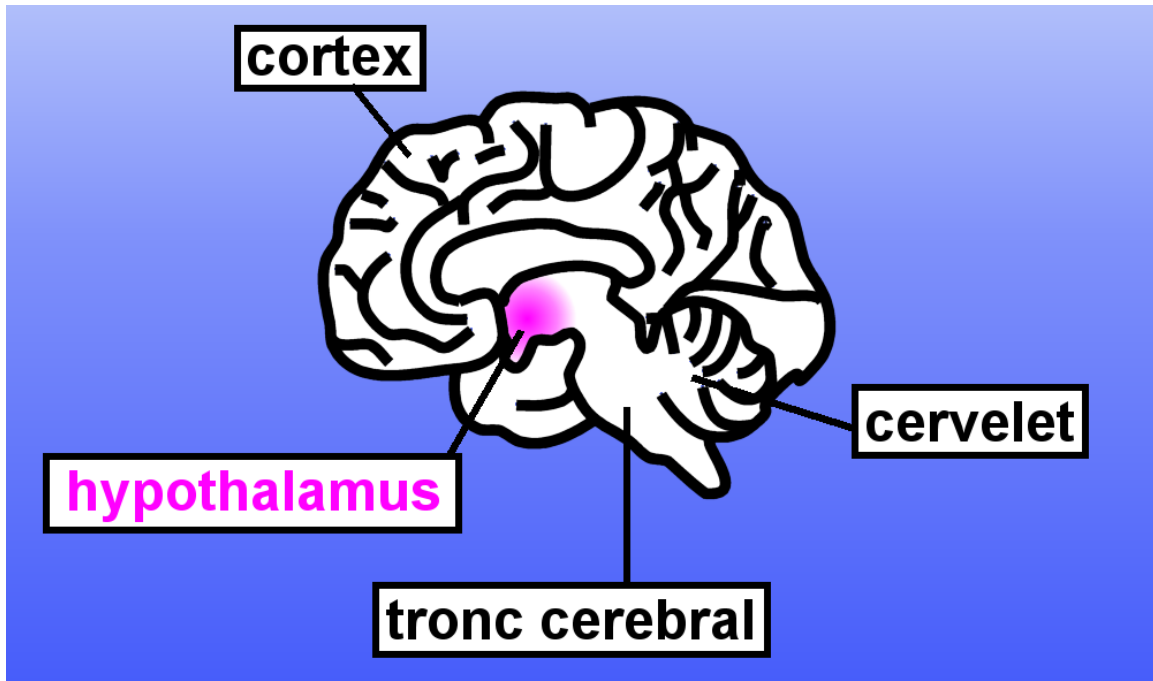


Figure 5: Localisation de l'hypothalamus dans un cerveau humain (Coupe latérale).

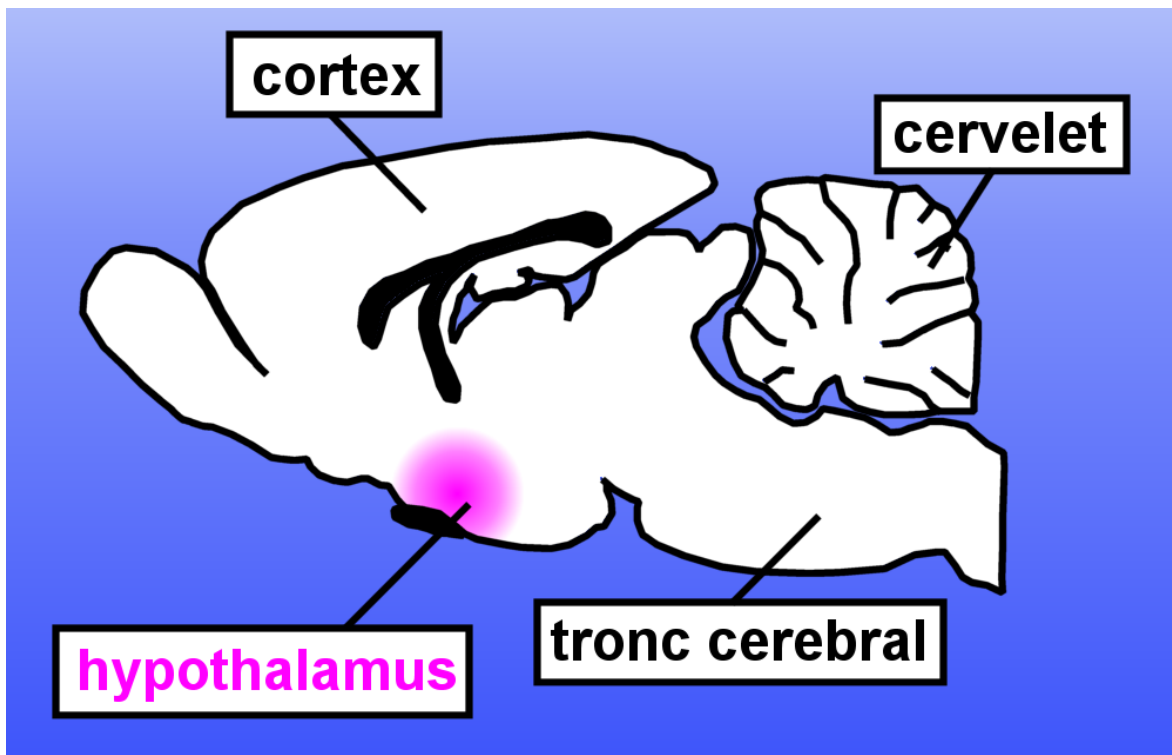


Figure 6: Localisation de l'hypothalamus dans un cerveau de rat (Coupe latérale).

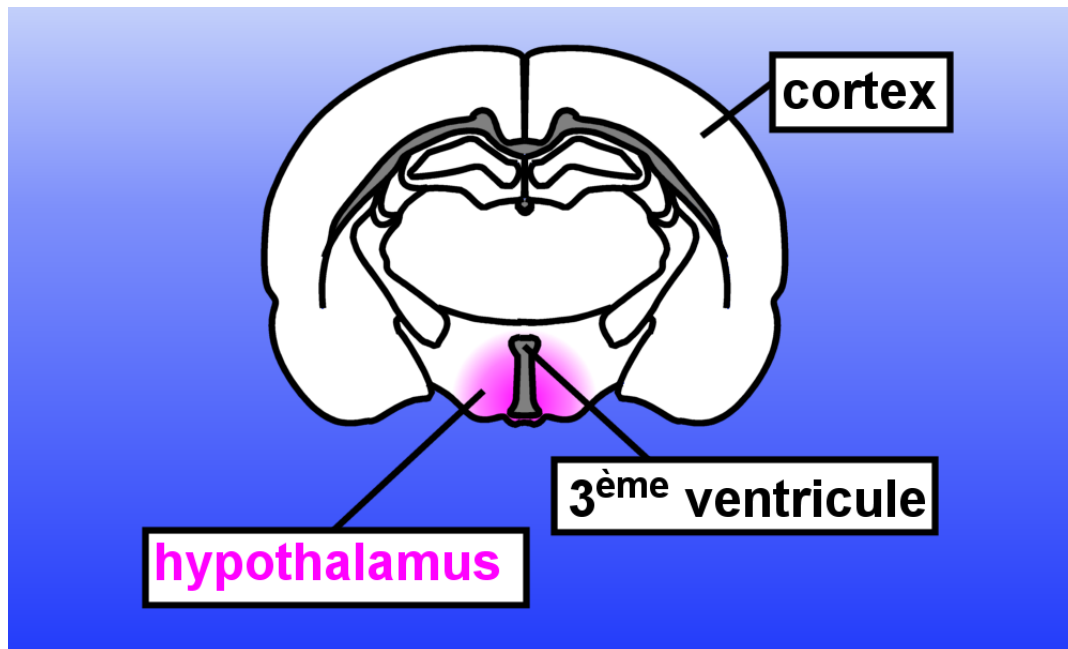


Figure 7: Localisation de l'hypothalamus dans un cerveau de rat (Coupe transversale).

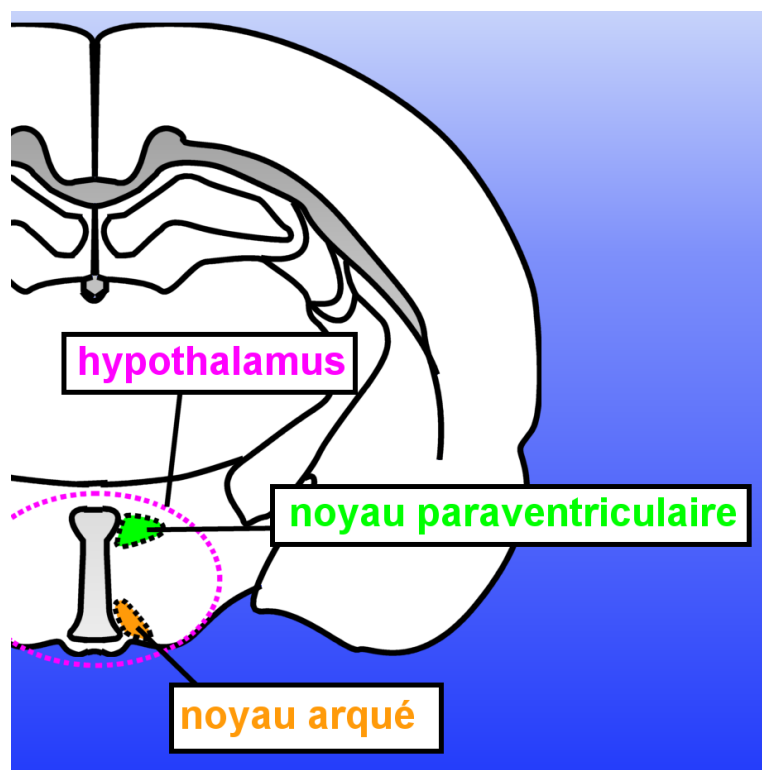


Figure 8: Localisation des principaux noyaux de l'hypothalamus impliqués dans l'homéostasie énergétique (coupe transversale dans un cerveau de rat).

Le système mélanocortine central

Des constatations expérimentales récentes ont d'abord suggéré que les produits du gène codant pour la pro-opiomélanocortine (POMC) pouvaient être associés au contrôle du comportement alimentaire. En effet, chez la souris aussi bien que chez l'homme, l'absence, d'origine génétique, ou la réduction de l'activité de ce gène ou de gènes lui étant associés, ont pour conséquences la survenue de l'obésité, une hyperinsulinémie et une hyperphagie (27; 41; 60; 106).

Le gène codant pour POMC produit deux sous-classes de médiateurs peptidiques: les mélanocortines et les β -endorphines. Parmi les mélanocortines on distingue trois MSH (*melanocyte stimulating hormones*) dont les cibles sont une famille de récepteurs métabotropiques allant de MC1R à MC5R. Si de nombreuses fonctions périphériques sont attribuées aux produits de POMC et aux récepteurs des mélanocortines comme, par exemple, la production des pigments de la peau ou des cheveux, en revanche, dans le système nerveux central, peu de neurones expriment POMC. La majeure partie de ces neurones, environ 3000 neurones, localisée dans le noyau arqué et projetant vers le PVN constitue le système mélanocortine central hypothalamique. Une seconde sous-population de neurones encore plus faible, environ 300 neurones, est située dans le noyau du tractus solitaire (NTS) dans le tronc cérébral et constitue le système mélanocortine central du tronc cérébral (54; 56 80; 84; 108). Ces neurones constituent le cœur d'un circuit désormais bien identifié, connecté avec

d'autres régions du système nerveux central. C'est ce réseau qui constitue le véritable processeur central du comportement alimentaire. Il va recevoir des informations (sensorielles, émotionnelles, mémoires etc.) les intégrer et coordonner en réponse le comportement alimentaire.

Le système mélanocortine central hypothalamique

Le principal site d'expression de POMC dans le système nerveux central est l'hypothalamus. Les neurones exprimant POMC expriment aussi le neuropeptide anorexigène CART (cocaïne amphétamine regulated transcript). Ces neurones (POMC/CART) reçoivent des projections d'un second type de neurones, exprimant, lui, le neuropeptide Y (NPY) et le peptide AgRP (Agouti gene-related Protein, neurones NPY/AgRP). Ces deux types de neurones sont situés dans le noyau arqué et projettent principalement vers le PVN. Alors que les neurones POMC/CART exercent un effet excitateur sur les neurones du PVN, les neurones NPY/AgRP exercent eux une action inhibitrice.

Ce sont principalement les interactions entre ces trois types de neurones (neurones POMC/CART, neurones NPY/AgRP et neurones du PVN) dans ces deux noyaux hypothalamiques qui constituent le cœur du système mélanocortine central hypothalamique et qui sont au centre du contrôle du comportement alimentaire. L'activité des neurones du PVN est associée à la fin du repas et à la sensation prolongée de satiété. L'activité des neurones POMC/CART et NPY/AgRP va ajuster l'activité du PVN, via les connexions qu'ils établissent avec lui, déterminant ainsi la

force de l'inhibition qu'il exerce sur la faim. Tandis que les neurones POMC/CART inhibent la faim car ils activent le PVN (notamment par l'intermédiaire de la libération d' α -MSH qui se lie à des récepteurs de type MC4R sur les neurones du PVN), les neurones NPY/AgRP, inhibant à la fois les neurones du PVN et les neurones POMC/CART (via des synapses inhibitrices de type GABAergiques, NPYergiques et AgRPergiques) ont, à l'inverse, un effet positif sur la faim (figure 9).

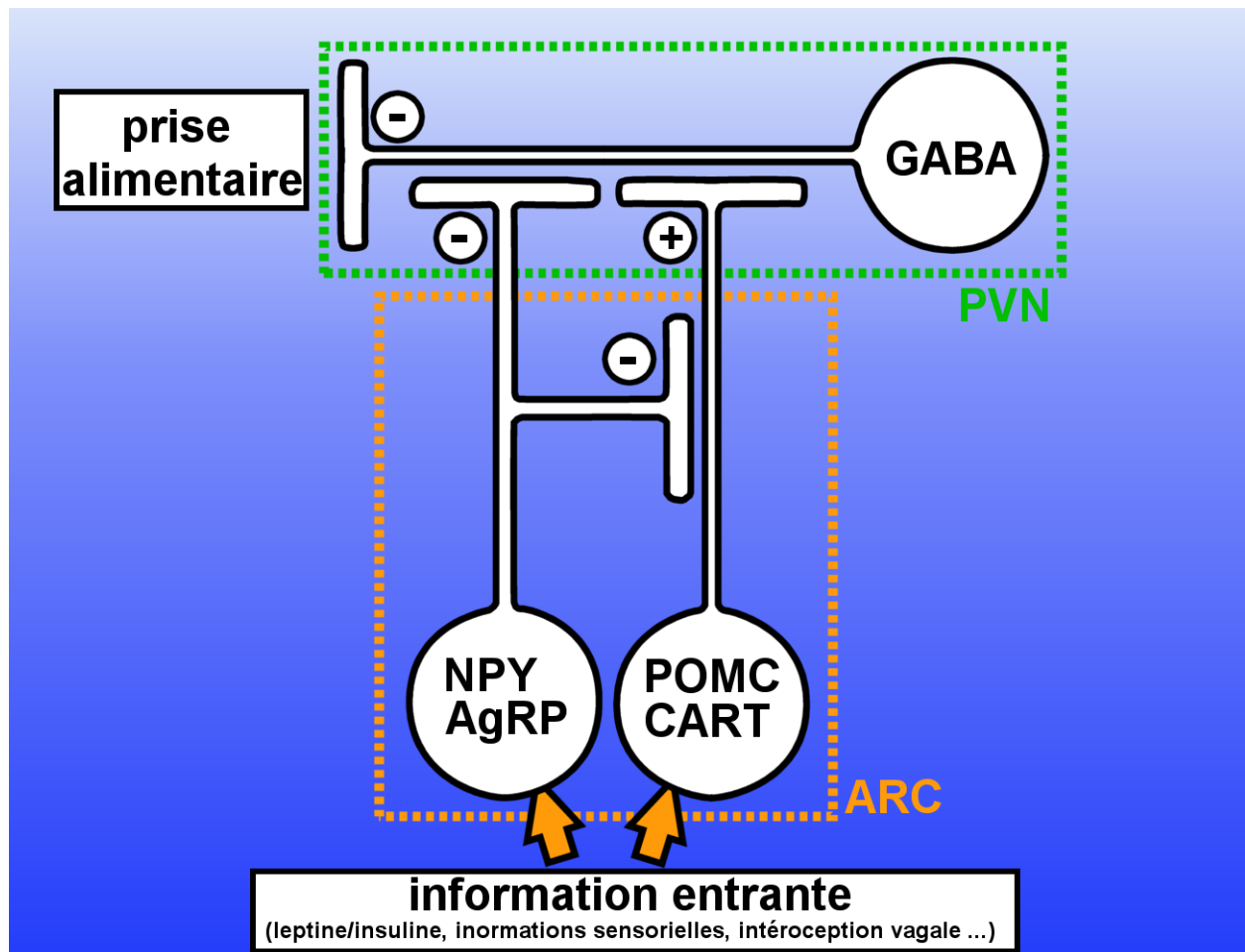


Figure 9: Fonctionnement du système mélanocortine hypothalamique.

Les deux types de neurones du noyau arqué, aux effets antagonistes sur le comportement alimentaire, sont en compétition constante pour déterminer l'intensité des neurones situés dans le PVN. Les nombreuses informations disponibles pour le noyau arqué déséquilibrent la compétition entre ces deux types de neurones dans un sens ou dans l'autre, aboutissant ainsi à un effet sur la prise alimentaire via une modulation de l'activité des neurones du PVN.

Le système mélanocortine central hypothalamique est influencé par la disponibilité en énergie et par les informations émises au cours des repas.

Gestion des réserves en énergie à long terme: influence de la disponibilité en énergie sur le fonctionnement du système mélanocortine central hypothalamique: exemple de la leptine et de l'insuline

La leptine est une hormone peptidique libérée par les adipocytes. La concentration circulante de leptine est proportionnelle à la masse grasse. Les taux plasmatiques d'insuline reflètent pour leur part l'état de la glycémie. Les concentrations de leptine et d'insuline constituent donc des signaux relatifs respectivement à la quantité d'énergie disponible sous forme de tissus adipeux et à la quantité d'énergie immédiatement utilisable (glucose circulant) (81).

De nombreuses études ont montré que la leptine et l'insuline ont un effet sur le comportement alimentaire ; les cibles centrales de la leptine et de l'insuline étant précisément les neurones POMC/CART et NPY/AgRP. Ces derniers expriment des récepteurs à la leptine et à l'insuline. Ces deux facteurs circulant semblent pouvoir accéder aux neurones du noyau arqué et inhiber l'activité des neurones NPY/AgRP, notamment leur activité inhibitrice GABAergique sur les neurones du PVN et sur les neurones POMC/CART du noyau arqué. Ceci ayant pour effet de réduire la prise alimentaire et d'augmenter la sensation de satiété. (figures 10 et 11)

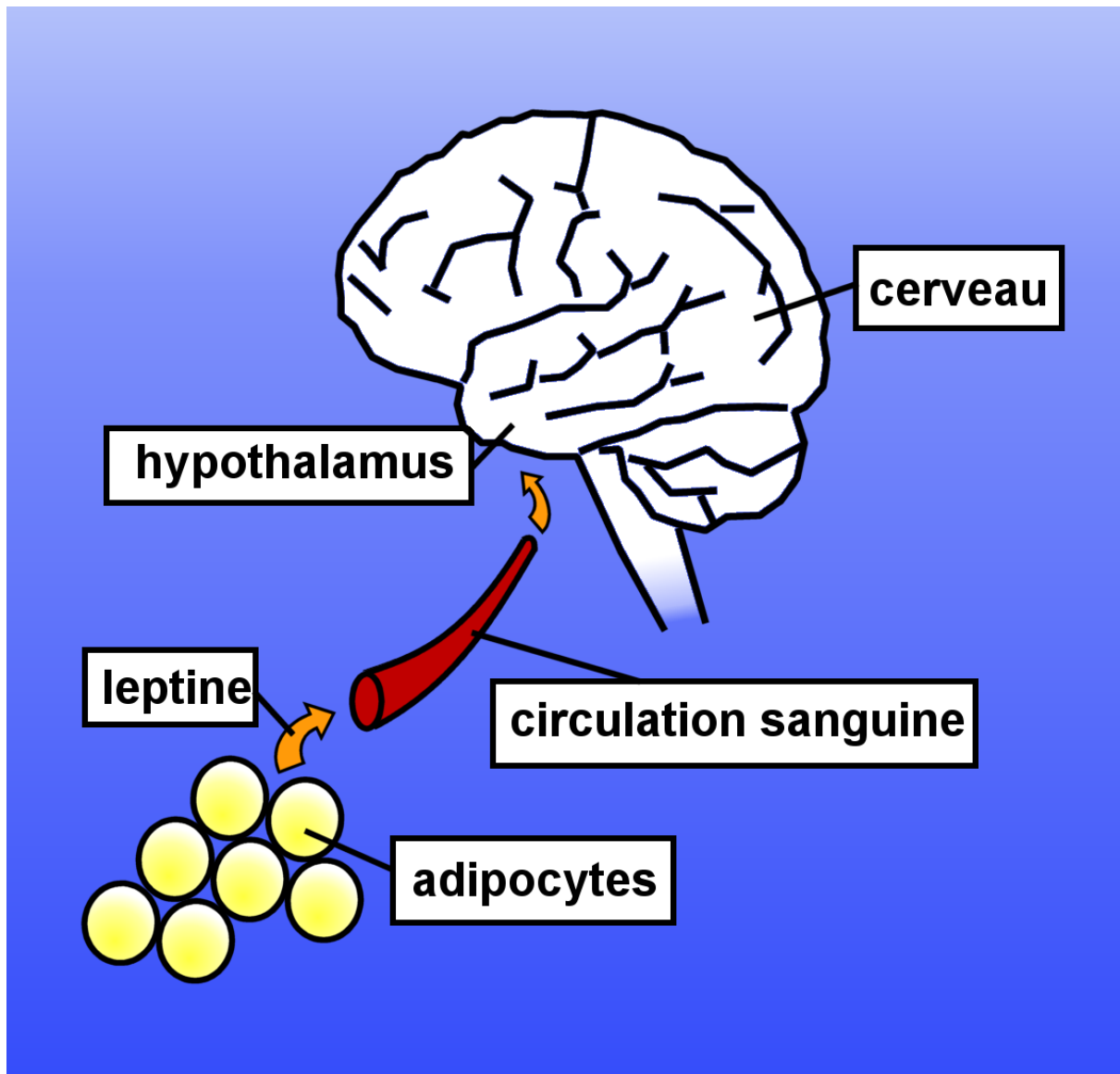


Figure 10: La leptine comme indicateur des réserves en énergie.

Libérée par les adipocytes elle renseigne le système nerveux central sur l'état du tissu adipeux (quantité de réserves disponibles). La leptine circule par voie sanguine vers le système nerveux central.

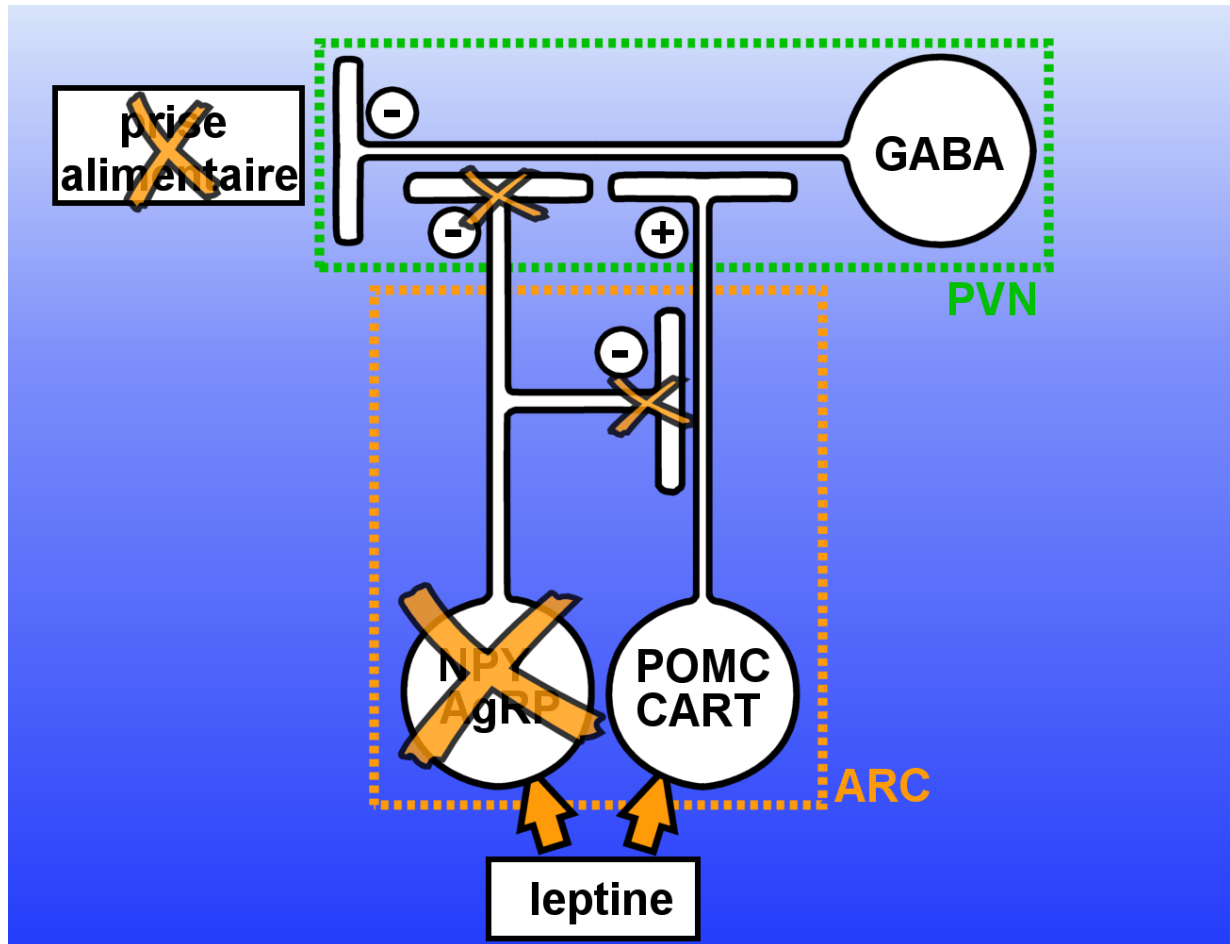


Figure 11: Influence de la leptine sur le système mélanocortine hypothalamique.

La leptine accède par voie sanguine au noyau arqué, elle y diminue l'activité inhibitrice des neurones NPY/AgRP et stimule les neurones POMC/CART. Compte tenu de leur action sur les neurones du noyau paraventriculaire, la leptine a pour effet de diminuer la prise alimentaire.

Action immédiate de signaux digestifs sur le système mélanocortine central

hypothalamique pendant la digestion: exemple de la ghréline

La ghréline est une hormone peptidique stimulant la prise alimentaire sécrétée principalement par l'estomac lorsque celui-ci est faiblement distendu . Sa libération dans la circulation est en revanche fortement inhibée lorsque l'estomac est rempli. Des récepteurs de la ghréline ont été identifiés sur les neurones NPY/AgRP de l'hypothalamus (110) et la liaison de la ghréline à son récepteur sur ces neurones a pour effet d'augmenter leur action inhibitrice sur les neurones POMC/AgRP et les neurones du PVN (51). La ghréline semble donc pouvoir jouer un rôle, non plus à long terme sur les phénomènes de satiété, mais à court terme sur les phénomènes de rétrocontrôle immédiat de la prise alimentaire lors de la digestion.

Le système mélanocortine central hypothalamique, un processeur central du comportement alimentaire.

Le système mélanocortine central hypothalamique apparaît donc comme un centre important dans le contrôle du comportement alimentaire. Il intègre des informations principalement relatives à la disponibilité en énergie, comme les taux circulants de leptine par exemple, dont nous avons précisé l'effet sur la satiété et les périodes de latence entre les repas. Le système mélanocortine central hypothalamique peut contrôler pendant la digestion certains paramètres liés la prise alimentaire via la ghréline par exemple. Toutefois l'hypothalamus est plus impliqué dans la gestion à long

terme des réserves en énergie plutôt que dans le rétrocontrôle immédiat de l'ingestion pendant la digestion.

Le système mélanocortine central du tronc cérébral

Un petit nombre de neurones du tronc cérébral (figure 4 et 5), estimé à environ 300 cellules situées dans le Noyau du Tractus Solitaire (NTS), exprime aussi POMC (5; 25; 37; 40). Le tronc cérébral est classiquement perçu comme un centre recevant et régissant la réponse à des signaux périphériques (90; 95; 116) . Plus particulièrement, le complexe vagal dorsal et sa principale extension périphérique, le nerf vague, jouent un rôle clé dans les transmissions d'informations entre le système nerveux central et le reste du corps.

Le NTS est le principal relais des fibres vagales afférentes en provenance du tube digestif.

Les branches vagales dérivant de différents organes du tube digestif établissent des connexions dans le NTS (figure 12), notamment avec les neurones exprimant POMC. S'il a été montré qu'il existe d'autres types de neurones différents de POMC qui reçoivent des connexions des afférences vagales, les neurones POMC semblent importants tant leur présence est nécessaire à la modulation du comportement alimentaire par les informations périphériques (23).

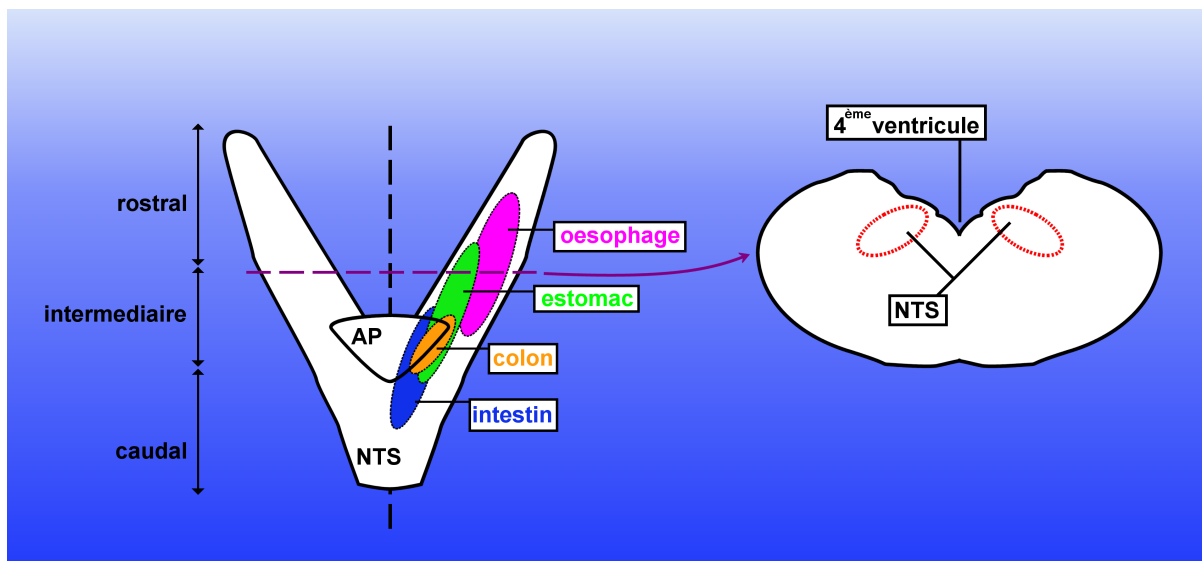


Figure 12: Le Noyau du Tractus Solitaire.

Organisation viscérotopique des projections du nerf vague en provenance du tube digestif.

Ces neurones POMC du NTS établissent des connexions bidirectionnelles avec de nombreuses zones du système nerveux central. On distingue généralement deux types de connexions. Il existe des connexions entre le NTS, notamment les neurones POMC, et les centres impliqués dans le contrôle immédiat de la prise alimentaire (au cours d'un repas). Par exemple le NTS exerce un contrôle quasi direct sur la mécanique gastrique ou les centres coordinateurs de la mastication et de la déglutition.

A partir du NTS s'établit aussi un second type de connexions, cette fois vers le cerveau antérieur et notamment vers l'hypothalamus basomédian, siège du système mélanocortine central hypothalamique (100) . En coordination avec l'hypothalamus, le tronc cérébral régule le comportement alimentaire. Les neurones POMC modulent l'activité spontanée des neurones de l'hypothalamus et notamment des neurones POMC/CART et NPY/AgRP du noyau arqué. Leur action est vraisemblablement anorexigène et participe au contrôle immédiat de la prise alimentaire. En retour le système mélanocortine central hypothalamique module l'action du NTS en y étendant des projections. Là, certains neurones du NTS expriment des récepteurs de l' α -MSH de type MC4R.

Le NTS, notamment via sa composante POMC, apparaît alors comme un acteur à part entière dans le contrôle du comportement alimentaire, avec un rôle complémentaire de celui de l'hypothalamus. L'hypothalamus semble, pour sa part, réguler principalement le comportement alimentaire à moyen ou long terme en déterminant la fréquence des repas ou les périodes de latence, autrement dit la gestion

des réserves en énergie de l'organisme. Le tronc cérébral semble plus impliqué dans le contrôle immédiat de l'ingestion, en contrôlant la mastication, la déglutition ou la mécanique digestive. Loin de fonctionner indépendamment, ces deux centres sont au contraire massivement interconnectés et interagissent constamment.

Le nerf vague constitue une des principales voies par lesquelles le NTS collecte des informations en provenance de la périphérie.

L'activité du NTS est influencée par trois principaux facteurs (figure 13). D'abord le NTS via l'Area Postrema est sensible à certains facteurs circulants dans le sang. Il existe aussi, comme on l'a vu précédemment, une modulation de l'activité du NTS par d'autres structures centrales telles que l'hypothalamus. Enfin, et surtout, le NTS reçoit des informations émises depuis la périphérie, notamment au cours de l'ingestion, par voie nerveuse. Le nerf vague constitue ici la principale voie par laquelle le NTS collecte ces informations.

Les informations transmises par le nerf vague vers le NTS sous forme de trains de potentiels d'action ont deux origines correspondant à deux principales formes de stimulations: (1) des informations d'origine mécanique relatives à la distension gastrique ou aux mouvements de intestin (2) des informations d'origine chimique transmises par les médiateurs comme la CCK ou les cannabinoïdes par exemple (figure 14).

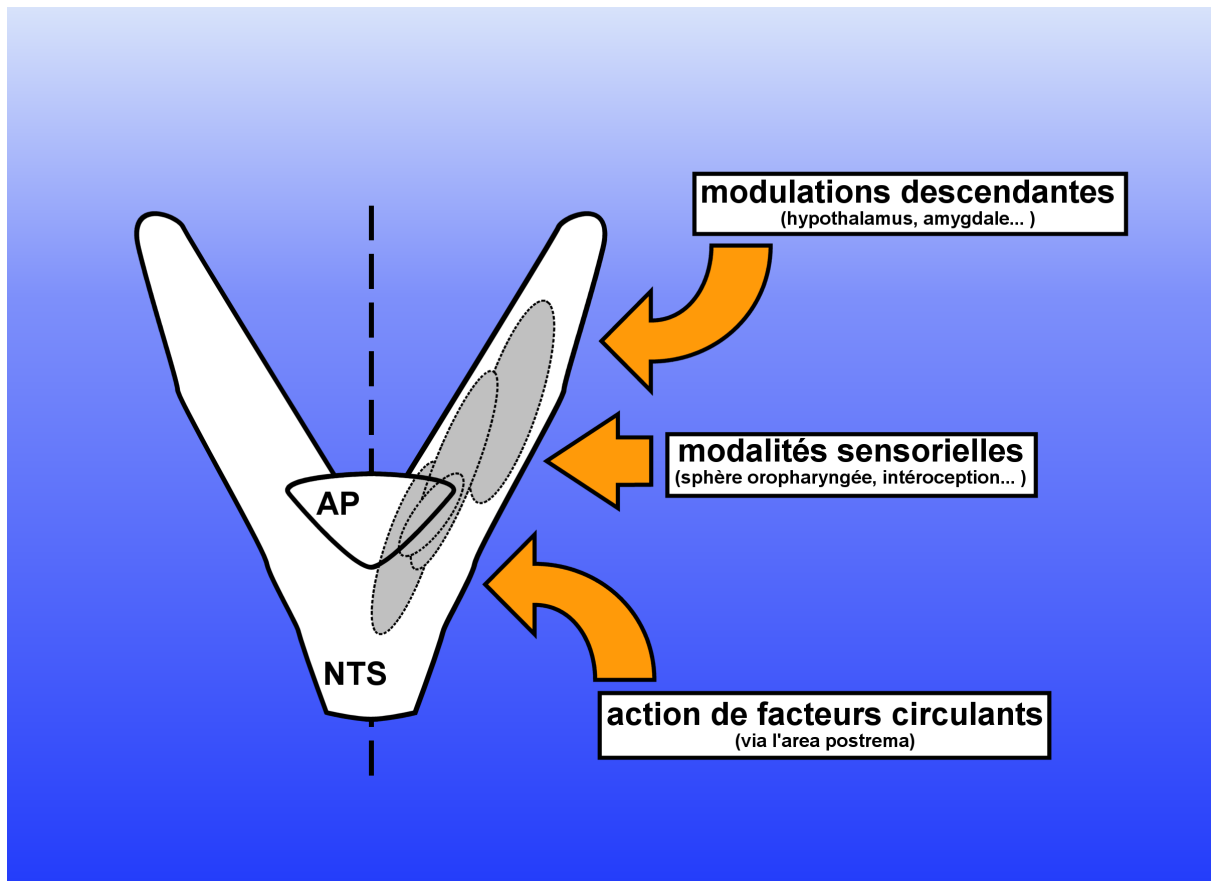


Figure 13: Facteurs influençant l'activité du Noyau du Tractus Solitaire.

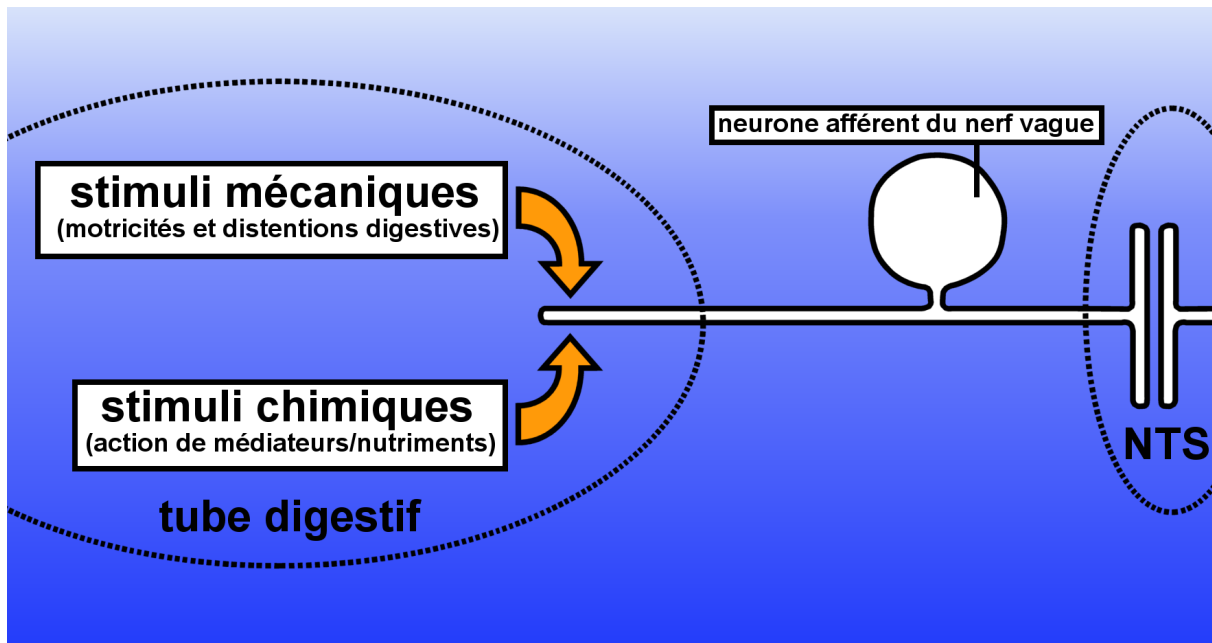


Figure 14: Surveillance du tube digestif par le nerf vague.

Les informations transmises vers le NTS ont deux origines différentes (1) une d'origine mécanique relatives à la distension gastrique ou aux mouvements de l'intestin (2) une origine chimique générée par les médiateurs comme la CCK.

L'axe tube digestif-cerveau et le contrôle de l' ingestion pendant la digestion

Le tube digestif sous surveillance

La prise alimentaire peut être résumée en un échange constant d'informations entre, d'une part, le système nerveux central, lieu de prise des décisions, et d'autre part, le tube digestif et les réserves d'énergie, responsables de la digestion des aliments et du stockage de l'énergie. L'importance physiologique évidente de cet échange d'informations entre le cerveau et la périphérie est telle qu'on désigne l'ensemble des voies par lesquelles ces informations transitent par le terme générique d'axe tube digestif-cerveau (*gut-brain axis* en anglais) (16; 101) (figure 15). Cet axe converge notamment vers le système mélanocortine du tronc cérébral. C'est par ce biais que les signaux générés au cours de la digestion exercent un rétrocontrôle puissant sur le comportement alimentaire (27) . C'est par ce biais aussi que le système nerveux central met en œuvre certaines réponses comportementales (figure 15).

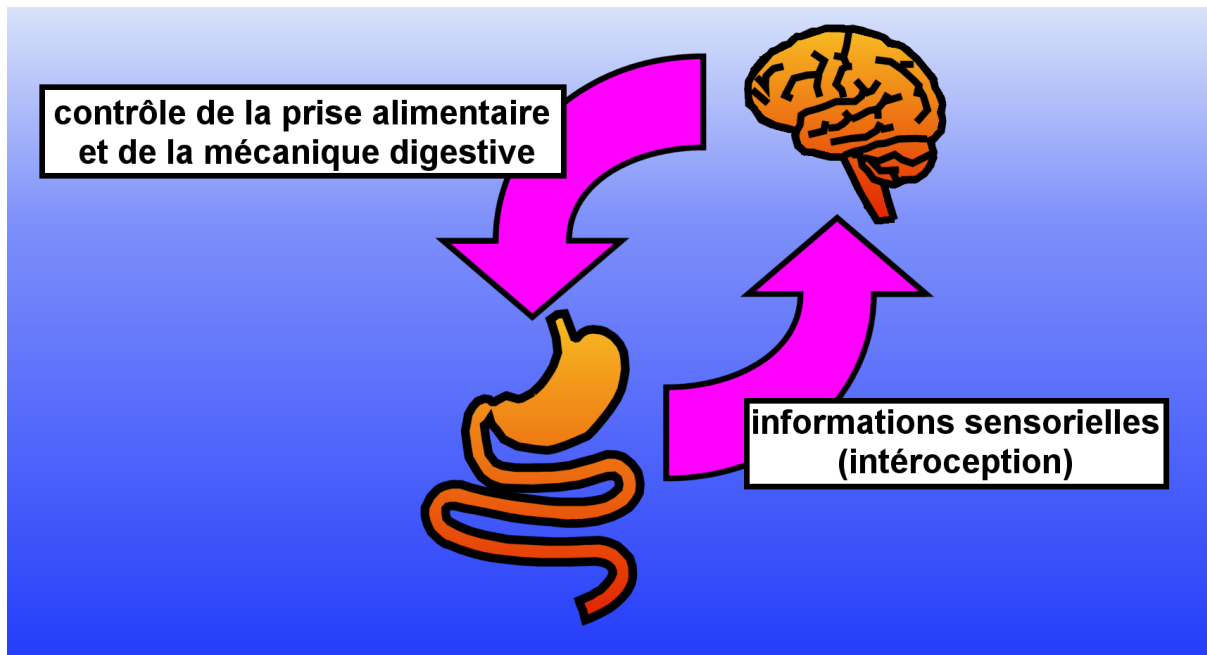


Figure 15: L'axe tube digestif cerveau, principe de fonctionnement.

Le système nerveux central s'informe des événements ayant lieu en périphérie via les systèmes de la viscérosensibilité ou intéroception, en réponse il peut moduler l'ingestion ou certains paramètres de la digestion.

La capacité du système nerveux central à s'informer sur des événements survenant en périphérie est appelée l'intéroception ou la viscérosensibilité ou encore la sensibilité viscérale.

On distingue généralement deux voies permettant au système nerveux central de collecter des informations générées depuis la périphérie, autrement dit il existe deux voies de l'intéroception. Il existe d'abord une voie dite humorale, le support de cette information étant la concentration plasmatique d'hormones telles que la leptine ou l'insuline dont nous avons traité plus haut. Une seconde voie met en jeu un réseau de fibres nerveuses connectant le tube digestif au cerveau. Si la voie humorale est impliquée majoritairement dans la gestion à long terme des stocks d'énergie (49; 55; 58) , la voie nerveuse dont il sera principalement question dans notre travail semble intervenir dans le contrôle immédiat de l'ingestion au cours de la digestion (95).

L'innervation du tractus digestif

Le tube digestif établit d'importantes connexions nerveuses réciproques avec le système nerveux central. Le système nerveux autonome assure deux types d'innervation (14) (figure 16): une première innervation, la voie sympathique, relie le tube digestif et la moelle épinière en établissant des relais via les ganglions paravertébraux. Le système sensoriel sympathique est, tant dans son organisation

anatomique que dans son fonctionnement, proche d'un système sensoriel «classique» ou somatique, c'est-à-dire fournissant des informations purement «tactiles» au cerveau. Ces connexions sont donc d'un intérêt moindre dans les mécanismes du contrôle de la prise alimentaire. L'innervation parasympathique est le deuxième type d'innervation du tube digestif. Il présente à l'inverse une organisation neuroanatomique tout à fait singulière (14). Il établit en effet des connexions directes ou indirectes avec le système nerveux végétatif dont le NTS ou l'hypothalamus. C'est vraisemblablement par le système parasympathique que les informations générées pendant la digestion transitent vers le tronc cérébral.

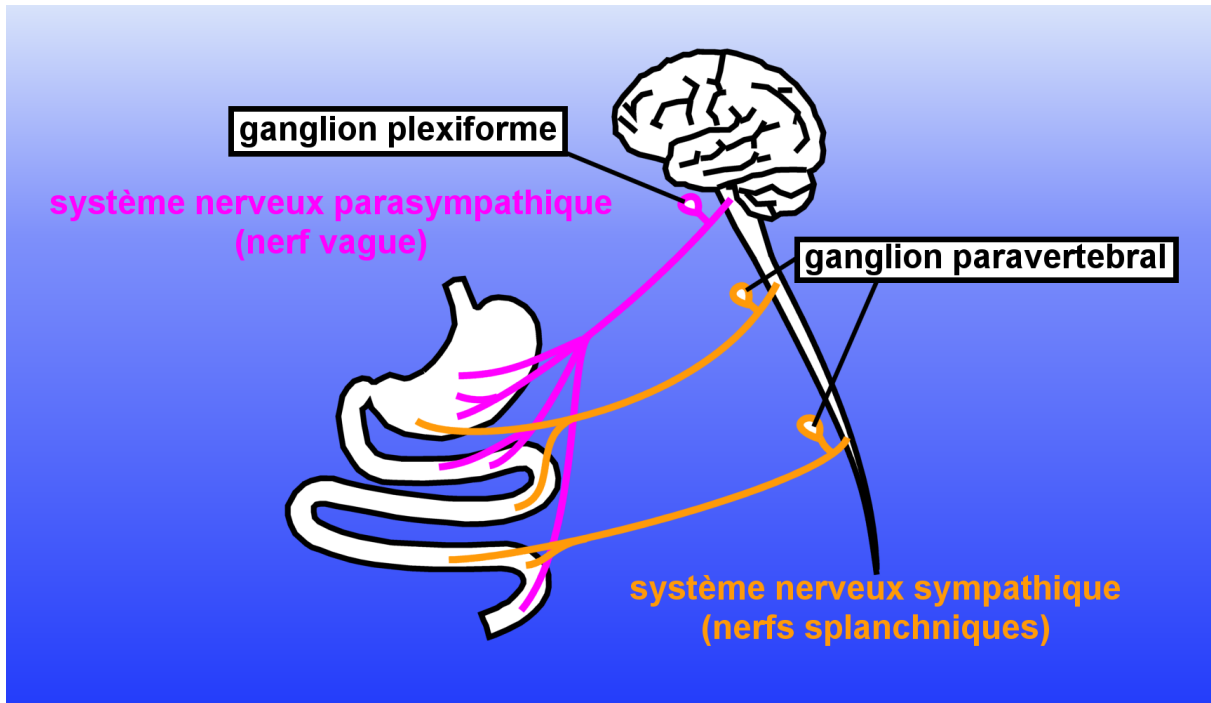


Figure 16: L'axe tube digestif cerveau, surveillance du tube digestif par le système nerveux autonome.

Deux composantes du système nerveux autonome relient le tube digestif au système nerveux central. Une première innervation sympathique implique les différents nerfs splanchniques. L'innervation parasympathique est principalement le fait du nerf vague.

Le système nerveux parasympathique est principalement composé du complexe vagal dorsal situé dans le tronc cérébral et du nerf vague. Le nerf vague est un nerf mixte ; on y distingue le nerf vague afférent (sensitif) et le nerf vague efférent (moteur). Les afférences (neurones sensoriels de premier ordre) sont constituées de neurones en «T» dont les corps cellulaires sont regroupés dans le ganglion plexiforme, quelques millimètres à l'extérieur de la boîte crânienne au niveau du tronc cérébral. Une projection dendritique s'étend vers les organes et une autre, axonale cette fois, rentre dans le tronc cérébral par la corne dorsale du vague puis pénètre dans le tronc cérébral en formant le faisceau solitaire jusqu'au NTS . Dans cette région, les neurones du nerf vague établissent des connexions avec les neurones de second ordre parmi lesquels on distingue quatre catégories de neurones. Ces catégories sont déterminées par la nature des neuromédiateurs, des précurseurs ou des enzymes que ces neurones synthétisent. Le nerf vague établit donc des connexions avec les neurones synthétisant du peptide GLP-1 (Glucagon Like Peptide 1, neurones GLP1), les neurones synthétisant du CART (115), les neurones catécholaminergiques (synthétisant l'enzyme tyrosine hydroxylase), et les neurones POMC. Parmi ces quatre différents types de neurones seuls deux étendent des projections vers l'hypothalamus et sont nécessaires au contrôle de la prise alimentaire en conditions physiologiques: les neurones POMC et les neurones catécholaminergiques. Une étude récente a montré que parmi ces deux populations de neurones une seule, les neurones POMC étaient indispensables au contrôle de la prise alimentaire .

A l'autre extrémité des neurones du nerf vague, c'est à dire au niveau du tube digestif, trois types de terminaisons nerveuses sont présents. Les réseaux intramusculaires ou IMAs (intramuscular arrays) pénètrent les muscles circulaires et longitudinaux de la paroi de l'intestin et du tube digestif. Les IMAs sont importants dans la détection de la contraction ou de la tension à l'œuvre dans les tissus environnants. D'autres fibres se prolongent vers les réseaux du système nerveux entérique et communiquent avec ce système nerveux grâce à des condensations synaptiques importantes. Enfin, dans l'intestin notamment, certaines fibres afférentes se prolongent jusque dans la proximité de la muqueuse de l'intestin proximal (figure 17).

A chacune de ces terminaisons va correspondre une des modalités de la sensibilité viscérale, soit la sensibilité mécanique soit la sensibilité chimique. Ici nous nous intéresserons tout particulièrement à cette dernière et notamment à son rôle dans la détection de nutriments au cours de la digestion.

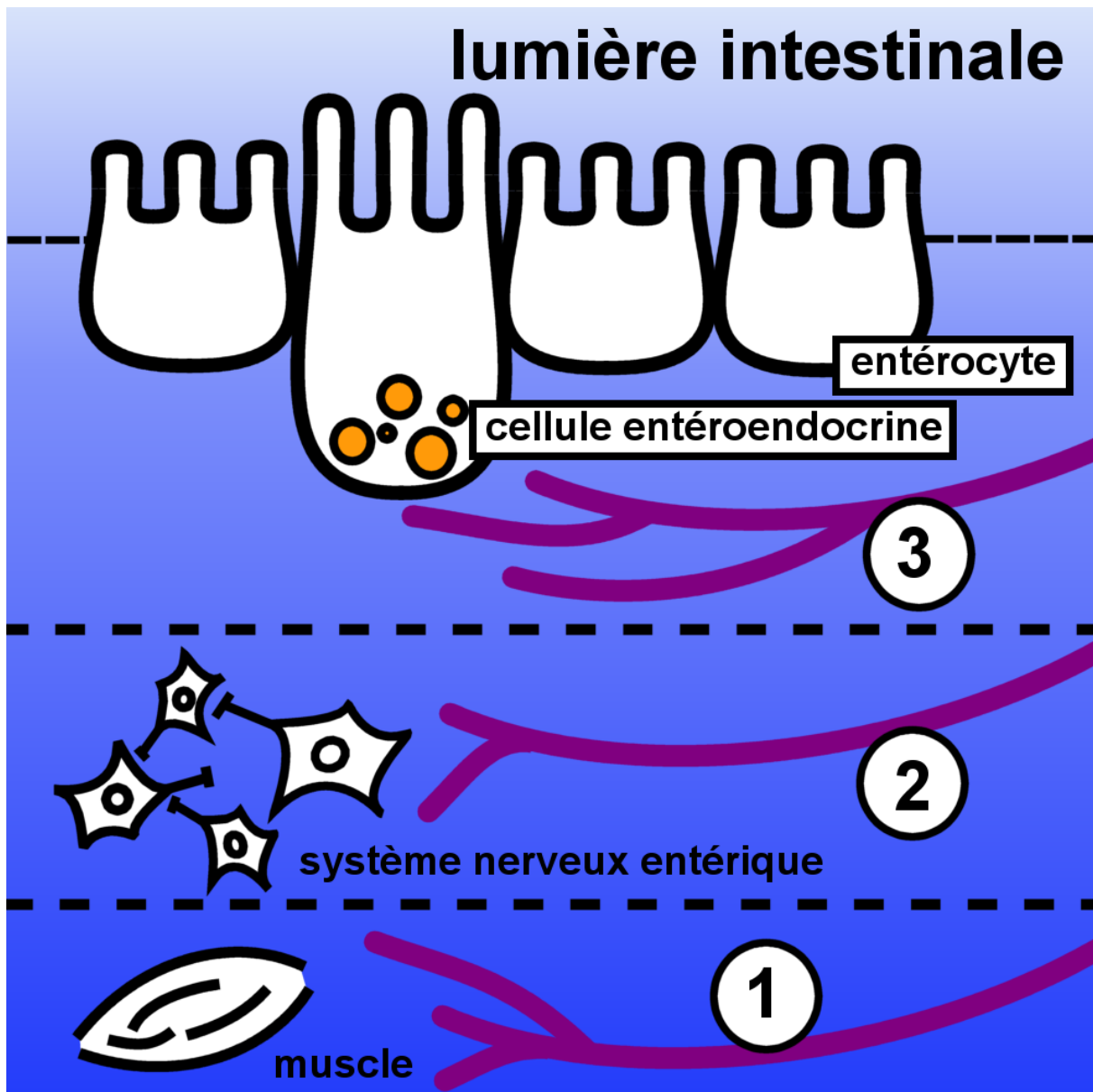


Figure 17: les modalités de l'innervation de l'intestin par le nerf vague.

(1) Le nerf vague innerve les muscles circulaires et longitudinaux situés autour de l'intestin. (2) Le nerf vague établit des connexions avec le système nerveux entérique. (3) Des terminaisons libres s'étendent jusque dans le voisinage proche des cellules entéroendocrines juste sous la muqueuse intestinale.

La détection des nutriments dans l'intestin et la génération de signaux anorexigènes depuis le tube digestif

Principes généraux de la détection de macronutriments dans la lumière intestinale

Dispersées le long de l'intestin, au niveau de la membrane épithéliale, les cellules entéroendocrines (CEECs) produisent une grande variété de médiateurs et de neuromédiateurs digestifs, comme la sérotonine, le NPY, ou la cholécystokinine. La plupart de ces cellules sont situées à proximité de terminaisons vagales, qui sont les cibles des médiateurs libérés par les CEECs (45). La libération des médiateurs est, vraisemblablement, spécifiquement influencée par de nombreux facteurs externes tels que la présence d'un type de macronutriment dans la lumière intestinale ou par la présence d'un facteur circulant dans le milieu basal interstitiel. En libérant ces médiateurs les CEECs modulent (parfois fortement) l'activité spontanée des afférences du nerf vague situées à proximité. L'augmentation de l'activité des afférences du nerf vague est souvent considérée comme un signal anorexigène envoyé vers le système nerveux central.

Exemple de la CCK

La cholécystokinine (CCK) est un bon exemple de ces médiateurs anorexigènes. Produite par les cellules entéroendocrines de type «I», la CCK est libérée dans le milieu interstitiel en réponse au passage, dans la lumière intestinale, de certains nutriments tels que des acides gras à chaîne longue et des oligopeptides (36; 87; 89). L'action de la CCK est double. Elle régule d'abord les fonctions digestives locales et participe ainsi à l'adaptation de la mécanique digestive aux capacités absorbatives du tube digestif (contraction de la vésicule biliaire, stimulation de la sécrétion enzymatique du pancréas, stimulation du péristaltisme intestinal et inhibition de la motricité gastrique et de la vidange gastrique). Mais la CCK exerce aussi un effet anorexigène puissant à court terme (82) . Dans l'intestin proximal la CCK interagit avec les récepteurs CCK₁ exprimés par les terminaisons vagales situées à proximité des cellules entéroendocrines, et augmente la décharge spontanée des afférences vagales. C'est principalement l'action de la CCK sur le nerf vague qui constitue le message relatif à la présence spécifique de certains nutriments dans l'intestin (96; 98)(figure 18).

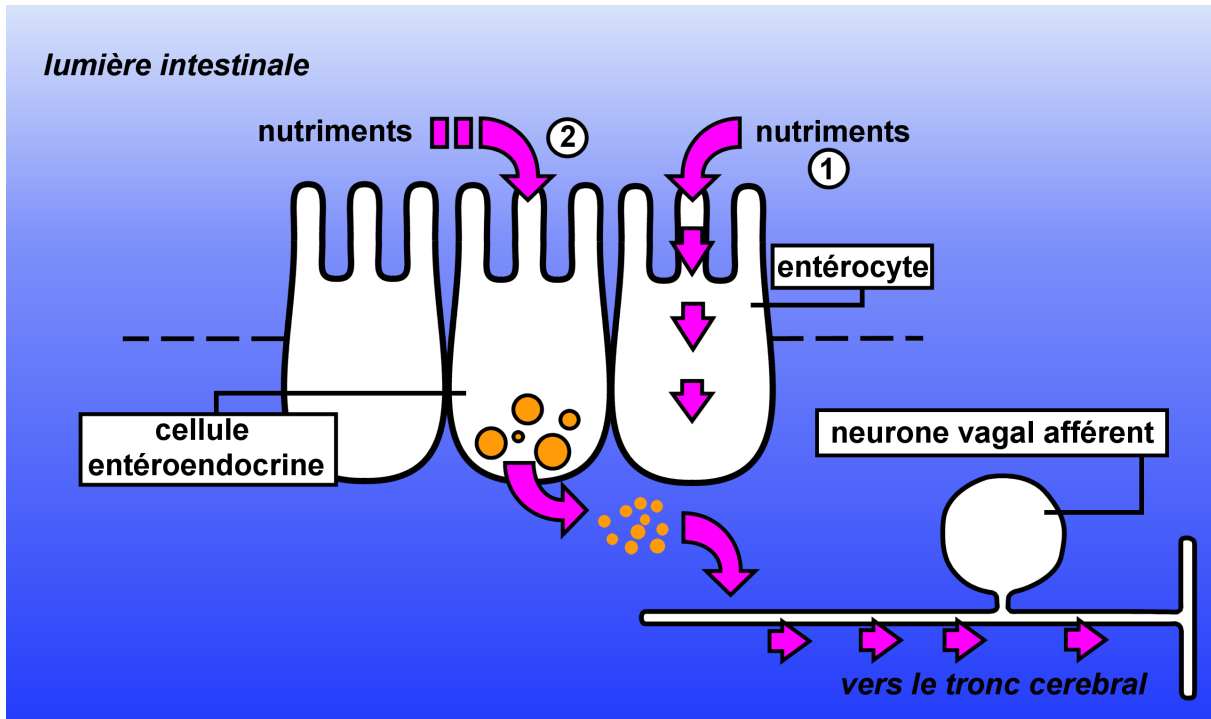


Figure 18: La détection des nutriments dans l'intestin.

1) Au cours de leur passage dans l'intestin les nutriments sont absorbés à travers la muqueuse intestinale. 2) De surcroît, les nutriments sont détectés et déclenchent la libération de médiateurs dans les cellules entéroendocrines. Ces médiateurs influencent l'activité du nerf vague et signalent ainsi au cerveau la présence spécifique de nutriments.

Présentation des études

Enjeux: Intéroception intestinale et comportement alimentaire

C'est dans ce contexte que s'inscrit notre étude. Nous savons en effet que les afférences vagales transmettent pendant la digestion des informations vers le système nerveux central. Ces informations, relatives par exemple à la mécanique digestive ou à la présence de nutriments dans l'intestin, peuvent influencer le comportement alimentaire. Le rôle de ces informations semble être important, voire déterminant, dans le contrôle du comportement alimentaire, notamment dans le contrôle immédiat de l'ingestion pendant un repas. Il apparaît de ce fait que la compréhension des mécanismes de la viscérosensibilité parasympathique, notamment de la capacité à détecter la présence spécifique de macronutriments dans la lumière intestinale au cours de la digestion, est un phénomène critique dans le contrôle de la prise alimentaire. C'est en effet ce phénomène qui est en particulier associé à la libération de CCK et à son influence sur la prise alimentaire. La compréhension de ces mécanismes ouvre un champ de stratégies thérapeutiques pour lutter contre l'augmentation préoccupante du surpoids et de l'obésité dans nos sociétés modernes.

Plus de vingt ans après avoir été pressentis par Jacques LeMagnen comme importants dans le contrôle de la prise alimentaire (65), les phénomènes cités ici restent toutefois mal compris, et si on s'accorde sur l'idée que la sensibilité viscérale revêt une importance toute particulière dans le phénomène de contrôle de la prise alimentaire, nos connaissances sur l'intéroception, et plus particulièrement ses mécanismes précis et son implication dans le contrôle du comportement alimentaire, restent très

fragmentaires. Enfin, la plasticité de ces mécanismes, c'est-à-dire la capacité que possède ce système sensoriel à réguler sa propre activité, semble aussi un phénomène critique dans la survenue de l'obésité.

L'objet de ces études a donc été de participer à répondre aux trois questions suivantes: (1) Quels sont les mécanismes précis qui permettent la détection des macronutriments lors de leur passage dans l'intestin ? (2) Dans quelle mesure ce phénomène participe-t-il au contrôle de la prise alimentaire et à la régulation du poids corporel ? (3) Existe-t-il une plasticité, c'est à dire d'une adaptation à long terme du système intéroceptif intestinal dans des cas de stimulation chroniques ? (Figure 19).

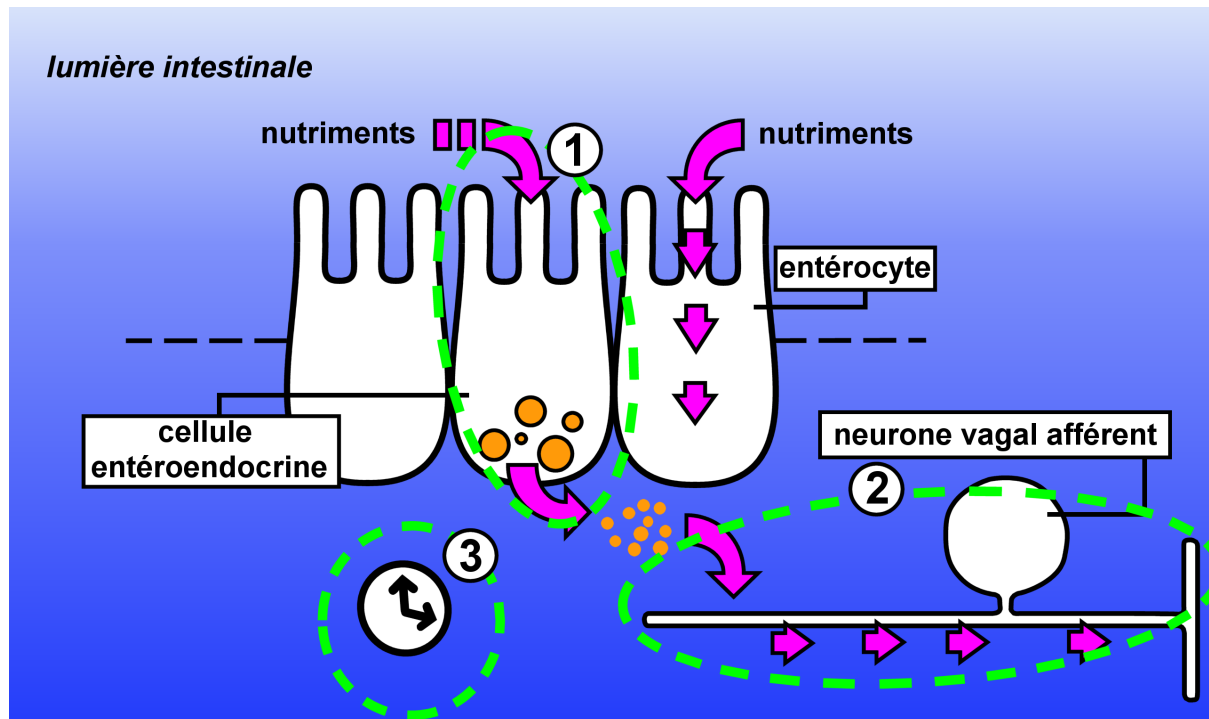


Figure 19: Les questions

Dans cette étude nous allons tenter de comprendre 1) Les mécanismes cellulaires de la détection des macronutriments dans l'intestin. 2) Le rôle précis du nerf vague dans l'action de ces phénomènes sur le comportement alimentaire et 3) L'évolution temporelle de ces systèmes de détection dans des conditions de stimulation chronique.

L'étude des mécanismes biologiques précis de la détection des macronutriments dans l'intestin

Nous tenterons d'apporter des éléments de réponse concernant les mécanismes biologiques cellulaires précis qui sous-tendent la détection de chacun des macronutriments (1^{ère} question). Nous présenterons trois aspects de la détection des macronutriments dans l'intestin, chacun de ces aspects étant associé à un macronutriment spécifique et à un événement précis de la cascade de transduction mise en jeu.

Nous aborderons d'abord les systèmes impliqués dans la détection du glucose dans la lumière intestinale (étude 1) puis les phénomènes transmembranaires qui leur sont associés (étude 2). Ensuite, nous étudierons les modalités de la détection des acides gras à chaîne longue au cours de la digestion et notamment l'implication d'afférences vagales CCK sensibles (étude 3). Enfin nous étudierons les phénomènes permettant la détection des protéines lors de leur passage dans l'intestin, et plus particulièrement nous tenterons de montrer qu'il existe un «transporteur membranaire » responsable de la détection des protéines (étude 4).

Implications de la sensibilité viscérale dans le contrôle de la prise alimentaire et plasticité à long terme du système intéroceptif

Ensuite reviendrons sur les modalités par lesquelles la sensibilité du nerf vague aux nutriments peut, ou ne peut pas, être à l'origine de changements dans le comportement alimentaire et la prise de poids (2^{ème} et 3^{ème} questions). Nous nous concentrerons sur le cas de la détection des protéines. Nous étudierons d'abord l'implication du nerf vague dans le contrôle des fonctions digestives et de la satiété à travers deux approches, l'une par mesure immunohistochimique d'un marqueur de l'activité du système nerveux central (étude 5) et l'autre par vagotomie chimique, toutes deux en condition de régime hyper-protéique (étude 6).

Première Partie:

*Mécanismes cellulaires et moléculaires responsables de la détection
du glucose dans l'intestin au cours de la digestion*

Introduction

Produit de la digestion des glucides, le glucose est un substrat important pour le métabolisme énergétique. Au cours de l'évolution, les organismes multicellulaires, et notamment les mammifères, ont développé des systèmes permettant de détecter la présence de glucose dans l'ingesta.

On peut considérer l'intestin comme un organe sensoriel capable de détecter la présence des nutriments au cours de la digestion (86). Pendant la phase intestinale de la digestion des signaux sont envoyés, principalement depuis le duodénum, vers le système nerveux central, indiquant la présence de glucose. Ce phénomène a deux conséquences. Tout d'abord il permet de réguler les processus de digestion pour adapter les cinétiques digestives à la capacité absorptive de l'intestin dans le but d'augmenter l'efficacité de la digestion. Mais l'émission de signaux relatifs à la présence de glucose dans l'intestin initie aussi des changements comportementaux, notamment en influençant la prise alimentaire.

L'existence de ces rétrocontrôles implique qu'il existe des détecteurs sensibles à la présence de glucose dans l'intestin et d'un système relayant l'information vers les centres de contrôle de la mécanique digestive et du comportement alimentaire. Comme nous l'avons proposé en introduction il est souvent avancé que ces systèmes relais sont constitués par les afférences vagales (fibres parasympathiques sensibles) qui sont par ailleurs connues pour innerver massivement l'intestin proximal.

La détection du glucose dans l'intestin.

Rôle de la sérotonine

Les glucides alimentaires sont connus pour stimuler la libération de nombreuses substances dans l'intestin au cours de la digestion, tels que le glucagon like peptide (GLP1) ou la sérotonine (5HT) (figure 20). Cette dernière semble être impliquée dans les mécanismes de contrôle de la mécanique digestive et dans les modifications du comportement alimentaire induites par la présence de glucose dans l'intestin (19; 35). En effet les fibres afférentes vagales semblent être extrêmement sensibles à la présence de 5HT dans leur environnement. En retour, les fibres nerveuses vagales lorsqu'elles sont activées conduisent à une modification des cinétiques digestives et à une modification des mécanismes de contrôle du comportement alimentaire.

La libération de 5HT par la muqueuse intestinale est le fait de cellules entéroendocrines localisées dans la muqueuse intestinale, adjacentes aux entérocytes. Ces cellules sont donc au même titre que les entérocytes en contact avec l'ingesta de la lumière intestinale.

Les oses simples comme le glucose, le galactose et le fructose sont les seuls glucides à être absorbés par la muqueuse intestinale. Le glucose et le galactose

pénètrent dans les entérocytes via les cotransporteurs glucose-sodium de la famille des SGLT situés sur la membrane apicale des entérocytes et ressortent dans la lymphe interstitielle par diffusion à travers le transporteur de glucose GLUT2.

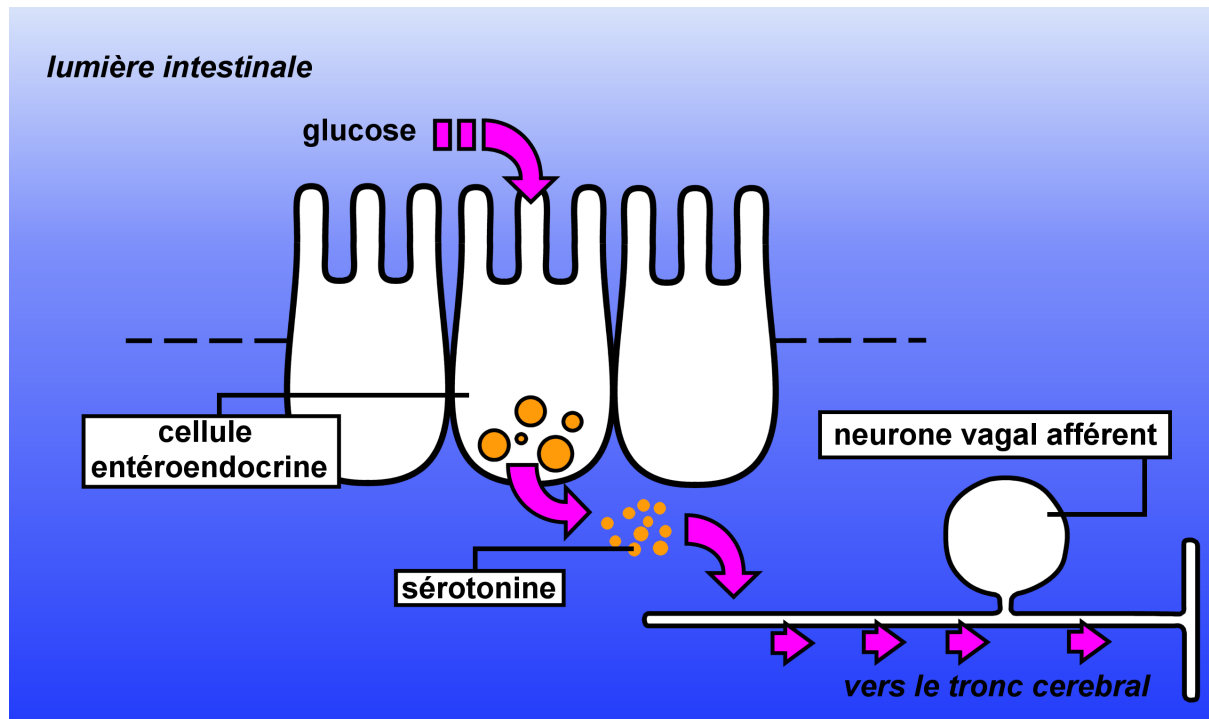


Figure 20: Principe général de la détection du glucose dans l'intestin.

Lors de la digestion le glucose est détecté pendant son passage dans l'intestin. Il provoque la libération de sérotonine par les CEECs; la sérotonine ainsi libérée stimule l'activité du nerf vague. L'augmentation de l'activité spontanée parasympathique a pour conséquence de réguler le fonctionnement de la mécanique digestive et le comportement alimentaire.

Implication des transporteurs membranaires du glucose

Des études récentes ont montré que c'est le transport via les transporteurs de type SGLT qui est à l'origine de la libération de sérotonine dans la lymphe interstitielle et par conséquent de la détection de l'absorption du glucose au cours de la digestion (94). Toutefois, on ignore quel transporteur précis, parmi les membres de la famille SGLT, est impliqué dans ces mécanismes d'initiation de la détection du glucose dans l'ingesta. On ne sait pas non plus quels sont les phénomènes intracellulaires qui conduisent à la libération de sérotonine par les cellules entéroendocrines.

Etude 1: Caractérisation du transporteur impliqué dans la détection du glucose dans l'ingesta, approche électrophysiologique.

Introduction

L'identification du transporteur de glucose impliqué dans la détection du glucose par la muqueuse intestinale est une étape préalable à la compréhension des mécanismes qui régissent ce phénomène. Des études menées grâce à des substrats spécifiques, ont permis d'identifier, parmi les membres de la famille des transporteurs apicaux du glucose, la famille des SGLT, deux transporteurs (SGLT1 et SGLT3) potentiellement responsables de ces phénomènes (94).

Les transporteurs SGLT sont des transporteurs qui utilisent le gradient de sodium comme force motrice pour faciliter la diffusion des monosaccharides comme le glucose ou le galactose (111). SGLT1 possède une affinité élevée et une spécificité faible pour ses substrats. En revanche SGLT3, s'il est similaire dans sa structure à SGLT1, présente une affinité faible mais une plus grande spécificité. Il est par exemple spécifique au glucose mais ne transporte pas de galactose.

Sur la base de ces constatations nous avons essayé de déterminer lequel de SGLT1 et SGLT3 initie la réponse à la présence de glucose dans l'intestin (figure 21).

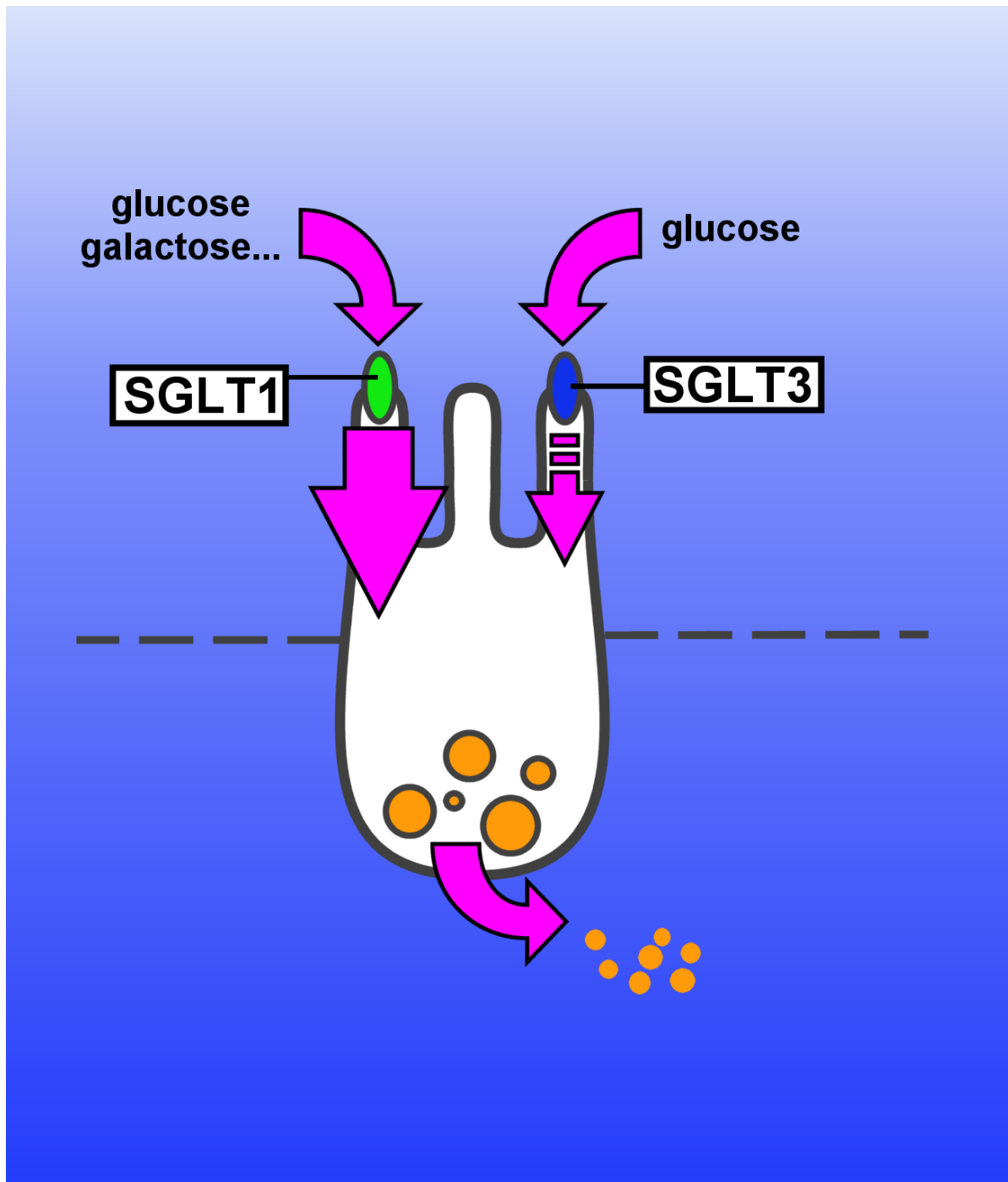


Figure 21: Deux candidats pour la détection des glucides simples dans l'intestin.

SGLT1 possède une affinité élevée et une spécificité faible pour ses substrats. En revanche SGLT3 présente une affinité faible mais une plus grande spécificité. Par exemple SGLT1 peut se lier au galactose et le transporter, SGLT3 ne le peut pas.

Dans une préparation de duodénum isolé à partir de laquelle il nous était possible d'enregistrer l'activité spontanée des afférences vagales par électrophysiologie, nous avons testé l'effet d'un substrat commun aux deux transporteurs et d'un substrat spécifique à SGLT3 sur la décharge spontanée des afférences vagales en provenance du duodénum.

Matériels et méthodes

Animaux et préparations de solutions

Des rats (Sprague-Dawley), pesant entre 200g et 300g, hébergés dans une pièce maintenue à température constante (21-23°C), ayant accès libre à la nourriture et à l'eau ont été utilisés pour ces expériences. La solution de 2-Methyl-5-hydroxytryptamine (analogue de synthèse de la 5HT) a été réalisée par dissolution de 2-methyl-5HT dans du liquide physiologique, la concentration étant de 1 $\mu\text{mol.L}^{-1}$. Les solutions pour les perfusions intra-duodénales de glucose ou de galactose ont été réalisées dans du liquide physiologique à hauteur de 0.5 mol.L^{-1} . Le tampon physiologique utilisé pour l'électrophysiologie contenait: (en mM) 140 NaCl, 5KCl, 1 MgCl₂, 1.3 Na₂HPO₄, 5 Hepes, 2 CaCl₂, et 10 D-glucose. Le pH du tampon était stabilisé à 7.38 ± 0.02 .

Enregistrement des décharges spontanées des afférences vagales

Cette méthode est décrite en précision en annexe 1. Brièvement, les rats sont décapités et un segment du tube digestif depuis l'œsophage jusqu'au duodénum est retiré et placé immédiatement dans du liquide physiologique oxygéné maintenu à 33°C. Le nerf vague est identifié, isolé de l'estomac et de l'œsophage avant que ces derniers ne soient retirés de la préparation. L'intestin reçoit deux canules intra-luminales permettant la perfusion des solutions à tester et leur évacuation, et une canule intra-aortique donnant accès à la circulation sanguine. L'estomac et l'œsophage sont retirés. Le nerf vague est disséqué et placé sur le pôle d'une électrode de platine. Un morceau de tissu conjonctif environnant est placé sur l'autre pôle de l'électrode et sert de référence. Lors de l'enregistrement l'extrémité de l'électrode est recouvert d'huile minérale, assurant l'isolation des deux pôles. La vitesse de perfusion des solutions est de 2.0–2.5 mL/min. Chaque solution est suivie, 5 min après, d'un rinçage de la lumière du duodénum par du liquide physiologique.

Analyse des enregistrements

Les potentiels d'actions ainsi enregistrés sont envoyés vers un amplificateur (AM System 1700 differential AC Amplifier) affichés sur un oscilloscope (modèle 3012, Tektronix) et enregistrés simultanément sur un ordinateur (PC) équipé du logiciel Spike2 via un module de conversion A/D (Micro 1401 MK2, CED). Les potentiels d'action pouvant provenir de plusieurs neurones, nous effectuons une discrimination

des signaux basée sur certains paramètres morphologiques de la forme d'onde qu'ils génèrent.

On considère qu'une fibre répond à une stimulation lorsque son coefficient de réponse (= moyenne des potentiels d'action pendant la première minute suivant la stimulation/moyenne des potentiels d'action pendant la dernière minute précédant la stimulation) est supérieur ou égal à 1.2. À l'inverse on considère qu'il n'y a pas de réponse spécifique à une stimulation si le coefficient de réponse est inférieur à 1.2.

Enregistrement des décharges spontanées des afférences vagales en réponse à la perfusion de glucose et de galactose.

Après avoir été placées sur l'électrode, les fibres sont laissées au repos pendant 30 minutes avant le début du protocole expérimental. Dans un premier temps, un volume de 0.2 mL de la solution de 2-méthyl-5HT est injecté dans la canule intra-aortique et ne sont conservées que les unités neuronales répondant à cette injection (donc sensibles à la sérotonine). Ensuite, une solution de glucose est perfusée dans la canule intra-duodénale. La perfusion dure 1 min et est laissée dans la lumière duodénale pendant les 4 minutes suivantes. Le contenu de l'intestin est rincé avec du liquide physiologique. Puis, 15 minutes plus tard, une solution de galactose est perfusée dans la canule intra-duodénale et, de la même façon, y est laissée 5 min avant d'être rincée par du sérum physiologique.

Résultats

Les résultats obtenus sont présentés dans la table 1. 17 rats ont été utilisés pour cette expérience. Il a été possible de trouver 7 fibres nerveuses (correspondant à 7 préparations sur les 17 initiales) présentant une activité stable et ayant répondu à la 2-méthyl-5HT. Pour 6 de ces fibres une discrimination des unités neuronales a permis d'identifier 23 neurones dont 19 étaient sensibles à la sérotonine. Parmi ces 19 neurones (provenant de 5 préparations différentes), 6 ont répondu au glucose et parmi les neurones ayant répondu à la perfusion intra-duodénale de glucose aucun n'a répondu à la perfusion intra-duodénale de galactose.

Nombre de rats	17		
Nombre de fibrés isolées, stables	7		
Neurones identifiés	23	à partir de	6 préparations
Neurones répondant à la 5HT *	19 (soit 83%)		
Neurones répondant au glucose **	6 (soit 32%)		
Neurones répondant au galactose ***	0 (soit 0%)		

Table 1: Résultats de l'enregistrement électrophysiologique de l'activité spontanée du nerf vague en réponse à de la sérotonine, du glucose ou du galactose. *parmi les neurones identifiés; **parmi les neurones répondant à la 5HT; ***parmi les neurones répondant à au glucose.

Discussion

L'étude menée ici sur des fibres sensibles à la sérotonine montre qu'une perfusion de glucose dans la lumière du duodénum stimule l'activité spontanée des afférences vagales en provenance du duodénum. Cet effet n'est pas observé pour une perfusion intra-duodénale de galactose.

Cette étude suggère fortement l'implication du transporteur SGLT3 dans la détection du glucose dans l'intestin. En effet, le galactose qui n'est pas un substrat de SGLT3 mais un substrat de SGLT1 uniquement est incapable de déclencher une augmentation de l'activité spontanée des afférences du nerf vague. A l'inverse, le glucose, substrat présentant une affinité pour les deux récepteurs SGLT1 et SGLT3, peut déclencher une augmentation de l'activité spontanée du nerf vague. Il s'agit ici de la première étude soutenant l'hypothèse de l'implication du transporteur SGLT3 dans la détection du glucose dans l'intestin. Elle doit toutefois être confirmée par d'autres études utilisant des approches expérimentales complémentaires.

La présence du transporteur SGLT3 dans les CEECs n'a pas encore été confirmée. Mais il a été montré qu'une lignée de cellules de type entéroendocrine, libérant de la sérotonine, donc présentant un phénotype très proche des CEECs intestinales, les cellules STC-1, exprime les deux types de récepteurs SGLT1 et SGLT3 (34). Ainsi, il se peut que les cellules entéroendocrines de l'intestin libérant de la 5HT possèdent aussi les deux isoformes du récepteur. Dans ces cellules SGLT3 pourrait

être l'initiateur de la réponse au glucose et agir comme un détecteur membranaire de la présence de glucose dans le contenu digestif.

Perspectives

L'étude présentée ici suggère que le transporteur SGLT3 est un détecteur du glucose dans l'intestin. Si l'élément directement responsable de la transduction du signal relatif à la détection du glucose dans l'intestin semble être identifié, les mécanismes cellulaires qui conduisent à la libération de sérotonine par les cellules entéroendocrines intestinales restent encore mal connus. Il s'agit de comprendre maintenant quels sont ces mécanismes biologiques établissant un lien entre la détection du glucose par SGLT3 et la libération de sérotonine.

Etude 2: Les mécanismes cellulaires responsables de l'induction de la libération de sérotonine par les cellules entéroendocrines lors de l'action du glucose sur le transporteur de glucose SGLT3.

Introduction

Si SGLT3 semble jouer un rôle de détecteur dans la perception intestinale du glucose, les mécanismes consécutifs contribuant à la libération de sérotonine par exocytose par les cellules entéroendocrines sont inconnus.

Biologie cellulaire de la libération de médiateurs

Tout d'abord, pour mieux tenter de comprendre ces phénomènes il est nécessaire de détailler le fonctionnement du phénomène d'exocytose. Les mécanismes cellulaires de l'exocytose, c'est à dire de la fusion de vésicules stockées dans le cytoplasme avec la membrane plasmique, entraînant de ce fait la libération du contenu des vésicules, sont un phénomène ubiquitaire conservé chez de très nombreuses espèces unicellulaires ou multicellulaires (77).

Au repos, une cellule sécrétrice possède des vésicules contenant des médiateurs en forte concentration, stockées le long de la membrane plasmique. Prisonnières d'un dense réseau cytosquelettique local, ces vésicules ne peuvent pas fusionner avec la membrane plasmique. S'il persiste encore aujourd'hui beaucoup de

zones d'ombre quant aux déterminants exacts de la libération de ces vésicules, il est toutefois acquis que c'est, avant tout, l'augmentation locale d'ion calcium (Ca^{2+}) intracellulaire qui peut être considérée comme la première étape de l'exocytose. Très schématiquement, l'élévation locale de la concentration de Ca^{2+} est due à l'entrée d'ions Ca^{2+} externes dans le cytoplasme via des canaux calciques transmembranaires, dépendants du voltage transmembranaire (canaux calciques voltage-dépendants) ou bien de la présence de certains médiateurs intracellulaires (canaux calciques non voltage-dépendants). Ce phénomène d'élévation transitoire de la concentration en ions Ca^{2+} est amplifié par l'ouverture de réserves de calcium intracellulaires dont les canaux d'entrée sont sensibles aux concentrations intracellulaires de calcium. En se couplant à la calmoduline, le calcium forme un complexe qui va permettre de libérer les vésicules d'exocytose et donc de re-larguer leur contenu en dehors de la cellule (77).

Deux mécanismes possibles pour la libération de sérotonine induite par la présence de glucose.

Le phénomène de libération de la sérotonine par les CEECs sérotoninergiques obéit aussi à cette règle. La question se pose alors de connaître les mécanismes qui conduisent à l'augmentation de la concentration de Ca^{2+} intracellulaire dans ces cellules.

Deux hypothèses peuvent être proposées. Tout d'abord, il peut s'agir d'un phénomène de dépolarisation membranaire qui conduit à l'ouverture de canaux calciques transmembranaires. Ce mécanisme est fréquent et est observé dans les

phénomènes de sécrétion d'insuline en réponse à la présence de glucose par les cellules β du pancréas (85) (figure 22). Dans ce cas, en effet, l'entrée de glucose dans la cellule conduit à la synthèse et donc à l'élévation des taux intracellulaires d'ATP. Ceci a pour effet de fermer des canaux transmembranaires spécifiques au potassium ATP-dépendants conduisant ainsi à la dépolarisation de la membrane plasmique. Par la suite, l'ouverture des canaux calciques voltage-dépendants, déclenchée par cette dépolarisation cause une élévation de la concentration intracellulaire de calcium. Ceci permet la libération des vésicules d'exocytose (contenant dans ce cas de l'insuline). La sécrétion de CCK est aussi vraisemblablement contrôlée par un phénomène électrique transmembranaire semblable dans les cellules STC1 (68; 69). Toutefois, cette hypothèse se heurte à une constatation expérimentale réalisée sur des cellules de type BON selon laquelle ces cellules entéroendocrines (et donc vraisemblablement pas leurs homologues *in vivo*) ne possèdent pas de canaux potassium ATP dépendants.

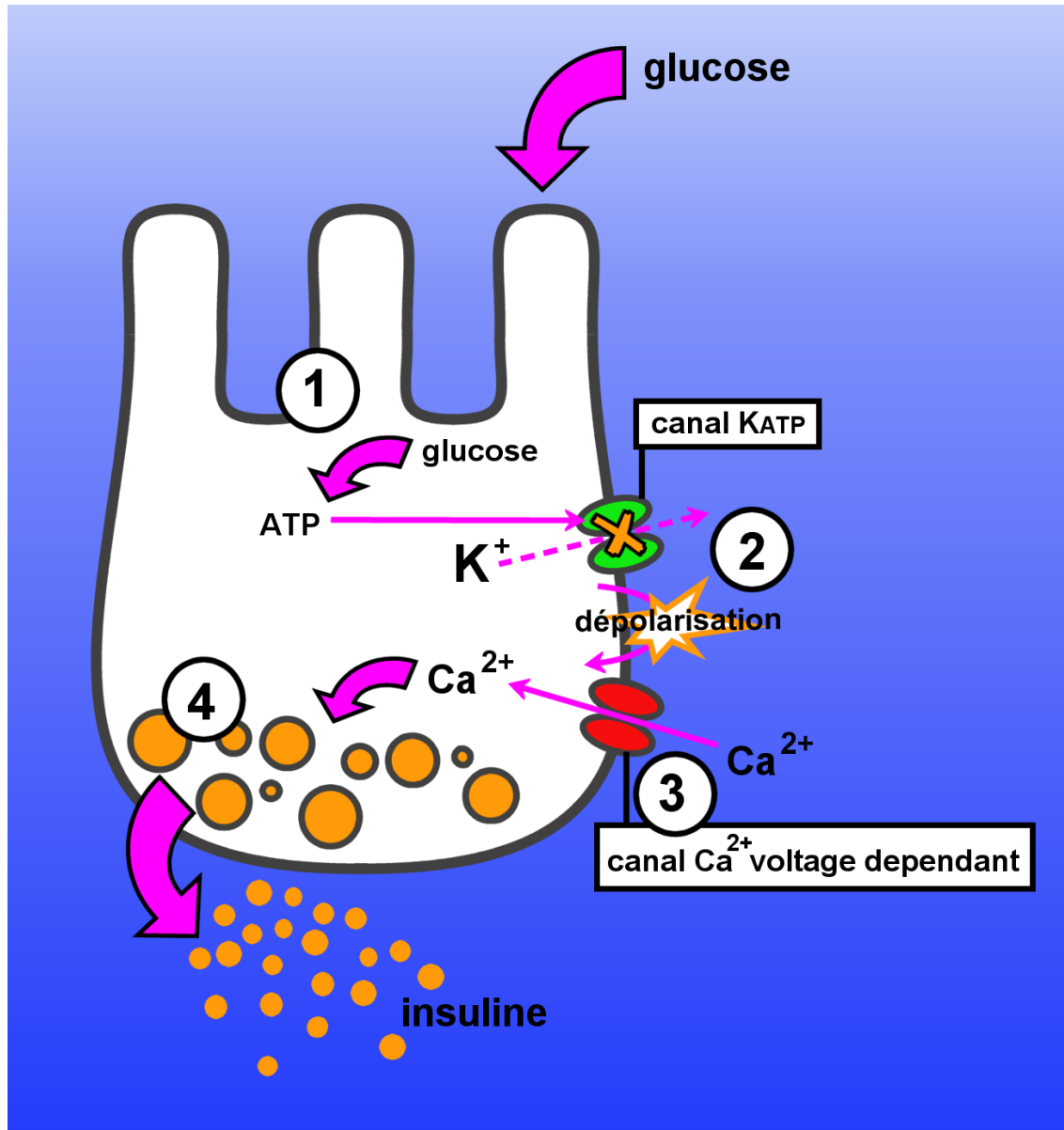


Figure 22: La détection du glucose par les cellules bêta du pancréas.

1) L'entrée de glucose dans la cellule permet de produire de l'ATP. 2) L'augmentation des taux d'ATP dans la cellule a pour conséquence la fermeture des canaux K_{ATP} (canaux potassium ATP dépendants), la modification de la perméabilité membranaire (baisse de la conductivité au potassium) conduit à une dépolarisation de la cellule (accumulation d'ion K⁺ dans le milieu intracellulaire). 3) Cette dépolarisation provoque l'ouverture des canaux Ca²⁺ voltage-dépendants, conduisant à une augmentation de la concentration intracellulaire d'ion Ca²⁺, qui permet l'exocytose d'insuline, 4.

Selon une seconde hypothèse il pourrait s'agir d'abord d'une activation de seconds messagers intracellulaires qui aurait pour conséquence l'ouverture de canaux calciques non voltage-dépendants. Il a par ailleurs été remarqué que l'activité de SGLT1 et SGLT3 était corrélée à une activation de l'adénylate cyclase par une protéine G, et, par conséquent, à une augmentation des taux intracellulaires d'AMP_c connus pour être un second messenger intracellulaire pouvant affecter la conductivité de la membrane à certains ions, notamment le calcium. En somme deux phénomènes sont proposés: soit la détection du glucose met en jeu une dépolarisation transmembranaire (effet direct sans l'intervention de seconds messagers intracellulaires) et par conséquent une entrée de calcium déclenchée par une dépolarisation de la cellule, soit il s'agit d'un phénomène « électriquement silencieux » impliquant alors des seconds messagers intracellulaires (113) .

Objectif de l'étude

Nous avons choisi de déterminer dans cette étude si la détection du glucose était un phénomène impliquant une dépolarisation transmembranaire (figure 23).

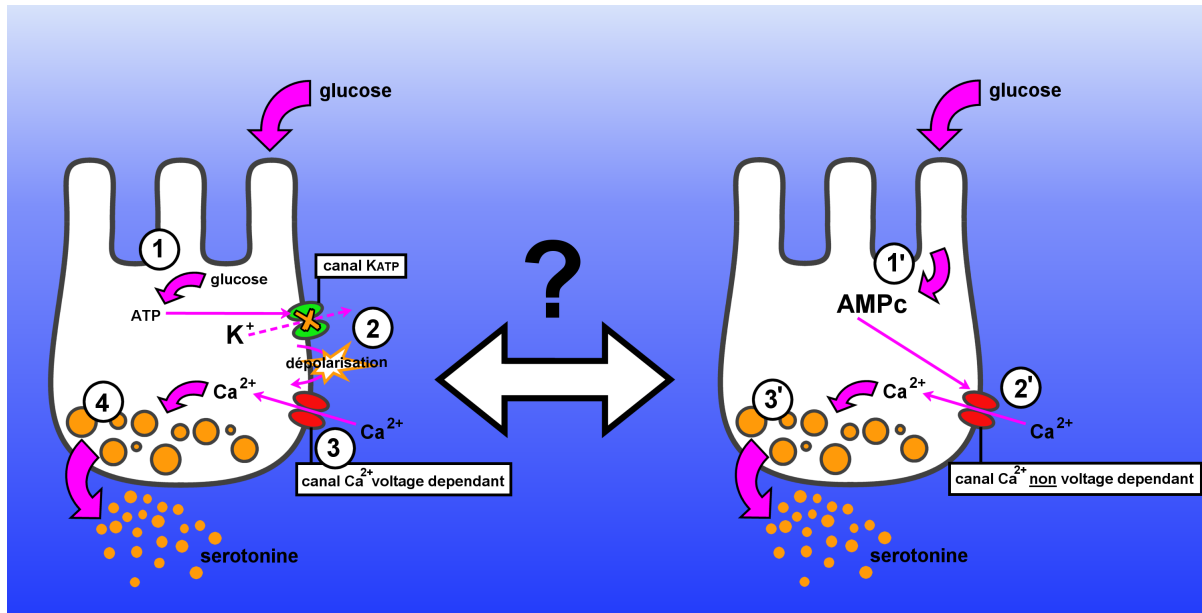


Figure 23: Deux hypothèses pour la détection du glucose par les cellules entéroendocrines de l'intestin.

PREMIERE HYPOTHESE: 1) L'entrée de glucose dans la cellule permet de produire de l'ATP. 2) L'augmentation des taux d'ATP dans la cellule a pour conséquence la fermeture des canaux K_{ATP} (canaux potassium ATP-dépendants). La modification de la perméabilité membranaire (baisse de la conductivité au potassium) conduit à une dépolarisation de la cellule (accumulation d'ion K^+ dans le milieu intracellulaire). 3) Cette dépolarisation provoque l'ouverture des canaux Ca^{2+} voltage-dépendants, conduisant à une augmentation de la concentration intracellulaire d'ion Ca^{2+} , qui permet 4) l'exocytose de sérotonine. SECONDE HYPOTHESE: 1') le transport du glucose par un transporteur (SGLT3) déclenche une cascade de réactions intracellulaires, conduisant à 2') l'ouverture de canaux calciques non voltage-dépendants, conduisant à une augmentation de la concentration intracellulaire d'ion Ca^{2+} , qui permet 3') l'exocytose de sérotonine.

Présentation de la démarche expérimentale

Nous avons choisi de travailler sur des cultures de cellules de type entéroendocrine. Nous avons utilisé les cellules BON, communément utilisées comme modèle d'étude de la sécrétion de sérotonine dans l'intestin, ainsi que les cellules STC1 qui constituent, elles, un modèle répandu d'étude des phénomènes de libération de CCK dans l'intestin. Grâce à la technique du patch clamp (annexe 2) (78) , nous avons étudié les changements de potentiel transmembranaire des cellules en fonction de la présence ou non de glucose dans le milieu.

Matériel et méthodes

Culture de cellules

Des cellules de type BON et STC1, (gracieusement offertes par les Dr C.M. Townsend et D. Hanahan, respectivement) ont été cultivées dans du HG-DMEM (High Glucose-Dubleco modified Earls Medium) contenant 15% de sérum de cheval, 2.5% de sérum de veau fœtal, de 2 mM de L-glutamine, de 100 U/mL de pénicilline et de 1 µg/ mL de streptomycine. Les cellules ont étéensemencées sur des lamelles de verre contenues dans des boîtes de Pétri. Les cellules ont été conservées à 37°C sous une

atmosphère contenant 5% de CO₂. Pour les expériences de patch clamp des cellules à 70~80% de confluence étaient utilisées.

Solutions

Quatre solutions ont été utilisées pour les expériences de patch clamp: une première solution intracellulaire pour remplir l'intérieur de l'électrode de verre, une seconde solution extracellulaire standard utilisée dans la chambre d'enregistrement, une troisième solution extracellulaire riche en glucose (solution extracellulaire contenant 60 mM de glucose) et une quatrième et dernière solution extracellulaire riche en potassium permettant de vérifier la dépolarisation de la cellule.

La solution intracellulaire (électrode) était composée de: 136 mM de Cs–Aspartate, 30 mM de Hepes, 10 mM de NaCl, 2 mM d'ATP , et de 0.6 mM de GTP et ajustée a un PH de 7.3 avec du CsOH. La solution extracellulaire standard était composée de: 137 mM de NaCl, 5 mM de KCl, 1 mM de CaCl₂, 10 mM de glucose, 1.2 mM de MgCl₂, 0.44 mM de KH₂PO₄, 4.2 mM de NaHCO₃, et de 20 mM de Hepes ajusté à un pH de 7.4 avec du NaOH. La solution extracellulaire riche en K⁺ était composée de: 142 mM de KCl, , 1 mM de CaCl₂, 10 mM de glucose, 1.2 mM de MgCl₂, 0.44 mM de KH₂PO₄, 4.2 mM de NaHCO₃, et de 20 mM de Hepes le tout étant ajusté à un pH de 7.4 avec du KOH, la concentration finale de K⁺ dans la solution était de 158 mM. La solution extracellulaire riche en glucose était composée de: 137 mM de NaCl, 5 mM de KCl, 1 mM de CaCl₂, 60 mM de glucose, 1.2 mM de MgCl₂, 0.44 mM de

KH₂PO₄, 4.2 mM de NaHCO₃, et de 20 mM de Hepes ajusté à un pH de 7.4 avec du NaOH.

Enregistrement du potentiel transmembranaire par la technique du patch clamp

La technique du voltage clamp a été utilisée pour cette étude. Basée sur le principe du patch clamp sur cellule entière (whole cell current clamp), les expériences ont été menées à 32°C. Le liquide extracellulaire était perfusé à une vitesse de 2.5mL /min. Des cellules sans larges extensions étaient choisies pour être enregistrées. Une micropipette de verre était obtenue par traction d'un tube de borosilicate (modèle PG150T, Harvard Apparatus). Les microélectrodes de verre ainsi réalisées devaient, pour être utilisées, présenter une résistance comprise entre 3 MΩ et 6 MΩ. L'électrode était remplie de la solution intracellulaire, montée sur un fil d'argent recouvert de chlorure d'argent, et insérée sur un socle permettant de créer une pression positive ou négative à l'extrémité de la pipette. L'ensemble était monté sur un micromanipulateur et approché, sous microscope de la cellule choisie préalablement. Un seau d'une résistance >à 1 GΩ était établi avant de perforer la membrane de la cellule. Dans ces expériences la résistance et la capacitance de série étaient compensées via le système d'acquisition de données. L'électrode était reliée à un amplificateur pour patch clamp de type Axopatch connecté à un ordinateur muni du logiciel pClamp (Axon Instruments). Le voltage transmembranaire était enregistré en temps réel et échantillonné à 4 kHz et filtré à 2kHz.

Protocole expérimental

Les cellules, une fois « patchées », étaient laissées sans intervention pendant 15 min pour stabiliser leur voltage transmembranaire. Dès lors, une solution extracellulaire de glucose était perfusée pendant 1 min avant d'être évacuée par une solution standard. Au moins 10 min plus tard, la solution riche en K^+ était perfusée, avant d'être rincée par la solution standard.

Résultats

Cellules de type BON

Les paramètres d'acquisition et les résultats sont présentés dans les tables 2 et 3 (figure 24). Suite à la perfusion de glucose, on observe une variation moyenne de potentiel transmembranaire de -2 mV, ceci ne représentant pas une variation significative pour les cellules de type BON. En revanche la perfusion d'un milieu extracellulaire riche en K^+ a entièrement dépolarisé ces cellules.

Cellules de type STC1

Les paramètres d'acquisition et les résultats sont présentés dans les tables 2 et 3 (figure 24). Pour les cellules STC1, suite à la perfusion de glucose on observe une variation moyenne de potentiel transmembranaire de 7 mV, ceci représentant une variation significative du voltage transmembranaire. De manière identique aux cellules BON, les cellules STC1 ont montré une dépolarisation quasi totale en présence de milieu extracellulaire riche en K^+ .

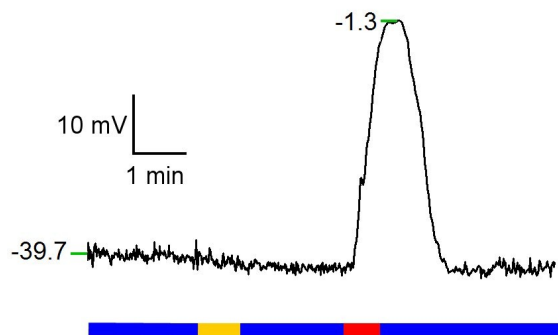
		BON (n=4)	STC1 (N=2)
résistance de la pipette	MΩ	5.25	7.75
résistance du joint	GΩ	1.525	2
résistance d'entrée de cellule	MΩ	368	675
capacitance de cellule	pF	55.75	9.9
résistance de série	MΩ	92.925	19.3
Potentiel de repos	mV	-37.75	-41.5

Table 2: Paramètres d'acquisition des enregistrements de patch clamp.

	Potentiel transmembranaire (mV)		réponse au glucose (% repolarisation)	réponse au Hi K ECS
	avant glucose (1 min)	après glucose (1 min)		
glucose 1	-41	-41	0	Oui
glucose 2	-35	-36	3	Oui
glucose 3	-30	-30	2	Oui
glucose 4	-33	-35	6	Oui
glucose 5	-39	-38	-4	Oui
glucose 6	-40	-39	-3	Oui
glucose 7	-35	-38	8	Oui
glucose 8	-40	-42	3	Oui
glucose 9	-41	-41	-1	Oui
groupe BON	-37	-38	2	Oui
SCTC1-1	-45	-41	-8	Oui
SCTC1-2	-41	-42	3	Oui
SCTC1-3	-46	-39	-14	Oui
groupe STC1	-44	-41	-7	Oui

Table 3: résultats des expériences de patch clamp.

Cell id: 09064C6 Trace: c Cell type: BON



Cell id: 09074C3 Trace: a Cell type: STC1

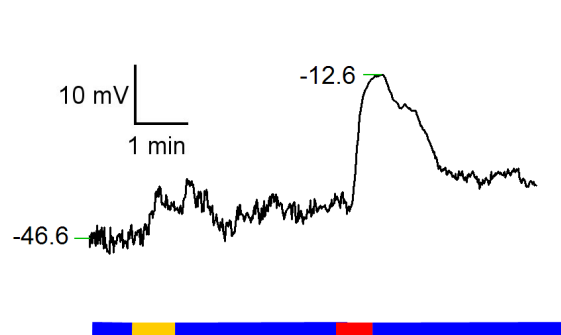


Figure 24: Effet du glucose sur le potentiel transmembranaire de deux types de cellules entéroendocrines

Pendant les périodes correspondant à un segment bleu, les cellules sont perfusées avec du milieu extracellulaire standard. Pendant les périodes correspondant à un segment jaune, les cellules sont perfusées avec du milieu extracellulaire enrichi en glucose. Pendant les périodes correspondant à un segment rouge, les cellules sont perfusées avec du milieu extracellulaire riche en ions K^+ . A gauche: effet sur une cellule de type BON (CEECs sérotoninergiques). A droite: effet sur une cellule de type STC1 (CEECs cholécystokininergiques).

Discussion

Cette étude montre que les cellules de type BON, à la différence des cellules de type STC1, ne modifient pas leur voltage transmembranaire en réponse à une perfusion de glucose. Leur capacité à se dépolariser n'est pourtant pas altérée puisque leur voltage transmembranaire s'annule lorsqu'une solution extracellulaire riche en ions K^+ est perfusée.

Ces résultats soutiennent l'hypothèse que la détection du glucose par les cellules entéroendocrines est un phénomène qui n'implique pas de modification du voltage transmembranaire. Ils confirment l'hypothèse avancée selon laquelle la détection du glucose par ces cellules au cours de la digestion repose sur une médiation intracellulaire impliquant des seconds messagers plutôt que des phénomènes ioniques transmembranaires.

Toutefois, rien ne montre que nous ayons assisté à la libération de sérotonine par les cellules dans cette expérience. Il se pourrait que, pour des raisons liées aux conditions d'expérimentation, les cellules BON étaient incapables de libérer la sérotonine. Dans ce cas, nous ne pouvons pas tirer de conclusion sur l'implication des phénomènes ioniques dans la libération de 5HT. Malheureusement, compte tenu du volume de la chambre d'enregistrement et du peu de cellules présentes dans la chambre nous ne pouvions pas mesurer la libération de ce médiateur. Cependant cette

éventualité reste très improbable étant donné que la libération de neuromédiateurs en conditions de patch clamp a été très souvent observée (68; 69).

Conclusion sur les mécanismes cellulaires de la détection du glucose dans l'intestin.

Au vu des expériences décrites dans ce chapitre nous tenterons ici de proposer un modèle de détection du glucose dans l'intestin au cours de la digestion.

La détection du glucose dans l'intestin semble être initiée, du moins en partie, par la liaison du glucose au transporteur SGLT3, sur des cellules entéroendocrines sérotoninergiques. Ce transporteur, proche du transporteur SGLT1, semble, à la différence de ce dernier, ne pas contribuer de façon significative à l'absorption de glucose, et pourrait jouer un rôle de détecteur membranaire spécifique au glucose.

Il est vraisemblable que la détection du glucose dans la lumière intestinale induise la production (ou l'activation) de seconds messagers intracellulaires, plutôt que des variations de voltage transmembranaire, conduisant à la libération de sérotonine intracellulaire.

Enfin il est prévisible que cette libération de sérotonine augmente l'activité spontanée des afférences vagales innervant le duodénum et contribue ainsi au contrôle de la mécanique digestive et du comportement alimentaire (figure 25).

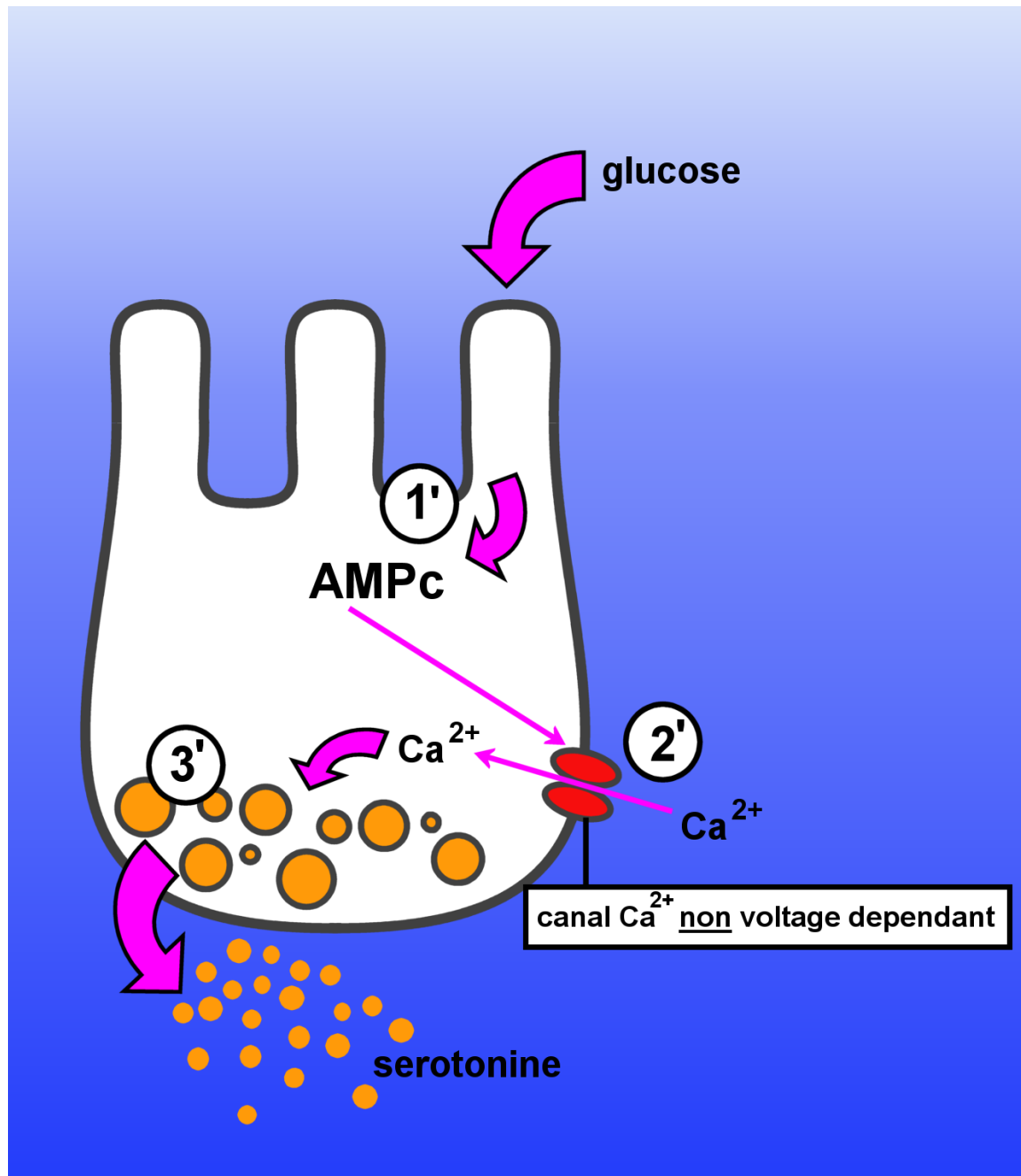


Figure 25: Mécanisme proposé de la détection du glucose dans l'intestin.

Le transport du glucose par un transporteur (SGLT3) déclenche 1') une cascade de réactions intracellulaires, 2') conduisant à l'ouverture de canaux calciques non voltage dépendant, conduisant à 3') une augmentation de la concentration intracellulaire d'ion Ca^{2+} qui permet l'exocytose de sérotonine.

Deuxième Partie:

*Mécanismes cellulaires responsables de la détection des acides gras
à chaîne longue dans l'intestin au cours de la digestion*

Introduction

La détection des acides gras par l'organisme

Les acides gras, notamment les acides gras à chaîne longue, sont des macronutriments essentiels au bon fonctionnement de l'organisme. Les acides gras à chaîne longue peuvent soit fournir de l'énergie par oxydation dans les mitochondries (β -oxydation des AG), soit devenir des constituants de l'organisme (structures, médiateurs...). C'est pourquoi, au cours de l'évolution, de nombreuses espèces, dont les mammifères, ont élaboré des stratégies permettant de détecter la présence et/ou la disponibilité en acides gras et plus particulièrement en acides gras à chaîne longue.

Au niveau cellulaire par exemple, le système des « ppars » permet de réguler certaines fonctions de transcription de la cellule en fonction de la présence d'acides gras (28; 39). Le système nerveux central détecte aussi la présence d'acides gras (62; 63).

Au cours de la digestion, la présence des acides gras dans l'ingesta semble pouvoir être détectée. La détection des acides gras dans l'intestin a pour principaux effets une modulation de la prise alimentaire (16; 43; 44) (tout particulièrement la survenue du rassasiement) et une modification des cinétiques digestives (motricité gastrique, vidange gastrique, péristaltisme intestinal) (66; 92).

Les mécanismes de détection des acides gras à chaîne longue dans l'intestin, au cours de la digestion.

Pour comprendre les mécanismes de la détection spécifique des acides gras à chaîne longue dans la muqueuse intestinale, il est nécessaire de connaître les voies d'absorption de ces composés par l'intestin. Les acides gras sont absorbés sous forme de lipides, principalement sous forme de triglycérides. Produits de la réaction de lipolyse des triglycérides dans la lumière intestinale, les acides gras pénètrent la cellule épithéliale intestinale, puis tandis que les acides gras à chaîne courte diffusent à travers la *lamina propria* dans la lymphe où ils sont pris en charge par l'albumine jusqu'au foie (où ils pourront être remaniés), les acides gras à chaîne longue diffusent vers le réticulum endoplasmique où ils sont re-synthétisés en triglycérides, des lipoprotéines amphiphiles, c'est à dire présentant à la fois un pôle hydrophile et un pôle hydrophobe (ou lipophile), les apolipoprotéines, sont transférées vers les triglycérides nouvellement synthétisés pour former les chylomicrons. Les chylomicrons ainsi formés sont libérés dans la lymphe par exocytose.

Les modifications de la prise alimentaire et des cinétiques gastriques par les acides gras n'étant observées que pour des acides gras à chaîne longue (>12 atomes de carbone) (53), il est légitime de penser que la détection des acides gras est initiée par le processus de formation des chylomicrons, spécifique à l'absorption des acides gras à chaîne longue. En effet, la formation des chylomicrons et plus particulièrement la synthèse d'une des apolipoprotéines, l'apolipoprotéine A-IV (apo A-IV), a été

rapidement proposée comme une première étape dans la transduction du signal relatif à la présence d'acides gras à chaîne longue dans l'ingesta (50). L'apo A-IV est synthétisée par les entérocytes en réponse à l'absorption de lipides Elle est incorporée dans les chylomicrons mais aussi libérée sous forme libre dans la lymphe.

Plusieurs résultats sont venus étayer cette hypothèse. D'abord des études ont montré que la formation de chylomicrons était nécessaire à l'action des acides gras à chaîne longue sur les phénomènes de motricité gastrique (93) (dont on sait qu'ils ont pour origine la détection des acides gras à chaîne longue dans l'intestin et qu'ils vont de pair avec le rétrocontrôle de la prise alimentaire). L'inhibition de la formation des chylomicrons à l'aide d'un surfactant, l'acide pluronique L-81, supprime la réponse gastrique à la perfusion intra-duodénale d'acides gras à chaîne longue chez le rat (93).

Des études plus récentes encore sont venues confirmer que l'apo A-IV était impliquée dans le signal relatif à l'absorption d'acides gras à chaîne longue: en effet, une injection intra-péritonéale d'apo A-IV inhibe le tonus moteur gastrique (5; 6).

Ainsi, au cours de la digestion, la capacité des acides gras à chaîne longue à influencer la mécanique digestive ou la prise alimentaire repose sur le processus de formation des chylomicrons et plus particulièrement sur la synthèse et la libération d'apo A-IV dans la lymphe interstitielle. (88) (figure 26). Une nouvelle question se pose alors: comment l'apo A-IV influence-t-elle le comportement alimentaire et la mécanique digestive ?

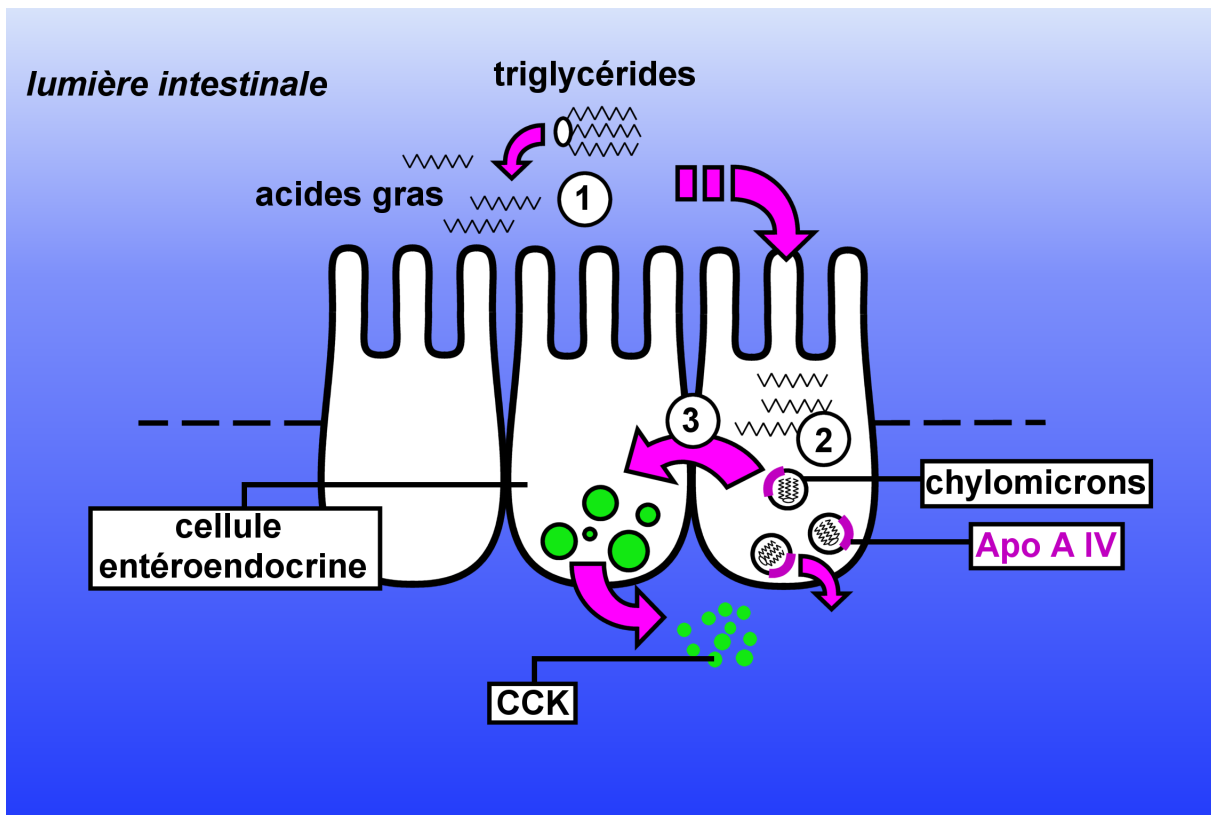


Figure 26: La détection des acides gras à chaîne longue au cours de la digestion

1) Les triglycérides d'origine alimentaire sont hydrolysés en acides gras puis transportés dans les entérocytes. 2) A l'intérieur des entérocytes, les acides gras à chaîne longue sont utilisés pour former de nouveaux triglycérides, puis incorporés dans des chylomicrons, avant d'être libérés dans le milieu interstitiel. 3) Un des composants des chylomicrons, l'apolipoprotéine AIV, alors synthétisé est libéré, déclenche la libération de CCK dans les cellules entéroendocrines voisines.

Apo A-IV et détection des acides gras à chaîne longue

Comme on l'a vu précédemment, il est désormais acquis que la synthèse de chylomicrons est un processus clé dans la détection des acides gras à chaîne longue pendant la digestion et que ce processus repose sur la synthèse et la libération de l'apo A-IV. Néanmoins, des questions demeurent, notamment quant aux mécanismes d'action de la lipoprotéine.

L'apo A-IV est un élément clé de la transduction du signal relatif à la présence des acides gras à chaîne longue dans le contenu digestif. Il convient de parler de transduction car à partir des acides gras à chaîne longue dans la lumière intestinale on aboutit à la libération d'un médiateur spécifique, correspondant à un signal ayant un sens physiologique pour l'organisme. Le mécanisme de transduction, s'il est nécessaire à l'établissement d'une réponse, est en revanche loin d'être suffisant. Pour exercer une action sur le comportement alimentaire, il faut que ce signal agisse soit directement sur les organes effecteurs, soit sur des systèmes sensoriels qui vont relayer ce message vers les systèmes qui génèrent les réponses.

Par quelles voies l'apo A-IV influence-t-elle le comportement alimentaire et le fonctionnement digestif?

Une action directe sur les organes effecteurs étant peu vraisemblable, il s'agit alors de déterminer si l'apo A-IV agit directement sur les systèmes qui génèrent les réponses physiologiques et/ou comportementales ou si d'autres éléments du système de la sensibilité périphérique (figure 27), comme le nerf vague par exemple peuvent intervenir. Le nerf vague innerve le tube digestif et en particulier l'intestin proximal, il est en partie responsable de la sensibilité périphérique et son rôle est démontré dans le rétrocontrôle immédiat de la prise alimentaire par le contenu digestif pendant la digestion.

Si l'apo A-IV n'agit pas de façon directe sur le système nerveux central, elle a donc pour cible très probable le nerf vague. Dans cette étude nous avons donc choisi de vérifier si le nerf vague relaie l'information relative à la détection des acides gras à chaîne longue depuis le tube digestif jusque vers le système nerveux central.

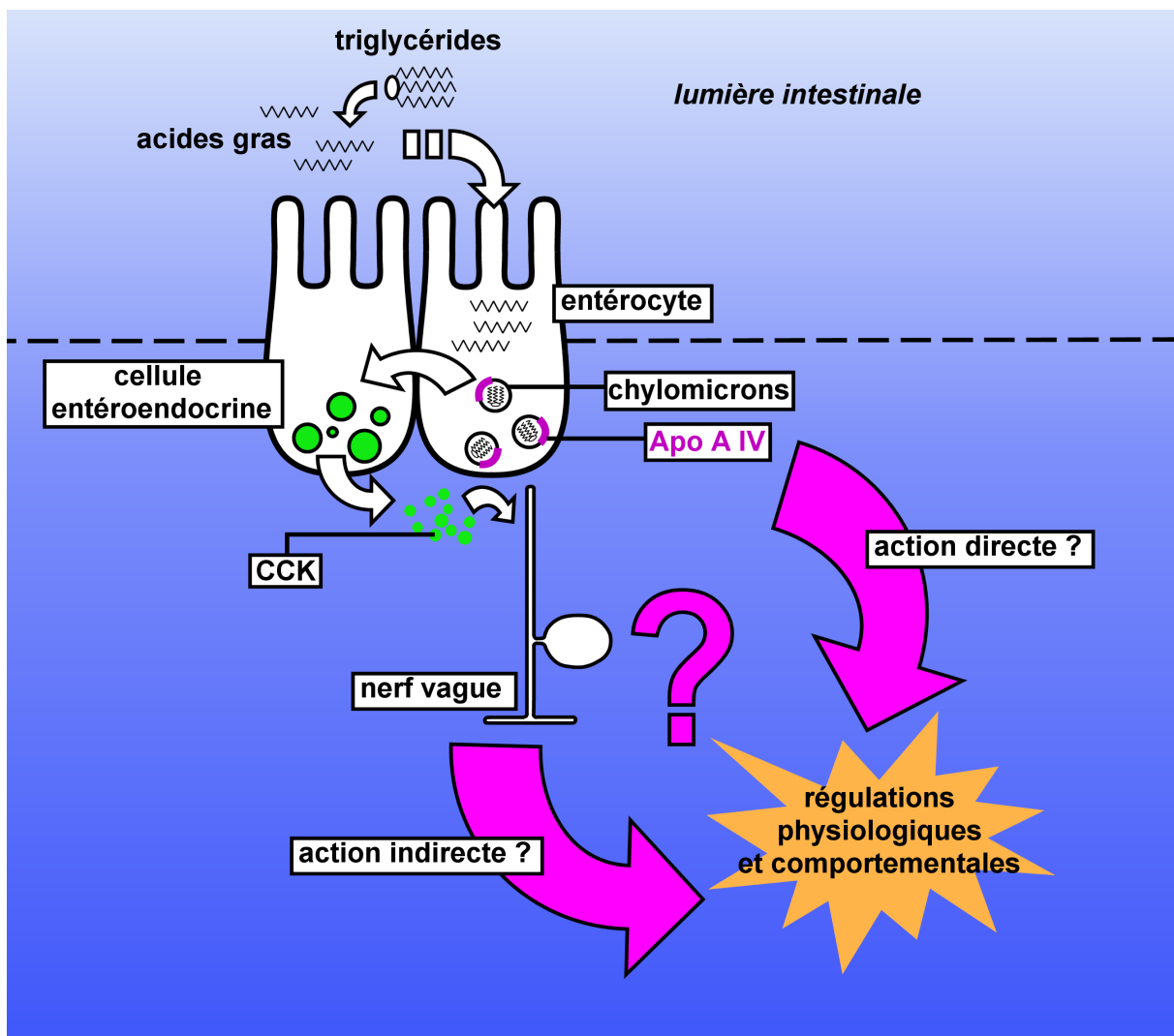


Figure 27: modalités d'action de l'APO A-IV

L'objet de cette étude est de déterminer si l'effet de l' apo A-IV est dépendant de la médiation vagale (action indirecte) ou non (action directe)

Étude 3: Evaluation du rôle des afférences vagues dans la détection des acides gras à chaîne longue

Résumé de l'article

Nous avons enregistré la motricité gastrique en réponse à une injection d'apo A-IV externe dans la cavité péritonéale chez le rat, en présence d'un bloqueur de la CCK, ou chez des rats vagotomisés. Nous avons aussi testé l'effet d'une injection d'apo A-IV sur l'activité spontanée des afférences vagues de la branche duodénale dans une préparation ex vivo de tube digestif de rat en présence ou en absence d'un antagoniste des récepteurs CCK1R, le MK329 (lorglumide) .

Nous avons obtenu les résultats suivants: la réponse (motricité gastrique) à l'administration d'apo-A-IV est significativement inhibée en présence d'un antagoniste des récepteurs CCK1R ou en condition de vagotomie. Les afférences vagues sont sensibles à l'apo A-IV. En effet, on observe une augmentation de l'activité spontanée des afférences vagues de la branche duodénale suite à l'administration d'apo A-IV. Cet effet n'est toutefois pas observé en présence d'un antagoniste des récepteurs de la CCK de type 1.

En conclusion, il est vraisemblable que le nerf vague joue un rôle clé dans le contrôle de la prise alimentaire par les acides gras à chaîne longue en relayant l'information initiée par la libération d'apo A-IV dans l'intestin.

Discussion

Ces données suggèrent que l'apo A-IV libérée au cours de la digestion lors de l'absorption d'acides gras à chaîne longue influence le fonctionnement digestif (et très vraisemblablement par la même occasion la prise alimentaire) via une action sur les terminaisons vagales de la branche duodénale. De plus, étant donnée l'action inhibitrice qu'exerce un antagoniste des récepteurs CCKR1, il est légitime de proposer que les afférences CCK-sensibles sont impliquées dans ce phénomène, autrement dit que l'apo A-IV stimule les terminaisons CCK sensibles du nerf vague au niveau de l'intestin proximal (figure 28). S'il permet d'avancer considérablement dans notre compréhension des mécanismes de la détection des acides gras à chaîne longue dans l'intestin, ce travail pose néanmoins de nouvelles questions. Pour progresser encore dans notre compréhension de ces mécanismes, il est maintenant critique de savoir comment l'apo A-IV stimule l'activité spontanée du nerf vague.

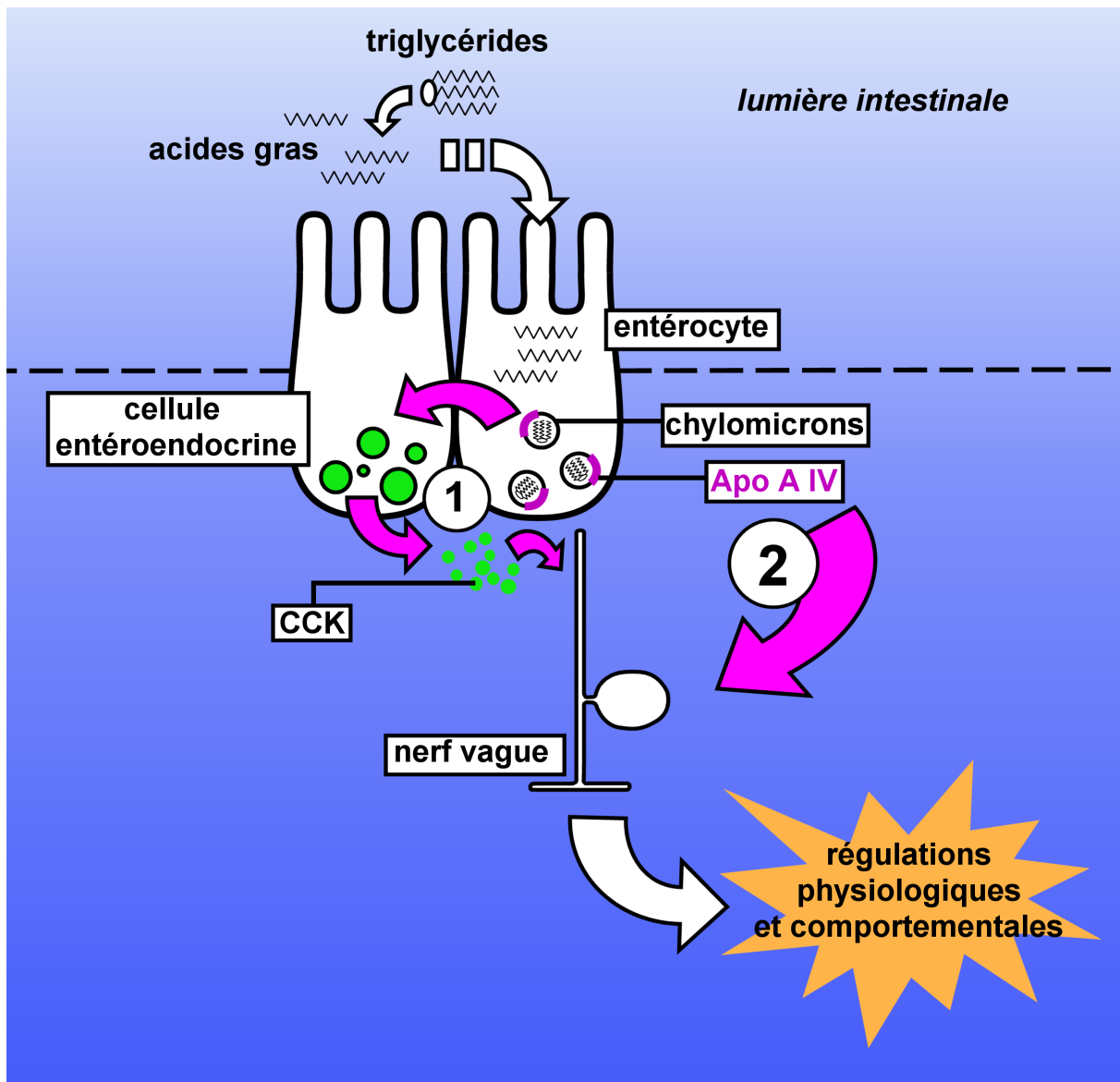


Figure 28 : Comment l'apo A-IV agit-elle sur le nerf vague ?

HYPOTHÈSE 1: L'apo A-IV déclenche la libération de CCK par les CEECs, puis la CCK active les terminaisons du nerf vague. HYPOTHÈSE 2: L'apo A-IV active directement les terminaisons du nerf vague.

Action directe ou libération de CCK

Si elle introduit un nouvel élément dans la médiation du signal, à savoir les afférences vagales CCK-sensitives, l'étude précédente ne montre pas directement que le médiateur sous entendu, la CCK, ligand endogène des récepteurs CCK1R est impliqué. Si d'autres études ont montré par ailleurs une augmentation des taux plasmatiques de CCK lors de l'administration acides gras à chaîne longue dans l'intestin (42), l'action directe de l'apo A-IV sur les afférences vagales ne peut être exclue. Cette hypothèse reste néanmoins moins vraisemblable.

De l'apo A-IV à la libération de CCK par les cellules entéroendocrines.

Même dans le cas de l'implication de la CCK dans la médiation du signal de l'apo A-IV par le nerf vague, cette étude conduit à soulever de nouvelles questions. En effet les mécanismes par lesquels la libération d'apo A-IV déclenche la libération de CCK par les cellules sont largement ignorés. Au moins deux voies sont proposées et à ce titre méritent d'être étudiées. Dans une première hypothèse la libération d'apo A-IV par les entérocytes agit sur les cellules entéroendocrines et déclenche la libération de la CCK. Dans une seconde hypothèse ce sont les cellules entéroendocrines elles-mêmes qui synthétisent de l'apo A-IV et c'est via un mécanisme intracellulaire que l'apo A-IV déclenche l'exocytose des vésicules contenant de la CCK.

Conclusion

Cette étude illustre bien les mécanismes de la détection périphérique des nutriments. Lors de leur absorption, les nutriments émettent des signaux qui sont détectés par des cellules spécialisées dont la fonction est de sécréter des médiateurs qui, à leur tour, vont activer les terminaisons vagales innervant l'intestin proximal. L'augmentation de l'activité de ces fibres constitue le signal relatif à la présence spécifique de certains types de macronutriments dans l'intestin et participe, entre autres, au contrôle du comportement alimentaire.

Article: Glatzle J, Darcel N, Rechs AJ, Kalogeris TJ, Tso P and Raybould HE. Apolipoprotein A-IV stimulates duodenal vagal afferent activity to inhibit gastric motility via a CCK1 pathway.



Apolipoprotein A-IV stimulates duodenal vagal afferent activity to inhibit gastric motility via a CCK₁ pathway

J. Glatzle,^{1,2} N. Darcel,¹ A. J. Rechs,^{1,3} T. J. Kalogeris,⁴ P. Tso,⁵ and H. E. Raybould¹

¹Department of Anatomy, Physiology, and Cell Biology, School of Veterinary Medicine, University of California, Davis 95616; ²Department of Biology, California State University Sacramento, Sacramento, California 95819;

³University Hospital, Department of General Surgery, University of Tübingen, 72074 Tübingen, Germany;

⁴Department of Surgery, Louisiana University School of Medicine, Shreveport, Louisiana 71130; and

⁵Department of Pathology and Laboratory Medicine, University of Cincinnati, Cincinnati, Ohio 45267

Submitted 9 December 2003; accepted in final form 13 April 2004

Glatzle, J., N. Darcel, A. J. Rechs, T. J. Kalogeris, P. Tso, and H. E. Raybould. Apolipoprotein A-IV stimulates duodenal vagal afferent activity to inhibit gastric motility via a CCK₁ pathway. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 287: R354–R359, 2004. First published April 29, 2004; 10.1152/ajpregu.00705.2003.—Apolipoprotein A-IV (apo A-IV), a peptide expressed by enterocytes in the mammalian small intestine and released in response to long-chain triglyceride absorption, may be involved in the regulation of gastric acid secretion and gastric motility. The specific aim of the present study was to determine the pathway involved in mediating inhibition of gastric motility produced by apo A-IV. Gastric motility was measured manometrically in response to injections of either recombinant purified apo A-IV (200 µg) or apo A-I, the structurally similar intestinal apolipoprotein not regulated by triglyceride absorption, close to the upper gastrointestinal tract in urethane-anesthetized rats. Injection of apo A-IV significantly inhibited gastric motility compared with apo A-I or vehicle injections. The response to exogenous apo A-IV injections was significantly reduced by 77 and 55%, respectively, in rats treated with the CCK₁ receptor blocker devazepide or after functional vagal deafferentation by perineural capsaicin treatment. In electrophysiological experiments, isolated proximal duodenal vagal afferent fibers were recorded in vitro in response to close-arterial injection of vehicle, apo A-IV (200 µg), or CCK (10 pmol). Apo A-IV stimulated the discharge of duodenal vagal afferent fibers, significantly increasing the discharge in 4/7 CCK-responsive units, and the response was abolished by CCK₁ receptor blockade with devazepide. These data suggest that apo A-IV released from the intestinal mucosa during lipid absorption stimulates the release of endogenous CCK that activates CCK₁ receptors on vagal afferent nerve terminals initiating feedback inhibition of gastric motility.

lipid; chylomicrons; mesenteric lymph; cholecystokinin

APOLIPOPROTEIN A-IV (apo A-IV) is a peptide expressed by the mammalian small intestine and is released in response to triglyceride absorption (23). Apo A-IV has a number of putative roles, including an involvement in chylomicron formation, prevention of atherosclerotic lesions, reverse cholesterol transport, and also as an antioxidant (23). In addition, administration of exogenous apo A-IV has been shown to decrease food intake in rodents (2) and to modulate gastrointestinal (GI) function, including inhibition of gastric acid secretion (17) and inhibition of gastric motility (16).

Apo A-IV synthesis in enterocytes is rapidly increased by intestinal lipid absorption where it is incorporated into nascent

chylomicrons within the enterocytes and is secreted along with chylomicrons (23). After exocytosis from enterocytes, apo A-IV dissociates from chylomicrons and circulates as free protein in plasma. There is considerable evidence that apo A-IV is actively involved in intestinal lipid absorption; synthesis and secretion of apo A-IV increases after fat ingestion or intestinal perfusion of lipid in rodents (6, 10). Additional evidence has suggested that chylomicron assembly and transport may be the specific signal for apo A-IV production within enterocytes (2, 24).

However, in addition to its effects on lipid absorption and handling, there is evidence that apo A-IV may have a role in the regulation of food intake and postprandial gastrointestinal function. A role for apo A-IV in the regulation of food intake was first suggested by studies showing that intravenous injections of mesenteric lymph, collected from donor rats actively absorbing lipid and thus containing chylomicrons, was able to inhibit food intake in recipient rats (2). This inhibition of food intake was shown to be independent of the lipid content of chylous lymph and was abolished by immunoneutralization of apo A-IV, but not apo A-I, a structurally related apolipoprotein. Administration of apo A-IV at the dose of 200 µg, an amount comparable to that found in 2 ml chylous lymph, also significantly depressed food intake (3). It was concluded that apo A-IV may be acting within the central nervous system to inhibit food intake, since it was considerably more potent after central administration (3). There is evidence that apo A-IV may also be involved in the regulation of gastrointestinal function. Central injection of apo A-IV inhibits gastric acid secretion and decreases gastric ulcer formation (15). Central injection of apo A-IV also inhibits gastric motility (16), but the role of apo A-IV in regulating postprandial gastric secretory and motor function and the pathways by which it mediates its action are unclear.

We have been interested in the mechanism by which long-chain triglycerides in the intestinal lumen initiate feedback inhibition of gastric function. We have previously demonstrated that inhibition of gastric emptying in response to intestinal perfusion of long-chain triglyceride is dependent on chylomicron formation (19). Further evidence for a role of chylomicron formation comes from experiments in which lymph collected from donor rats actively absorbing lipid inhibited gastric motility in recipient rats, an effect that could not

Address for reprint requests and other correspondence: H. Raybould, VET MED: APC, 1321 Haring Hall, Univ. of California, Davis, CA 95616 (E-mail: heraybould@ucdavis.edu).

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. The article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

be accounted for by the lipid content of the lymph (4). Furthermore, inhibition of chylomicron formation in the donor rats rendered the lymph ineffective to alter gastric motility in recipient rats (4). More recently, we have shown that inhibition of gastric motility in response to chylous lymph is mediated by a CCK₁ receptor and vagal afferent pathway (5). Moreover, chylous lymph can increase CCK-responsive vagal duodenal afferent fiber discharge, an effect that is inhibited by CCK₁ receptor blockade (5). These results suggest that a component of lymph, possibly apo A-IV, is an important mediator in the sensory transduction pathway by which vagal afferents respond to intestinal lipid and thus inhibit postprandial gastrointestinal function. During active lipid absorption, there is an increase in the amount of apo A-IV in lymph (21).

In the present study, we tested the hypothesis that apo A-IV stimulates vagal afferent terminals within the wall of the duodenum, resulting in the activation of a vagal afferent, CCK₁ receptor-dependent reflex that decreases gastric motility. In these experiments, we determined the effect of apo A-IV on gastric motility in anesthetized rats and examined the role of CCK₁ receptors and the vagal afferent pathway using devazepide and functional deafferentation with capsaicin, respectively, in mediating the inhibitory effects of apo A-IV on gastric motility. To confirm the direct involvement of vagal afferent fibers, we recorded duodenal vagal afferent fiber discharge in response to CCK and apo A-IV.

METHODS

Animals

Male Sprague Dawley rats (260–280 g, Harlan Industries, San Diego, CA) were maintained on regular laboratory rodent chow and housed under controlled conditions of illumination (12:12-h light-dark cycle starting at 0700), humidity, and temperature (21°C). Rats were fasted overnight but allowed water ad libitum before all surgical and experimental procedures. The institutional guidelines for the care and use of laboratory animals were followed throughout the study.

Drugs and Chemicals

Purified recombinant apo A-IV and apo A-I were prepared as previously described (12). Sulfated CCK-8 (Sigma, St. Louis, MO) was dissolved in distilled water to make a 100-pmol/μl stock solution that was stored at –20°C and diluted immediately before use with 0.9% NaCl for motility experiments and with rat buffered saline (in mM: 140 NaCl, 5 KCl, 1 MgCl₂·6H₂O, 1.3 Na₂HPO₄, 5 HEPES, 2 CaCl₂·2H₂O, and 10 D-glucose; pH 7.38 ± 0.02) for electrophysiological experiments (5). The CCK₁ receptor antagonist devazepide (Merck Sharp & Dohme, Rahway, NJ) was prepared by dissolving 10 mg in 0.1 ml DMSO (Sigma) and adding 0.1 ml Tween 80 (Sigma), followed by 0.8 ml physiological saline; this stock solution was diluted in physiological saline to achieve a final concentration of 1 mg/ml. Capsaicin (8-methyl-N-vanillyl-6-nonenamide, 10 mg; Sigma) was sonicated in 100 μl Tween 80 (Sigma) for 15 min, 0.9 ml olive oil was added, and the suspension was sonicated for a further 10 min.

Perineural Application of Capsaicin on the Vagus Nerve

This method has been published previously (20); briefly, rats were anesthetized with pentobarbital sodium (60 mg/kg ip). The carotid arteries were exposed by a midline neck incision, and the vagus nerve was carefully separated from the carotid arteries for a distance of 3–4 mm. A small stripe of parafilm (American National Can, Chicago, IL)

was placed under the nerve, the nerve was wrapped with a small piece of cotton wool, and the surrounding tissue was covered with parafilm to prevent spread of capsaicin. One drop of 1% capsaicin or vehicle (10% Tween 80 in olive oil) was applied on each vagus nerve for 30 min. At 10-min intervals, the nerve was swabbed, and capsaicin was reapplied. After application, the area was rinsed thoroughly with sterile saline, and the incision was closed. Rats in which the vagus nerve was treated with vehicle (10% Tween 80 in olive oil) served as controls for the capsaicin treatment (intact rats). Animals were used 10 days after treatment.

Measurement of Gastric Motility

Methods have been described previously (20). Briefly, rats were anesthetized with urethane (1.25 g/kg ip; Sigma), and a catheter was placed in the trachea to ensure a clear airway (PE-240, 1.67 mm ID, 2.42 mm OD). The abdomen was opened, the pylorus was secured, gastric contents were gently flushed with warm 0.9% saline through an incision in the forestomach, and a catheter [2 mm inner diameter (ID), 3.2 mm outer diameter (OD); Silastic] was placed through the incision to measure intraluminal gastric pressure (IGP). After a recovery period of ~45–60 min, the stomach was filled with 1 ml warm 0.9% saline and kept under continuous pressure of 5–6 cmH₂O for 60 min to normalize baseline IGP. A catheter was placed in the femoral artery (PE-50, 0.58 mm ID, 0.965 mm OD) and advanced up to the junction with the cellac artery for close-arterial injection of apolipoproteins and CCK to the upper gastrointestinal tract. A second catheter was placed in the jugular vein for injections of drugs. IGP was displayed and recorded on-line for the duration of the experiment. Changes of IGP were measured and analyzed as the maximal decrease of IGP (cmH₂O) in the postinjection period.

Recording of Vagal Afferent Nerve Fiber Discharge

The technique has been published previously (5). Briefly, rats were anesthetized and decapitated, and a segment of the thoracic esophagus, stomach, and proximal duodenum (~4 cm from the pylorus to the common bile duct) was removed and immersed in oxygenated rat-buffered saline containing 2 g/l D-glucose. The esophagus and stomach were removed. With the use of a dissecting microscope, the subdiaphragmatic dorsal vagus nerve was identified, and a catheter was placed in the gastroduodenal artery for injections. The segment was pinned to the main chamber of a Sylgard-coated organ bath that was perfused continuously with oxygenated Ringer solution at a 2.0- to 2.5-ml/min flow rate, and the temperature of the organ bath was maintained at 33 ± 1°C. The isolated dorsal vagus nerve was placed in the recording chamber.

A thin nerve strand was isolated from the dorsal gastric vagus nerve trunk; the distal cut end was wrapped around one lead of a bipolar platinum-recording electrode, and a strip of neighboring connective tissue was wrapped around the other lead serving as the indifferent electrode. Action potentials of the afferent fibers were sent to a preamplifier (DAM-6 X100, 100- to 10-kHz bandpass filter; World Precision Instruments, Sarasota, FL), displayed on a digital storage oscilloscope (model 2211; Tektronix), and recorded on-line on a digital tape recorder (Sony high-density linear A/D D/A optical digital audio tape deck, DTC-700). Action potentials were sent simultaneously to a personal computer equipped with an A/D board (DT2831; Data Translation, Marlboro, MA).

Data Acquisition and Analysis

Single-unit activity of vagal afferents was discriminated from multiunit recordings using SPIKE 2 software (Cambridge Instruments, Cambridge, UK). Units within upper and lower threshold settings were acquired in the personal computer. On the basis of the amplitude and waveform, a particular unit can be matched to the waveform of the single unit by the use of the analysis module of the

software in the off-line mode. The response pattern of different units can be analyzed further and displayed separately. Response magnitudes were normalized by a quotient (Q), where $Q = 5$ -min spikes count of before/after the treatment. The $Q > 1.25$ indicates an excitatory effect, $Q < 1.25$ indicates an inhibitory effect, and $Q = 1 \pm 0.25$ indicates no effect. Data are presented as means $\pm$ SE. Values were compared using Student's t -test (paired or unpaired) and were considered significantly different at $P < 0.05$.

Experimental Protocols

Gastric motility experiments. Gastric motility was measured in untreated control rats in response to administration of vehicle (physiological saline, 1 ml, $n = 10$), apo A-IV (200 μ g in 1 ml, $n = 10$), apo A-I (200 μ g in 1 ml, $n = 10$), and CCK (10 pmol in 0.1 ml). In perivagal capsaicin-treated rats ($n = 7$) or intact rats ($n = 4$), inhibition of gastric motility was measured in response to administration of apo A-IV (200 μ g) and CCK (0.1, 1, and 10 pmol in 0.1 ml/rat). In rats treated with the CCK₁ receptor antagonist devazepide (100 μ g/kg iv, $n = 4$) or vehicle [0.1 ml DMSO, 0.1 ml Tween 80 (Sigma), and 0.8 ml physiological saline, $n = 4$], inhibition of gastric motility was measured in response to apo A-IV (200 μ g) and CCK (0.1, 1, and 10 pmol). CCK was injected 15–60 min before and 15–60 min after devazepide treatment or in capsaicin-treated rats to ensure the effectiveness of CCK₁ receptor blockade and vagal deafferentation, respectively.

In vitro electrophysiology. Recordings were made from five preparations investigating the effects of apo A-IV on duodenal vagal afferent fiber discharge; a total of 10 single units were analyzed from these preparations. A dose-response to CCK was obtained (0.1, 1, 10, and 100 pmol) followed by apo A-IV (200 μ g). At least 15 min were allowed between each injection.

In a further seven preparations, the effect of devazepide (100 μ g intra-arterially) on the response to CCK (10 pmol) and apo A-IV (200 μ g) was determined on vagal afferent fiber discharge. A total of 11 single units responding to CCK were analyzed from these preparations. After CCK injection, devazepide was administered, and injections of CCK and apo A-IV were repeated after 10–20 min.

Statistical Analysis

Data are presented as means $\pm$ SE. Differences between groups were determined by a one-way ANOVA, followed by Student's t -test, using the software package of JMP (version 3.2.2; SAS Institute, Cary, NC). A probability of $P < 0.05$ was taken as significant.

RESULTS

Effect of Apo A-IV on Gastric Motility

As previously described (4), administration of apo A-IV (200 μ g) was a potent stimulus to induce inhibition of gastric motility in anesthetized rats (Fig. 1). In contrast, close-arterial administration of the structurally similar apolipoprotein apo A-I or equivalent volumes of physiological saline (1 ml) had no effect on gastric motor function. In the same preparations, CCK (0.1, 1, and 10 pmol) induced a dose-dependent inhibition of gastric motor function (0.1 pmol CCK, 0.30 ± 0.12 ; 1 pmol CCK, 0.85 ± 0.19 ; 10 pmol CCK, 1.13 ± 0.18).

Effect of Functional Vagal Deafferentation on Apo A-IV-Induced Inhibition of Gastric Motility

In rats in which the vagus nerve was treated with capsaicin to produce a functional vagal deafferentation, apo A-IV (200 μ g) was significantly less potent to inhibit gastric motility; the

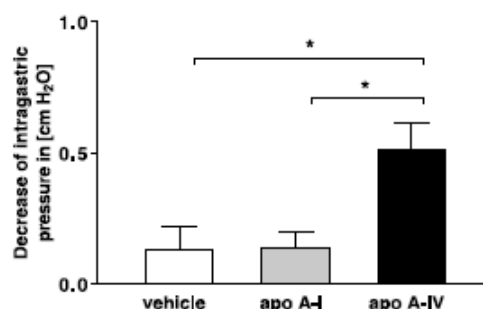


Fig. 1. Inhibition of gastric motility in response to apolipoprotein A-IV (apo A-IV). Apo A-IV was injected close-arterial to the gastrointestinal tract in urethane-anesthetized rats. Administration of 200 μ g/kg apo A-IV, an amount equivalent to that found in 2 ml chylous lymph, significantly inhibited gastric motility, whereas apo A-I was without effect. * $P < 0.05$, vehicle or apo A-I vs. apo A-IV.

response was decreased by 55% compared with the response in intact rats (Fig. 2). The ability of CCK (0.1, 1, and 10 pmol) to inhibit gastric motility was reduced significantly in vagal capsaicin-treated rats compared with intact rats (decrease IGP in cmH₂O after 0.1, 1, and 10 pmol ia CCK, intact vs. capsaicin treatments; 0.1 pmol CCK, 0.30 ± 0.12 vs. 0.04 ± 0.04 ; 1 pmol CCK, 0.85 ± 0.19 vs. 0.11 ± 0.07 ; 10 pmol CCK, 1.13 ± 0.18 vs. 0.63 ± 0.15 ; $P < 0.05$ for all CCK doses). Equivalent volumes of physiological saline had no significant effect on gastric motility in intact or capsaicin-treated rats.

Effect of CCK₁ Receptor Blockade on Apo A-IV-Induced Inhibition of Gastric Motility

CCK₁ receptor blockade using devazepide (100 μ g/kg ia) markedly reduced the inhibition of gastric motility in response to apo A-IV by 77% (Fig. 2). Equivalent volumes of physiological saline had no significant effect on gastric motility in vehicle- or devazepide-treated rats. To demonstrate the effectiveness of the CCK₁ receptor blockade, inhibition of gastric motility in response to CCK before and after devazepide treatment was reduced significantly (decrease of IGP in cmH₂O after CCK, 10 pmol ia, before vs. after devazepide treatment; 0.98 ± 0.17 vs. 0.10 ± 0.06 , 90% reduction, $P < 0.01$).

Effect of Apo A-IV on Duodenal Vagal Afferent Fiber Discharge

CCK produced a dose-dependent stimulation of duodenal afferent fiber discharge in 8 out of 10 units; the remaining 2 units did not respond to CCK (response Q for CCK-responsive units; vehicle: 1.07 ± 0.05 ; 0.1, 1, 10, and 100 pmol CCK: 1.17 ± 0.18 , 1.33 ± 0.13 , 1.99 ± 0.38 , and 2.35 ± 0.30 , respectively). Apo A-IV stimulated the discharge of four of seven CCK-responsive units (response Q for apo A-IV-responsive units; 1.63 ± 0.21 ; $P < 0.05$, vehicle vs. apo A-IV; Fig. 3).

Duodenal vagal afferent fiber discharge in response to apo A-IV was reduced significantly by administration of the CCK₁ receptor antagonist devazepide (response Q apo A-IV 1.75 ± 0.18 vs. 0.79 ± 0.10 ; $P < 0.05$, before vs. after devazepide treatment).

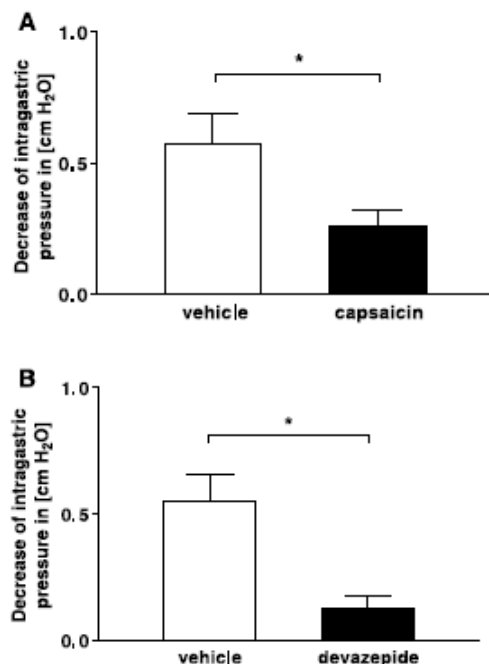


Fig. 2. *A*: Inhibition of gastric motility in response to apo A-IV is significantly reduced by 55% in rats with functional ablation of vagal capsaicin-sensitive afferents compared with intact rats. Gastric motility was measured manometrically in urethane-anesthetized rats 10 days after perivagal vehicle ($n = 4$) or capsaicin ($n = 7$) treatments. $*P < 0.05$, intact vs. capsaicin treatment. *B*: Inhibition of gastric motility in response to apo A-IV is reduced significantly by CCK₁ receptor blockade with devazepide. $*P < 0.01$, vehicle ($n = 4$) vs. devazepide ($n = 4$) treatment.

DISCUSSION

The data from the present study strongly suggest that apo A-IV participates in the sensory transduction pathway involved in the initiation of vagal afferent fiber activity and the consequent reflex decrease in gastric motility in response to luminal triglyceride. Our data show that apo A-IV stimulates vagal afferent fibers innervating the duodenum via a CCK₁-responsive mechanism that results in a vagal reflex decrease in gastric motility. We postulate that active lipid absorption results in release of apo A-IV from enterocytes in the lamina propria to stimulate release of CCK from enteroendocrine cells in the intestinal epithelium. CCK stimulates vagal afferent fiber discharge via direct interaction with CCK₁ receptors on vagal afferent terminals. In this way, the presence of lipid present in the intestinal lumen is signaled to vagal afferents and the central nervous system, resulting in changes in gastrointestinal function and possibly food intake.

These findings agree well with other evidence pointing to a role for chylomicron products, including apo A-IV, in mediating the changes in gastrointestinal function in response to long-chain triglyceride in the intestinal lumen. It is well recognized that intestinal infusion of triglyceride with fatty acids of chain length of at least C-12 (those that require chylomicron

formation for absorption) and above induces release of CCK (9, 13) and inhibition of gastric motor function (8), but the mechanism by which these changes in function occur in response to lipid is not clear. The pathway involves CCK₁ receptors, likely those located on vagal afferent nerve terminals in the intestinal mucosa, and a vago-vagal reflex pathway resulting in inhibition of gastric motor function and gastric emptying (7). Long-chain triglyceride increases vagal afferent fiber discharge, probably via an indirect, rather than direct, mechanism, since it is abolished in the presence of a CCK₁ receptor antagonist (11). In addition, it has been shown to be dependent on chylomicron formation (18). Infusion of oleic acid stimulates intestinal vagal afferent fiber discharge, and this response is abolished when the lipid is infused with Pluronic L81, a hydrophobic nonionic surfactant that inhibits chylomicron formation (18). The results from the present study suggest that this may be because of the inhibition of apo A-IV secretion that occurs when chylomicron formation is blocked by Pluronic L-81.

The mechanism by which long-chain triglyceride stimulates the release of CCK from enteroendocrine cells is not known. Whether luminal fatty acids interact directly with these cells to cause secretion is unclear but has been the focus of several recent studies that have used the mouse neuroendocrine tumor cell line STC1. These cells secrete CCK in response to direct application of a number of different agents, including long-chain triglyceride (13, 22). Fatty acids of chain length C-10 and C-12 were effective in releasing CCK in a dose-dependent manner, and secretion was associated with an increase in intracellular calcium. However, it is not clear how these results with STC1 cells in vitro relate to enteroendocrine cells in situ. Caution must be used when extrapolating the results from tumor cell lines to native enteroendocrine cells; it is not known whether these cells express the same complement of proteins on the cell membrane or within the cell. In addition, in cell culture, the applied fatty acids have access to the whole cell membrane, whereas under physiological conditions, fatty acids have access to the luminal surface of the cell. Therefore, although these studies with STC1 cells suggest a direct effect of long-chain fatty acid on endocrine cells, it does not rule out the possibility of other pathways and mechanisms being in-

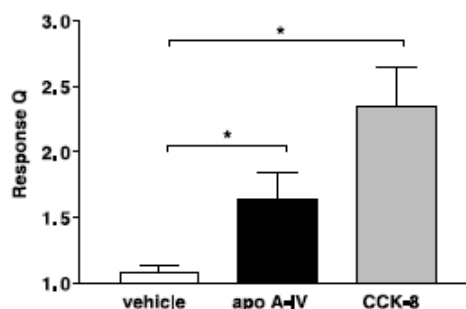


Fig. 3. Apo A-IV significantly increases duodenal vagal afferent fiber discharge. Vagal afferent fiber activity from the dorsal vagus nerve was measured in an in vitro preparation of the duodenum with the vagus nerves attached. Results show means $\pm$ SE of the response quotient (Q) of CCK-responsive units. $*P < 0.05$, vehicle vs. apo A-IV or CCK-8.

involved under more physiological situations. Furthermore, it remains to be determined whether fatty acids stimulate apo A-IV secretion in STC1 cells and whether CCK is released from STC1 cells in response to apo A-IV. Previously, we have shown in awake rats that elevated plasma levels of CCK in response to luminal triglyceride perfusion are reduced significantly by simultaneous perfusion with Pluronic L81 (19). This result suggests that chylomicron formation is an important step in the release of CCK from intestinal EC cells. The sequence of events leading to fatty acid-induced release of CCK from EC cells is not clear; it is possible that apo A-IV released from chylomicrons in the interstitium activates EC cells that release CCK. An alternate hypothesis is that endocrine cells might synthesize the components required for chylomicron formation and thus produce apo A-IV, which could then have an autocrine effect to stimulate release of CCK. This is currently unknown; although immunocytochemistry with an antibody to apo A-IV showed immunoreactivity in the intestinal epithelial cells (1), the colocalization of apo A-IV with CCK has not been studied. In addition, the possibility of absorption of fatty acids in endocrine cells has not been demonstrated *in vivo*, although it has been shown that STC1 cells absorb dodecanoic acid in cell culture (22). Whether endocrine cells express any of the normal proteins involved in handling of free fatty acids by cells, such as fatty acid transporters and binding proteins, is not known.

Regardless of the mechanism by which endocrine cells release CCK, it is clear that apo A-IV can stimulate vagal afferent fiber discharge via a CCK₁-dependent mechanism. The simplest explanation is that apo A-IV stimulates CCK release and then CCK binds to CCK₁ receptors on vagal afferent terminals. The observation that CCK directly stimulates vagal afferents has been shown in a number of different experimental paradigms. Furthermore, vagal afferents have been shown to express CCK₁ receptors, although localization of the receptor to the terminal fields of intestinal vagal afferents has never been demonstrated directly. However, this does not rule out the possibility that apo A-IV may have a direct effect on vagal afferent nerve terminals. Apo A-IV has been shown to have effects in the central nervous system, presumably mediated by a direct effect on neurons or possibly on glia (3, 14–16). It is not clear whether apo A-IV exerts its biological actions via specific receptors. In addition, the lack of response to apo A-IV may reflect a general decrease in sensitivity of vagal afferents to any stimuli in the presence of CCK₁ receptor blockade. Further information is required on the direct effects of apo A-IV on endocrine cells and vagal afferents to help clarify this pathway.

In conclusion, we have shown that apo A-IV activates a vagal afferent, CCK₁ receptor-dependent pathway to inhibit gastric motility in rats. The significance of this finding is that it provides further insights into the mechanism by which fatty acids from triglyceride are sensed in the intestinal epithelium to produce alterations in postprandial gastrointestinal function and regulation of food intake. The precise mechanism by which apo A-IV stimulates release of CCK and activates vagal afferents warrants further investigation.

ACKNOWLEDGMENTS

We are very grateful to Jen Yu Wei, David Adelson, and Yu Hua Wang (CURE Digestive Diseases Research Center, University of California Los

Angeles School of Medicine) for help with the electrophysiological experiments.

GRANTS

This work was supported by National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases Grants DK-41004 (H. E. Raybould) and DK-52149, DK-56863, and DK-54504 (P. Tso) and Deutsche Forschungsgemeinschaft Grant GL 311/3-1.

REFERENCES

- Doi T, Liu M, Seeley RJ, Woods SC, and Tso P. Effect of leptin on intestinal apolipoprotein A-IV in response to lipid feeding. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 281: R753–R759, 2001.
- Fujimoto K, Cardelli JA, and Tso P. Increased apolipoprotein A-IV in rat mesenteric lymph after lipid meal acts as a physiological signal for satiation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 262: G1002–G1006, 1992.
- Fujimoto K, Fukagawa K, Sakata T, and Tso P. Suppression of food intake by apolipoprotein A-IV is mediated through the central nervous system in rats. *J Clin Invest* 91: 1830–1833, 1993.
- Glatzle J, Kalogeris TJ, Zittel TT, Guerrini S, Tso P, and Raybould HE. Chylomicron components mediate intestinal lipid-induced inhibition of gastric motor function. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 282: G86–G91, 2002.
- Glatzle J, Wang Y, Adelson DW, Kalogeris TJ, Zittel TT, Tso P, Wei JY, and Raybould HE. Chylomicron components activate duodenal vagal afferents via a cholecystokinin A receptor-mediated pathway to inhibit gastric motor function in the rat. *J Physiol* 550: 657–664, 2003.
- Hayashi H, Fujimoto K, Cardelli JA, Nutting DF, Bergstedt S, and Tso P. Fat feeding increases size, but not number, of chylomicrons produced by small intestine. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 259: G709–G719, 1990.
- Holzer HH, Turkelson CM, Solomon TE, and Raybould HE. Intestinal lipid inhibits gastric emptying via CCK and a vagal capsaicin-sensitive afferent pathway in rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 267: G625–G629, 1994.
- Hunt JN and Knox MT. A relation between the chain length of fatty acids and the slowing of gastric emptying. *J Physiol* 194: 327–336, 1968.
- Isaacs PE, Ladas S, Forgacs IC, Dowling RH, Ellam SV, Adrian TE, and Bloom SR. Comparison of effects of ingested medium- and long-chain triglyceride on gallbladder volume and release of cholecystokinin and other gut peptides. *Dig Dis Sci* 32: 481–486, 1987.
- Kalogeris TJ, Tsuchiya T, Fukagawa K, Wolf R, and Tso P. Apolipoprotein A-IV synthesis in proximal jejunum is stimulated by ileal lipid infusion. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 270: G277–G286, 1996.
- Lai S, Kirkup AJ, Brunsden AM, Thompson DG, and Grundy D. Vagal afferent responses to fatty acids of different chain length in the rat. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 281: G907–G915, 2001.
- Liu M, Maiorano N, Shen L, Pearson K, Tajima D, Zhang DM, Woods SC, Seeley RJ, Davidson WS, and Tso P. Expression of biologically active rat apolipoprotein A-IV in *Escherichia coli*. *Physiol Behav* 78: 149–155, 2003.
- McLaughlin JT, Lomax RB, Hall L, Dockray GJ, Thompson DG, and Warhurst G. Fatty acids stimulate cholecystokinin secretion via an acyl chain length-specific, Ca²⁺-dependent mechanism in the enteroendocrine cell line STC-1. *J Physiol* 513: 11–18, 1998.
- Okumura T, Fukagawa K, Tso P, Taylor IL, and Pappas TN. Intracisternal injection of apolipoprotein A-IV inhibits gastric secretion in pylorus-ligated conscious rats. *Gastroenterology* 107: 1861–1864, 1994.
- Okumura T, Fukagawa K, Tso P, Taylor IL, and Pappas TN. Mechanism of action of intracisternal apolipoprotein A-IV in inhibiting gastric acid secretion in rats. *Gastroenterology* 109: 1583–1588, 1995.
- Okumura T, Fukagawa K, Tso P, Taylor IL, and Pappas TN. Apolipoprotein A-IV acts in the brain to inhibit gastric emptying in the rat. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 270: G49–G53, 1996.
- Okumura T, Taylor IL, Fukagawa K, Tso P, and Pappas TN. Apolipoprotein A-IV acts centrally in the brain to reduce the severity of gastric ulceration in the rat. *Brain Res* 673: 153–156, 1995.
- Randich A, Tyler WJ, Cox JE, Meller ST, Kelm GR, and Bharaj SS. Responses of celiac and cervical vagal afferents to infusions of lipids in the jejunum or ileum of the rat. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 278: R34–R43, 2000.



19. Raybould HE, Meyer JH, Tabrizi Y, Liddle RA, and Tso P. Inhibition of gastric emptying in response to intestinal lipid is dependent on chylomicron formation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 274: R1834–R1838, 1998.
20. Raybould HE and Tache Y. Cholecystokinin inhibits gastric motility and emptying via a capsaicin-sensitive vagal pathway in rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 255: G242–G246, 1988.
21. Rodriguez MD, Kalogeris TJ, Wang XL, Wolf R, and Tso P. Rapid synthesis and secretion of intestinal apolipoprotein A-IV after gastric fat loading in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 272: R1170–R1177, 1997.
22. Sidhu SS, Thompson DG, Warhurst G, Case RM, and Benson RS. Fatty acid-induced cholecystokinin secretion and changes in intracellular Ca^{2+} in two enteroendocrine cell lines, STC-1 and GLUTag. *J Physiol* 528: 165–176, 2000.
23. Stan S, Delvin E, Lambert M, Seidman E, and Levy E. Apo A-IV: an update on regulation and physiologic functions. *Biochim Biophys Acta* 1631: 177–187, 2003.
24. Tso P and Balint JA. Formation and transport of chylomicrons by enterocytes to the lymphatics. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 250: G715–G726, 1986.



Troisième Partie:

*Mécanismes cellulaires responsables de la détection des
oligopeptides dans l'intestin au cours de la digestion*

Introduction

De l'intérêt de détecter la présence et la disponibilité des protéines

Les protéines et leurs constituants, les acides aminés, sont des macronutriments essentiels au bon fonctionnement de l'organisme. Ils participent à la fois à la structure du corps des organes et des cellules, dont elles constituent la base, et au fonctionnement de l'organisme. Les enzymes, par exemple, sont des composés protéiques accomplissant des fonctions biochimiques comme l'hydrolyse, ou la réplication de l'ADN. Autre exemple d'implication des acides aminés dans le fonctionnement du corps, la sérotonine, un médiateur impliqué dans de très nombreuses fonctions (cycles veille-sommeil, anxiété, comportement alimentaire), est un dérivé du tryptophane, un acide aminé essentiel.

Même s'il existe un recyclage important de ces composés, le fonctionnement de l'organisme exige toutefois que des protéines et des acides aminés lui soient fournis sur une base très régulière. Avec le recyclage des substances azotées corporelles, c'est l'alimentation qui fournit l'apport protéique.

Les stratégies mises en place par l'organisme pour s'informer de la disponibilité en protéines et/ou en acides aminés sont nombreuses.

Il est donc peu étonnant que l'organisme ait mis au point des systèmes lui permettant de s'informer de la disponibilité en acides aminés et en protéines.

Au niveau cellulaire d'abord, certaines cellules sont sensibles aux taux d'acides aminés à chaînes ramifiées. En fonction du taux de ces acides aminés, elles modulent la synthèse protéique (3). D'autres systèmes récemment découverts chez la levure détectent les carences en acides aminés via les ARN de transfert non chargés qui déterminent l'activation d'une enzyme de contrôle du métabolisme cellulaire, GCN2 (4).

Certaines régions du cerveau comme le cortex piriforme antérieur ont pour fonction (entre autres) de détecter les carences en acides aminés dans l'alimentation et, sur la base de ces informations, d'influencer le comportement alimentaire (48).

Les protéines alimentaires sont détectées lors de leur absorption dans l'intestin.

En plus des mécanismes cités plus haut, l'organisme semble détecter la présence de nutriments dans le contenu digestif. Par exemple l'infusion de protéines dans la lumière intestinale a pour conséquence la modification des fonctions digestives et, dans une certaine mesure, la survenue de la terminaison du repas (11; 74); autant

d'observations qui semblent suggérer l'existence d'une détection des protéines alimentaires au cours du repas.

Les mécanismes de la détection des protéines dans l'intestin.

Curieusement, les mécanismes de la détection des protéines dans l'intestin n'ont été que très peu explorés jusque récemment. Ils font désormais l'objet d'une attention toute particulière.

Il semble tout d'abord que le nerf vague joue un rôle dans la détection des protéines dans l'intestin. Des études électrophysiologiques ont montré que l'infusion de protéines dans l'intestin stimulait l'activité spontanée des afférences vagues de la branche duodénale (46).

Plusieurs travaux semblent montrer que la CCK est associée aux effets des protéines sur le fonctionnement digestif et sur le comportement alimentaire. Des travaux réalisés in vivo ont montré que l'ingestion de protéines était associée à une élévation du taux plasmatique de CCK.

Au vu de ces études, il semble légitime de proposer que la détection des protéines au cours de la digestion est un phénomène périphérique impliquant l'action de la cholécystokinine sur les afférences du nerf vague terminant dans l'intestin. Toutefois de nombreuses questions restent en suspens notamment sur la nature des

mécanismes cellulaires de la transduction du signal relatif à la présence de protéines, autrement dit sur la nature des phénomènes cellulaires en amont des événements que sont la libération de CCK par les CEECs intestinales puis son action sur les terminaisons vagales.

Les hypothèses proposées pour la détection des protéines dans l'intestin.

Plusieurs hypothèses ont été avancées quant aux mécanismes d'action des protéines ou du produit de leur digestion sur le nerf vague. Tout d'abord, pour pouvoir formuler une hypothèse sur les mécanismes de la détection il est nécessaire d'identifier précisément quelle est la substance qui va, à proprement parler, initier la détection. Dans le cas des protéines, polymères d'acides aminés, cette question est tout particulièrement importante. Il convient d'abord de connaître les mécanismes de la digestion et de l'absorption des protéines.

Les protéines arrivent quasi intactes dans le duodénum où elles sont soumises à l'action des protéases pancréatiques telle que la trypsine. Dès lors, elles sont hydrolysées en fragments polypeptidiques plus courts et en acides aminés. C'est principalement sous les formes de peptides à chaîne courte (< 3 acides aminés) ou oligopeptides et d'acides aminés que les composés azotés sont absorbés par les entérocytes. Deux types de transporteurs sont impliqués dans l'absorption: les systèmes de transporteur d'acides aminés et les systèmes de transporteurs d'oligopeptides. La majorité de l'absorption protéique se fait par l'absorption des

oligopeptides (30) et est principalement assurée par le symporteur oligopeptide/protons PEPT1. PEPT1 est une protéine transmembranaire localisée dans la membrane apicale des entérocytes. Il transporte activement des oligopeptides (<3 acides aminés) depuis la lumière de l'intestin vers le cytoplasme des entérocytes, le gradient de protons fournissant la force motrice nécessaire.

Une première hypothèse concernant les mécanismes cellulaires de la détection des protéines (et des produits de leur hydrolyse) dans l'ingesta au cours de la digestion propose que la détection est initiée par les acides aminés. En effet, il a été montré que la phénylalanine provoque la libération de CCK par les CEECs. La phénylalanine interagit avec les réserves intracellulaires de calcium dans les cellules entéroendocrines et augmente la concentration de calcium intracellulaire. Ce mécanisme a pour conséquence l'exocytose des vésicules de CCK. Cette proposition présente toutefois deux faiblesses. D'abord les concentrations de phénylalanine sont minimales dans l'environnement direct des cellules entéroendocrines. Ensuite, ce mécanisme apparaît comme peu spécifique au regard du neurotransmetteur ou de l'hormone sécrété. Pourtant, il a été observé que les niveaux des autres médiateurs après infusion de protéines dans l'intestin sont plutôt stables. L'hypothèse d'un mécanisme peu spécifique est donc peu probable.

Une autre hypothèse (celle que nous avons choisi de tester) part du principe que les éléments détectés sont vraisemblablement ceux présents en plus grande quantité, à savoir les oligopeptides. Deux études menées *in vitro* et *in vivo* ont suggéré que l'activité du transporteur d'oligopeptides PEPT1 pouvait être à l'origine du phénomène

de détection des protéines dans l'intestin (15; 79). Dans une première étude réalisée *in vitro* sur des cellules STC1, il a été montré que des composés non métabolisables semblables aux oligopeptides, les peptidomimétiques, ont un effet positif sur la libération de CCK (76). Par ailleurs il a été montré *in vivo* que l'infusion dans le tube digestif d'un composé possédant des propriétés peptidomimétiques stimulait la libération de CCK et diminuait la motricité gastrique.

L'intérêt de ces études réside aussi dans le fait que les espèces utilisées sont non métabolisables, ce qui permet de conclure que le signal relatif aux oligopeptides a pour origine l'absorption oligopeptides et non une utilisation métabolique ultérieure.

L'activité de PEPT1 au cours de la digestion initie-t-elle la détection des oligopeptides dans l'intestin ?

Il apparaît donc légitime de proposer que l'activité d'absorption d'oligopeptides via le transporteur PEPT1 soit à l'origine de la détection des protéines alimentaires au cours de la digestion. Nous avons choisi de tester cette hypothèse.

Étude 4: Détermination du rôle du transporteur d'oligopeptides PEPT1 dans la détection des oligopeptides du contenu digestif

Résumé de l'étude

Nous avons testé l'effet d'une infusion intra-duodénale d'un hydrolysate de protéines et d'un composé présentant des propriétés peptidomimétiques sur la motricité gastrique *in vivo* et sur l'activité spontanée du nerf vague *in vitro* chez le rat. Lorsqu'il est injecté seul, l'hydrolysate de protéines augmente la décharge spontanée des afférences vagales et diminue la motricité gastrique. En revanche cet effet n'est pas observé en présence d'un inhibiteur du fonctionnement de PEPT1. Enfin, l'injection d'un composé peptidomimétique non métabolisable dans la lumière intestinale augmente l'activité spontanée des afférences vagales duodénales.

Discussion

Cette étude démontre que l'activité de PEPT1 au cours de la digestion initie la détection des oligopeptides dans l'intestin (figure 29). Toutefois, à la lumière de ces avancées de nouvelles questions sont soulevées.

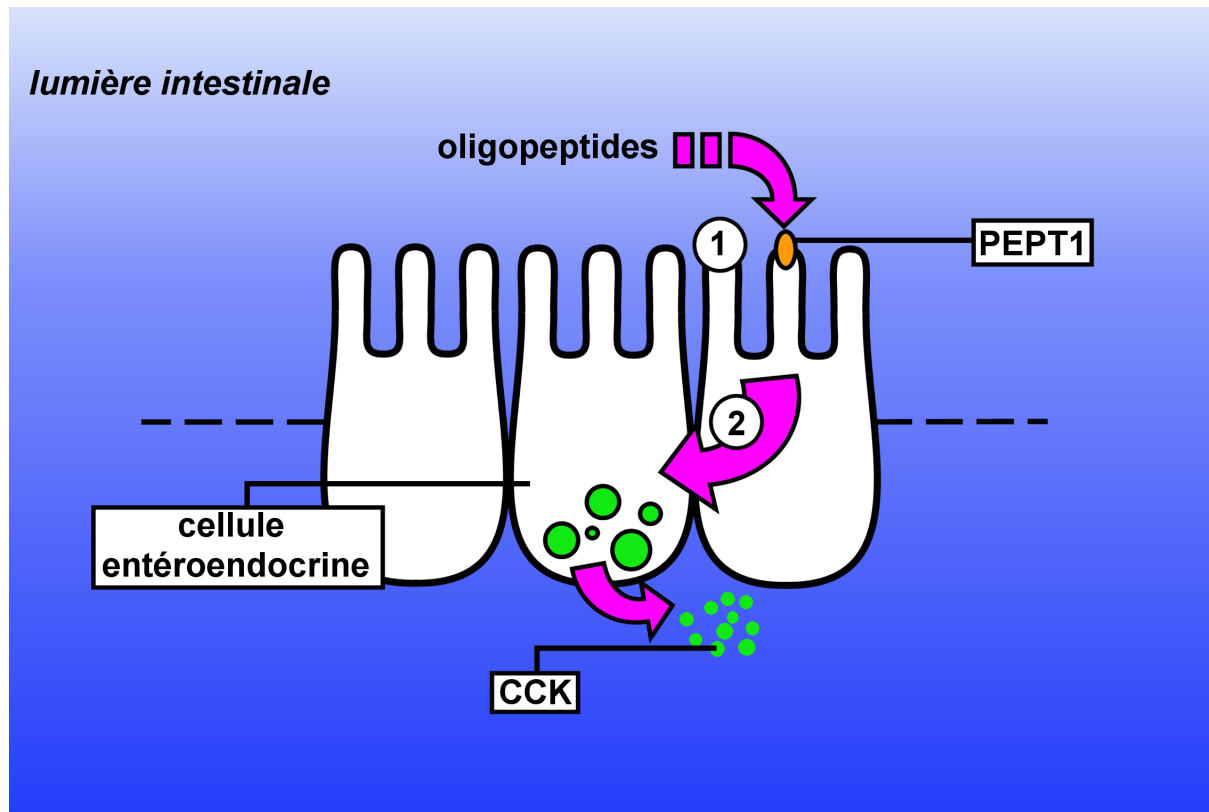


Figure 29: La détection des protéines alimentaires au cours de la digestion.

1) Les protéines alimentaires sont absorbées sous la forme d'oligopeptides et c'est 2) l'activité du principal transporteur d'oligopeptides PEPT1 qui déclenche la libération de CCK dans les cellules entéroendocrines voisines.

Relation entre activité de PEPT1 et libération de CCK

Tout d'abord le lien entre ce système de détection des oligopeptides dans l'intestin et la libération de CCK par les cellules entéroendocrines n'est pas clairement établi dans cette étude. Les fibres sont seulement testées pour leur capacité à répondre à la CCK. Pour soutenir l'hypothèse d'une relation entre l'activité d'absorption de PEPT1 et la libération de CCK une nouvelle étude utilisant des bloqueurs des récepteurs CCK1R devra être menée. Cette relation a néanmoins été suggérée par des études précédentes notamment *in vitro* (15).

Comment l'activité de PEPT1 peut-elle générer un signal cellulaire ?

Une seconde question se pose alors: en supposant que l'activité de PEPT1 déclenche la libération de CCK par les CEECs, comment l'activité de PEPT1 peut elle générer un signal ayant un sens pour la cellule ?

Compte tenu des données sur le fonctionnement de PEPT1, plusieurs hypothèses peuvent être proposées. Premièrement, puisque PEPT1 est un symporteur proton/oligopeptides, il fait entrer des protons dans l'entérocyte. L'activité de PEPT1 est donc associée à un changement local de pH intracellulaire qui pourrait initier une cascade de signalisation (57). Cependant, les variations locales de protons sont

rarement à l'origine de mécanismes de signalisation intracellulaire. Cette hypothèse est donc peu probable.

Une analyse plus approfondie du fonctionnement de PEPT1 permet de proposer une seconde hypothèse. L'activité de PEPT1 conduit à l'augmentation intracellulaire de proton, il existe un échangeur ionique protons sodium localisé au niveau de la membrane apicale. Son rôle est d'échanger les protons entrés via PEPT1 avec des ions Na^+ pour maintenir le pH interne constant. Le bilan de l'activité de PEPT1 est donc une augmentation nette de la concentration intracellulaire de Na^+ . Cette augmentation peut constituer l'élément initiateur de la détection des protéines dans l'intestin, puisque l'entrée massive de Na^+ dans une cellule a pour conséquence sa dépolarisation. Toutefois, considérant les concentrations de sodium de part et d'autre de la membrane, la quantité de sodium à faire pénétrer reste relativement importante. Cette hypothèse aussi paraît peu probable.

Troisième hypothèse, il se peut que PEPT1 interagisse avec des messagers intracellulaires tels que les MAP Kinases. Il a, en effet, été montré que PEPT1 influence l'activité de certaines de ces protéines connues pour jouer un rôle clé dans la signalisation intracellulaire (76). Toutefois, ces voies de signalisation intracellulaires semblent ne pas être impliquées dans les phénomènes de sécrétion de CCK.

Où est localisé PEPT1 ?

Une question préalable à l'étude des mécanismes par lesquels PEPT1 pourrait déclencher la libération de CCK est aussi de savoir sur quel type de cellule se trouve le transporteur. Il a en effet été suggéré que PEPT1 est aussi situé dans d'autres cellules de la muqueuse intestinale. Certaines cellules proches des cellules entéroendocrines comme les cellules de la lignée STC1 expriment PEPT1.

Des données très fragmentaires que nous avons recueillies sur des intestins de rat fixés laissent penser qu'il y a probablement des transporteurs sur les cellules entéroendocrines CCKergiques dans l'intestin mais la précision des données obtenues ne permet pas de conclure (figure 30 et 31).

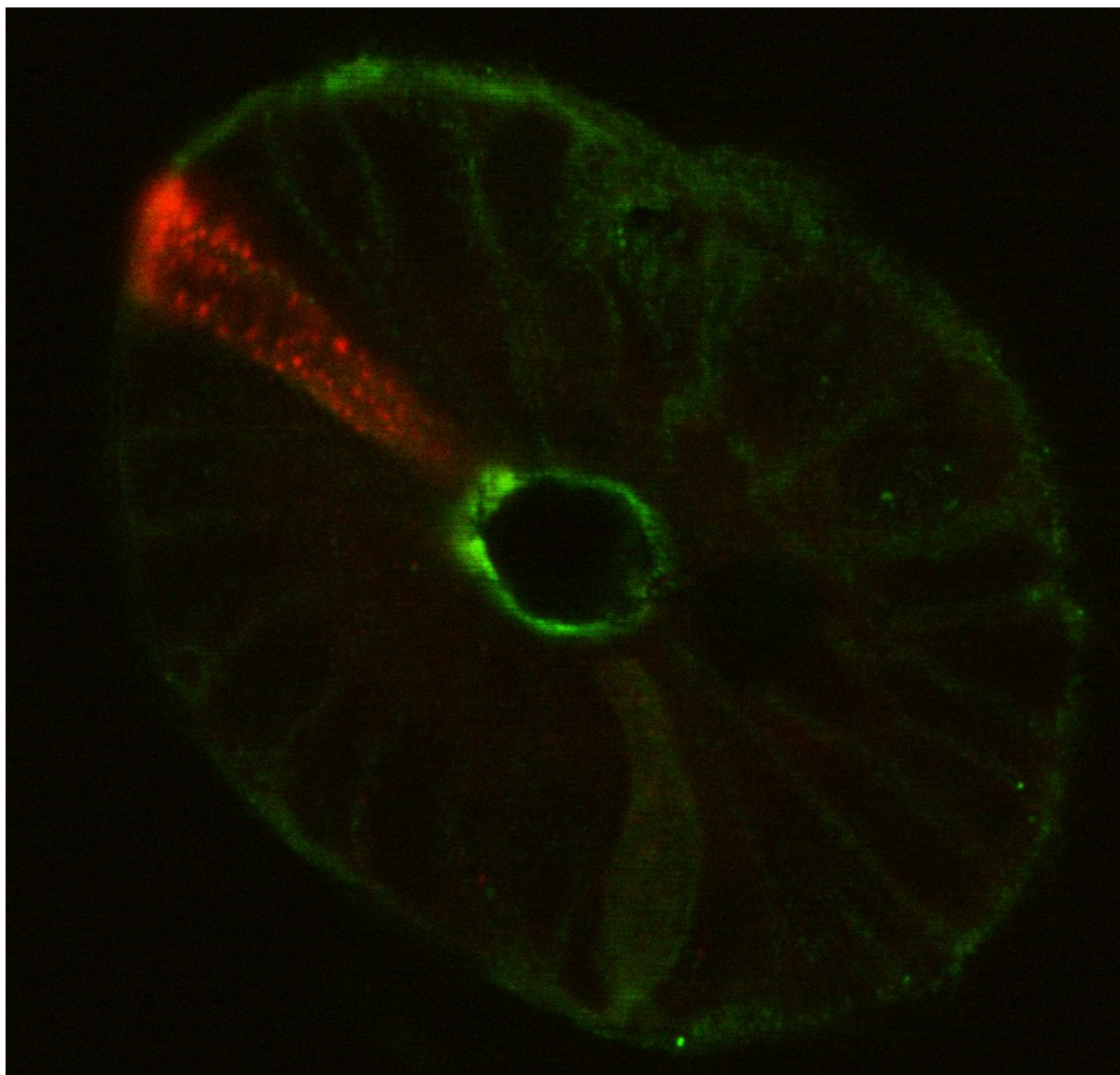


Figure 30: Co-localisation de PEPT1 et de la CCK dans une crypte intestinale d'un duodénum de rat.

Coupe transversale de duodénum de rat (au niveau des cryptes intestinales) fixé dans du paraformaldéhyde ayant subi un double marquage immunologique (révélation par fluorescence) contre PEPT1 (en vert) et contre la CCK (en rouge). Photographie par microscopie confocale.

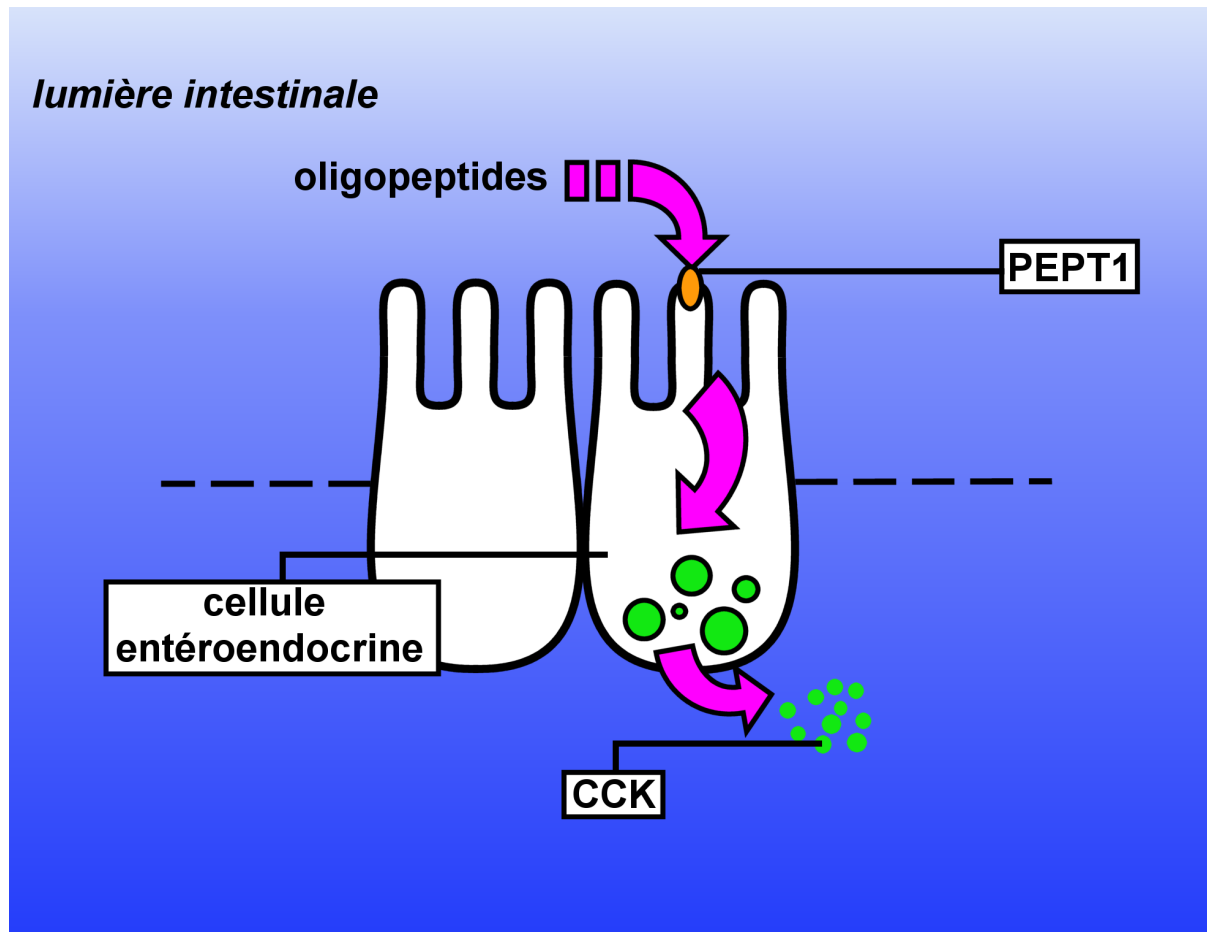


Figure 31: Une hypothèse alternative pour la détection des protéines alimentaires au cours de la digestion.

C'est l'activité du principal transporteur d'oligopeptides PEPT1, localisé sur les cellules entéroendocrines elles mêmes qui déclenche la libération de CCK .

Conclusion

La détection des protéines dans l'intestin au cours de la digestion influence le comportement alimentaire et le fonctionnement du tube digestif. Ce phénomène semble se réduire principalement à la détection de l'absorption des oligopeptides par la muqueuse intestinale et est vraisemblablement initiée par l'activité du transporteur d'oligopeptide PEPT1. Les mécanismes intracellulaires responsables de la genèse du signal restent encore à élucider.

Article: Darcel NP, Liou AP, Tome D and Raybould HE. Activation of vagal afferents in the rat duodenum by protein digests requires PepT1.

Activation of Vagal Afferents in the Rat Duodenum by Protein Digests Requires PepT1^{1,2}

N. P. Darcel,* A. P. Liou, D. Tomé,* and H. E. Raybould³

Department of Anatomy, Physiology and Cell Biology, UC Davis School of Veterinary Medicine, Davis, CA 95616 and *UMR INRA 914 Physiologie de la Nutrition et du Comportement Alimentaire, INAPG, 75231 Paris cedex 05, France

ABSTRACT Intestinal infusion of protein digests activates a vago-vagal reflex inhibition of gastric motility. Protein digests release cholecystokinin (CCK) from enteroendocrine cells; however, the precise cellular mechanisms leading to vagal afferent activation is unclear. The hypothesis that the oligopeptide transporter PepT1 plays a major role in the initiation of this vago-vagal reflex was tested by recording activation of duodenal vagal afferent activity and inhibition of gastric motility in response to protein hydrolysates in the presence of 4-aminomethylbenzoic acid (4-AMBA), a competitive inhibitor of PepT1, or 4-aminophenylacetic acid (4-APAA), an inactive 4-AMBA analog. Duodenal infusion of the protein hydrolysate increased vagal afferent discharge and inhibited gastric motility; these responses were abolished by concomitant infusion of 4-AMBA, but not 4-APAA. Duodenal infusion with Cefaclor, a substrate of PepT1, increased duodenal vagal afferent activity; Cefaclor and protein hydrolysates selectively activated CCK-responsive vagal afferents. This study demonstrates that products of protein digestion increase spontaneous activity of CCK-sensitive duodenal vagal afferents via a mechanism involving the oligopeptide transporter PepT1. *J. Nutr.* 135: 1491–1495, 2005.

KEY WORDS: • nutrient detection • protein • vagal afferents • PepT1 • cholecystokinin

Dietary proteins play a major role in the regulation of motility in the gastrointestinal tract and in the establishment of satiety. For example, infusion of the intestine with hydrolysates of protein inhibits gastric motility and emptying (1,2) and reduces food intake (3,4) in both animals and humans. This response to dietary protein is part of the intestinal feedback regulation of gastrointestinal function and food intake; this homeostatic response matches the digestive and absorptive capacity of the gastrointestinal tract with the entry of nutrients, to ensure efficient digestion and absorption of a meal in the postprandial period. The mechanisms and pathways by which nutrients, including proteins, are detected by the wall of the gut involve local responses of epithelial cells, release of hormones, and activation of neural pathways (5). The vagus nerve conveys information from the gut to the brainstem and plays a major role in the control of postprandial gastrointestinal function and satiety by macronutrients (6,7); the presence of protein hydrolysate in the duodenum effec-

tively releases cholecystokinin (CCK)⁴ from endocrine cells, resulting in the activation of CCK₁ receptors (CCK₁R) on vagal afferent nerve terminals (8). Inhibition of gastric motility in response to protein hydrolysates is mediated by a CCK₁R and vagal afferent reflex pathway (2,9,10). Stimulation of vagal afferent activity in response to protein digests is blocked by specific antagonists of CCK₁Rs (8), and activation of the marker of neuronal activation, fos, in the brainstem is increased by intestinal perfusion of protein hydrolysates via a CCK₁R mechanism (11,12).

The precise mechanism and the cascade of events by which a protein hydrolysate is detected by intestinal epithelial cells and causes the release of CCK from endocrine cells remain unclear. A main process for the uptake of protein hydrolysates in the intestine is the proton-coupled oligopeptide transporter PepT1, a member of the family of peptide transporters found in all species from bacteria to humans (13,14). This transporter is the exclusive oligopeptide transporter of the intestinal mucosa and has a requirement for the di- and tripeptide structure. Thus, it has a large range of substrates from oligopeptides derived from dietary protein to synthesized peptides such as the β -lactam antibiotics and angiotensin-converting enzyme inhibitors. The transporter is localized to the apical membrane

¹ Presented in part at Experimental Biology 04, April 17–21, 2004, Washington, DC [Liou, A., Darcel, N., Tomé, D., & Raybould, H. E. (2004) Vagally-mediated inhibition of gastric motility in response to protein digest is dependent on the oligopeptide transporter PepT1. *FASEB J.* 18: A230 (abs.)] and [Darcel, N., Liou, A., Tomé, D., & Raybould, H. E. (2004) Proton-coupled oligopeptide transporter PepT1 is required for duodenal vagal afferent activation by protein digest. *FASEB J.* 18: A456 (abs.)].

² Supported by National Institutes of Health RO1DK 41004 (H.E.R.) and by Achievement Rewards for College Scientists Foundation scholarship (A.L.).

³ To whom correspondence should be addressed.
E-mail: heraybould@ucdavis.edu.

⁴ Abbreviations used: 4-AMBA, 4-aminomethylbenzoic acid; 4-APAA, aminophenylacetic acid; CCK, cholecystokinin; CCK₁R, cholecystokinin 1 receptor; ERK, extracellular signal-regulated kinase; GLP, glucagon-like peptide; I.A., intrarterial; I.D., intraduodenal; IGP, intragastric pressure; MAP, mitogen-activated protein kinase; RQ, response quotient.

of enterocytes. Protein hydrolysates release CCK from the intestinal mucosa, but it is not clear whether this is a direct effect on endocrine cells or whether the effect of protein hydrolysates is mediated indirectly by releasing factors (15–18). The CCK-producing cell line, STC-1, proved to be a useful model for the study of CCK release; in these cells, the peptidomimetic cephalosporin, Cefaclor, stimulates a calcium-dependent release of CCK (19). This suggests a direct effect of substrates of PepT1 to release CCK from endocrine cells. However, whether this occurs in vivo with native endocrine cells is not known. Cefaclor was also reported to inhibit gastric emptying through a vagal and CCK₁ receptor-mediated mechanism in awake rats (20).

Given the observation that high-protein diets induce satiety and are used in weight reduction programs, there is substantial interest in understanding how signals arising from the gastrointestinal tract associated with protein digestion initiate feedback inhibition of food intake and gastrointestinal function. In the present study, we tested the hypothesis that PepT1 activation is required for activation of vagal afferent nerve fibers to initiate intestinal feedback in response to protein hydrolysates. This hypothesis was tested by determining the ability of protein hydrolysates to stimulate the activity of duodenal vagal afferent fibers and to inhibit gastric motility in the presence of 4-aminomethylbenzoic acid (4-AMBA), a nontranslocated PepT1 competitive inhibitor (21), or 4-APAA, a translocated 4-AMBA analog that does not inhibit the transport of di- and tripeptides (22). We also tested the effects of Cefaclor, a cephalosporin antibiotic, for its ability to stimulate vagal afferent fiber activity.

MATERIALS AND METHODS

Animals, drugs and chemicals. Sprague-Dawley male rats (Harlan) weighing 200–300 g were housed in a room controlled for temperature (21–23°C). All experimental procedures complied with the UC Davis Institutional Animal Care and Use Committee.

CCK-8 was dissolved in physiological saline to make a 10 nmol/L stock solution, which was stored at –20°C and diluted as required. Peptone (enzymatic hydrolysate Type 1: from meat) was dissolved in physiological saline to the desired concentration. 4-AMBA and 4-APAA were dissolved (10 mmol/L) in physiological saline. Cefaclor was dissolved (100 mmol/L) in physiological saline. Normal rat saline was made as previously described (23) (mmol/L: 140 NaCl, 5 KCl, 1 MgCl₂, 1.3 Na₂HPO₄, 5 HEPES, 2 CaCl₂, and 10 D-glucose, pH 7.38 ± 0.02). All chemicals and drugs were obtained from Sigma Chemical unless otherwise specified.

Measurement of gastric motility. Gastric motility measurement was performed in rats as previously described (24). Briefly, rats (200–250 g) were anesthetized with urethane (1.25 g/kg, i.p.; Sigma), a catheter was placed in the trachea to ensure a clear airway, and a catheter was placed through an incision in the forestomach to measure intraluminal gastric pressure (IGP). A second catheter was placed in the proximal duodenum via the stomach just distal to the pylorus, and a third catheter was placed 4–5 cm distal to the pylorus. The proximal duodenal cannula was used for nutrient and drug perfusion, and the more distal cannula was allowed to drain freely. The stomach was placed under 5–6 cm H₂O pressure at the start of the recording period to standardize baseline intraluminal pressure. IGP (cm H₂O) was displayed and collected online for the duration of the experiment via an A/D converter (Axon Instruments) connected to a PC.

Rats were divided into 2 groups. One group (n = 20) was perfused with either 4 or 8% peptone. In the other group (n = 12), the duodenum was perfused with an 8% peptone solution for 10 min at a rate of 0.05 mL/min, and then with saline at the same rate for another 10 min to flush duodenal contents. The duodenum was perfused with either a 10 mmol/L solution of the competitive inhibitor of PepT1, 4-aminomethylbenzoic acid (4-AMBA; n = 7), or 4-aminophenyl-

acetic acid (4-APAA; n = 5) for 5 min, followed by 8% peptone + 10 mmol/L 4-AMBA or 8% peptone + 10 mmol/L 4-APAA for another 10 min at 0.05 mL/min.

The decrease in the height of phasic gastric contractions was measured as the mean decrease in height over 2 min of perfusion with peptone or peptone and 4-AMBA or 4-APAA. The decrease in tonic IGP was taken as the nadir of the trace over the same time period compared with baseline.

Recording of vagal afferent nerve fiber discharge. The method used was published previously (23). Briefly, rats were deeply anesthetized (sodium pentobarbital, Nembutal 100 mg/kg i.p.), decapitated, and a segment of the thoracic esophagus, stomach, and proximal duodenum (~4 cm from the pylorus to the common bile duct) was removed and immersed in oxygenated normal rat saline. The pancreas and stomach were removed, except for the pylorus and adjacent antrum, and the subdiaphragmatic dorsal vagus nerve was identified. A catheter was placed into the gastroduodenal artery and the hepatic, left, and right gastric arteries were tied. The segment was pinned into the main chamber of a sylgard-coated organ bath that was perfused continuously with oxygenated normal rat saline at 2.0–2.5 mL/min flow rate; the temperature of the organ bath was maintained at 33 ± 1°C. The isolated dorsal vagus nerve was placed into the recording chamber.

A thin nerve strand was isolated from the dorsal gastric vagus nerve trunk; the distal cut end was wrapped around one lead of a bipolar platinum recording electrode and a strip of neighboring connective tissue was wrapped around another lead to serve as the indifferent electrode. Action potentials were sent to a preamplifier (Model 1700 differential AC Amplifier AM-System), displayed on a digital storage oscilloscope (model 3012, Tektronix), and recorded online using a digital tape recorder (Sony high-density linear A/D D/A optical digital audio tape deck, DTC-ZE700). In addition, unit potentials were simultaneously sent to a A/D module (Micro 1401 MK2, CED) connected to a PC computer. Electrophysiologic recording from duodenal vagal afferents was started ~30 min after the preparation under stable recording conditions. Units were selected by the presence of spontaneous activity in the nerve strand. Each nerve strand containing spontaneously active units was tested for the response to intra-arterial (i.a.) injection of CCK (10 pmol). In 10 preparations, nerve strands containing CCK-responsive units were tested to determine their response to intraduodenal (i.d.) infusion of protein hydrolysates or protein hydrolysates and 4-AMBA or 4-APAA (100 μmol/L, 0.3 mL). Alternatively, in a further 6 preparations, the response of duodenal vagal afferents to Cefaclor infusion (100 mmol/L, 0.3 mL) was tested.

Using the acquisition module of SPIKE2 impulse analysis software (SPIKE2 version 5, CED), units within the upper and lower threshold settings of the amplifier were acquired online onto the hard drive of a PC. Single units were discriminated offline from the multiunit recordings based on their shape. The response pattern of different units was analyzed and displayed separately. Response magnitudes were normalized by a response quotient (RQ), where RQ = the 5-min spike count after treatment divided by 5 min of spike counts before. A value of RQ > 1.20 was taken to indicate an excitatory response and RQ = 1 ± 0.20 indicates no response.

Statistical analysis. Differences in the decrease in intragastric luminal pressure in response to 4 and 8% peptone were determined by unpaired *t* test. Differences in response to 8% peptone with and without AMBA or APAA were determined using a paired *t* test. In electrophysiologic experiments, the differences in response quotient of individual vagal units in response to 8% peptone with and without AMBA or APAA were determined by paired *t* test. Data are expressed as means ± SEM and differences were considered to be significant at *P* < 0.05.

RESULTS

Effects of PepT1 blockade on peptone-induced inhibition of gastric motility. Intraduodenal perfusion of 4% peptone decreased tonic IGP by 0.11 ± 0.11 cm H₂O (n = 15), whereas perfusion of 8% peptone decreased tonic IGP by 0.72 ± 0.39 cm H₂O (n = 5) (4 vs. 8% peptone, *P* < 0.05, Fig. 1).

The height of phasic contractions decreased by 0.35 ± 0.06 cm H₂O ($n = 14$) with a perfusion of 4% peptone and by 0.90 ± 0.16 cm H₂O during perfusion of 8% peptone ($n = 5$) (4 vs. 8% peptone, $P < 0.02$; Fig. 1).

The addition of 4-AMBA, a PepT1 competitive inhibitor, significantly attenuated the peptone-induced inhibition of phasic gastric contractions (Fig. 2A,B). The height of phasic gastric contractions decreased by 1.65 ± 0.38 cm H₂O during perfusion of 8% peptone ($n = 7$); this response was attenuated by 71% with the addition of 4-AMBA ($P < 0.01$). The decrease in tonic IGP was reduced by 74%, but this was not significant ($P = 0.07$). In contrast, the addition of 4-APAA had no effect on the peptone-induced decrease in baseline IGP or the height of phasic gastric contractions (Fig. 3). Intestinal perfusion with peptone (8%; $n = 5$) decreased tonic IGP and the height of phasic contractions by 0.79 ± 0.30 and 1.55 ± 0.29 cm H₂O, respectively. Administration of peptone with 4-APAA decreased tonic IGP and the height of phasic gastric contractions, but the changes did not differ from those due to perfusion of peptone alone ($P = 0.6$, $n = 5$). Infusion of 4-APAA alone inhibited tonic IGP (change in IGP: 0.49 ± 0.18 cm H₂O, $P < 0.01$, $n = 5$).

Effect of inhibition of PepT1 on peptone-induced increase in vagal afferent fiber discharge. Duodenal infusion of protein hydrolysate (8% peptone) increased spontaneous vagal afferent multiunit activity $64 \pm 24\%$ ($P < 0.05$, $n = 9$ preparations Fig. 4). Of 13 units responding to protein (RQ > 1.2), 11 units (85%) also responded to CCK (RQ > 1.2). The remaining units may have responded to CCK, but with a smaller response amplitude (RQ < 1.19). When 8% peptone was infused together with $100 \mu\text{mol/L}$ 4-AMBA, vagal afferent activity did not differ. In contrast, duodenal infusion of 8% peptone in the presence of 4-APAA increased vagal afferent firing $93 \pm 49\%$ ($P < 0.05$, Fig. 4).

Infusion of the intestine with Cefaclor (100 mmol/L), a substrate of PepT1, increased spontaneous vagal afferent activity by $75 \pm 15\%$ (Table 1, Fig. 5). Of 12 units responding to Cefaclor (RQ > 1.2), 11 units (91%) responded to CCK (RQ > 1.2).

DISCUSSION

There is considerable evidence that the release of CCK by endocrine cells and the subsequent activation of CCK₁R on vagal afferent fibers is a main pathway that mediates the ability of protein in the intestine to inhibit gastric emptying (10,25) and to stimulate pancreatic enzyme secretion (26). The data presented in this manuscript provide further evidence that the

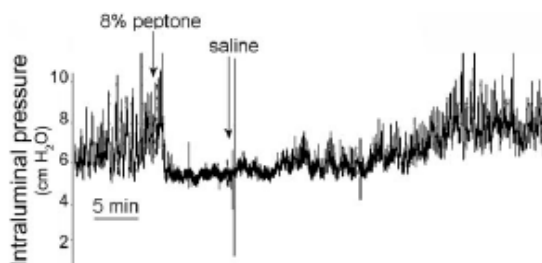


FIGURE 1 Reproduction of original trace of intragastric pressure measured in an anesthetized rat showing the decreases in tonic and phasic components of intragastric pressure in response to duodenal perfusion of 8% peptone.

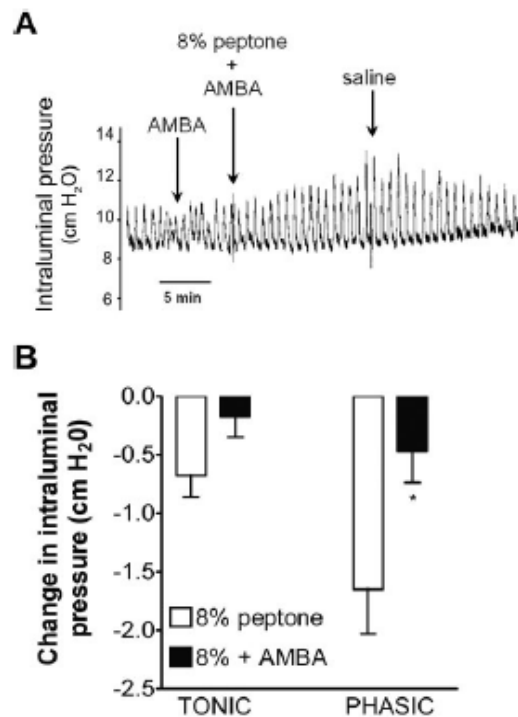


FIGURE 2 Effect of duodenal perfusion of protein digests in the presence of 4-AMBA a competitive inhibitor of PepT1 on intragastric pressure in an anesthetized rat, showing a reproduction of an original trace of intragastric pressure from an individual experiment (A) and the mean data (B). (A) Reproduction of original trace of luminal pressure showing no decrease in the height of phasic gastric contractions and no decrease in tonic intragastric pressure during intraduodenal perfusion of peptone (8%) with 4-AMBA (10 mmol/L). (B) Effect of infusion of 4-AMBA on peptone-induced inhibition of gastric motility. Values are means $\pm$ SEM, $n = 5$ –7/group. *Different from 8% peptone, $P < 0.01$.

ability of luminal perfusion of protein hydrolysates to stimulate CCK-responsive vagal afferent fiber discharge and inhibit gastric motility was blocked in the presence of a competitive inhibitor of PepT1. Moreover, Cefaclor, a specific substrate for PepT1, increased CCK-responsive vagal afferent fiber activity. Taken together, these findings are consistent with the hypothesis that entry of di- and tripeptides into cells in the intestinal mucosa via PepT1 is involved in the sensory transduction process by which the protein hydrolysate content of the intestinal lumen is signaled to vagal afferent nerve terminals to induce activation of a neural pathway and a vagal reflex inhibition of gastric motility.

The present study provides direct support for a role for PepT1 in the intestinal sensory transduction process induced by protein hydrolysate by using the competitive inhibitor 4-AMBA. 4-AMBA binds to PepT1 with high affinity (low millimolar range) but is not translocated by PepT1 (21). In contrast, 4-APAA binds to PepT1 and is translocated (22). One feature that distinguishes these 2 molecules is the N-terminus; it is likely at the pH in the intestine, 4-AMBA will be cationic, whereas 4-APAA will be neutral, and cationic dipeptides are generally poorer substrates for the transporter

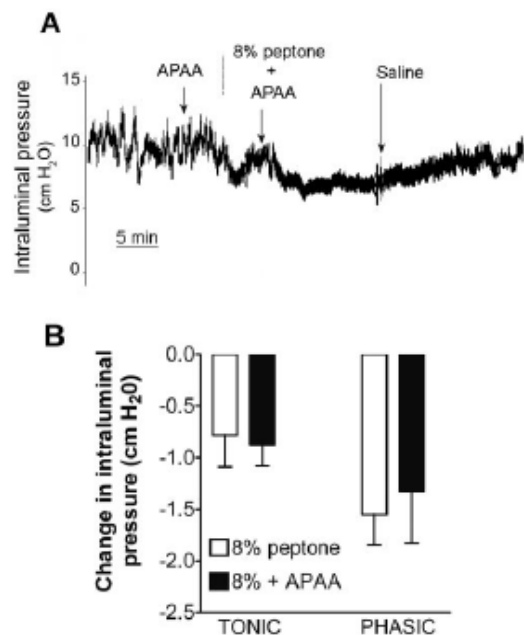


FIGURE 3 Effect of duodenal perfusion of protein digests in the presence of 4-APAA, an inactive 4-AMBA analog acid, on intragastric pressure in an anesthetized rat, showing a reproduction of an original trace of intragastric pressure from an individual experiment (A) and the mean data (B). (A) Reproduction of original trace of intragastric pressure showing a decrease in the height of phasic gastric contractions and a decrease in tonic intragastric pressure with intraduodenal perfusion of 8% peptone in the presence of 4-APAA (10 mmol/L). (B) Effect of infusion of 4-APAA on peptone-induced decrease in the height of phasic gastric contractions and on tonic intragastric pressure. Values are means $\pm$ SEM, $n = 5-7$ /group.

(14). It was interesting to note that 4-APAA is capable of trans-stimulation and cis-inhibition of PepT1 (22). Interestingly, intestinal perfusion of 4-APAA alone also produced a small but significant inhibition of gastric motility, further

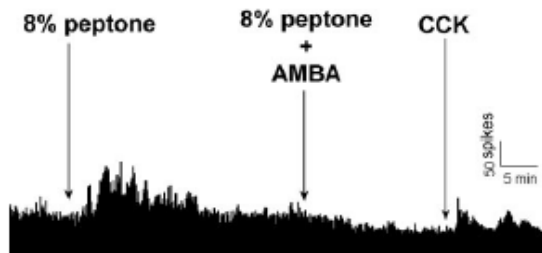


FIGURE 4 Effect of intraduodenal perfusion of protein digests on vagal afferent nerve fiber discharges. Rate histogram of multiunit vagal afferent fiber discharge innervating the duodenum showing an increase in neural discharge in response to intraduodenal infusion of 8% peptone; this increase is abolished by co-infusion of the PepT1 inhibitor 4-AMBA. Vagal afferent discharge was also increased by close arterial injection of CCK (10 pmol i.a.).

TABLE 1

Effect of Cefaclor and CCK on the discharge of individual duodenal vagal afferent fibers recorded in an in vitro preparation of the rat duodenum¹

Afferent	CCK (10 pmol i.a.)	Cefaclor (100 mmol/L i.d.)
1	1.60	1.20
2	1.19	1.70
3	1.21	1.56
4	1.41	1.23
5	1.20	1.21
6	2.47	2.33
7	1.64	2.56
8	1.33	2.22
9	1.72	2.39
10	2.43	1.60
11	2.25	1.20
12	1.71	1.55
Mean $\pm$ SEM	1.68 $\pm$ 0.14	1.75 $\pm$ 0.15

¹ Data are expressed as response quotient (RQ), the ratio of the spike count before and after treatment.

supporting our hypothesis for a role of PepT1. Moreover, it was shown previously that Cefaclor delays gastric emptying via a CCK₁R and vagal afferent pathway (20). The present study supports and extends these findings by showing that Cefaclor stimulates CCK-responsive vagal afferent fiber discharge. This increase in vagal afferent activity will activate vagal efferent outflow to inhibit gastric motility, thus resulting in delayed gastric emptying. This result is consistent with the hypothesis that absorption via PepT1 stimulates release of CCK and activation of vagal afferent fiber discharge. Expression of PepT1 by enterocytes is regulated by a number of factors including diet and leptin, and increased protein in the diet will increase the expression of PepT1 (13,14).

This study provides evidence that PepT1 is involved in the release of CCK, but this could be due to an interaction of PepT1 expressed either on absorptive enterocytes or directly on CCK-secreting endocrine cells (15-18). In the gut, PepT1 is localized to the apical membrane of the enterocytes and is most highly expressed along the whole length of the small intestine (13). No expression was found in the mucus-secreting goblet cells or in crypts (27), although detailed double-

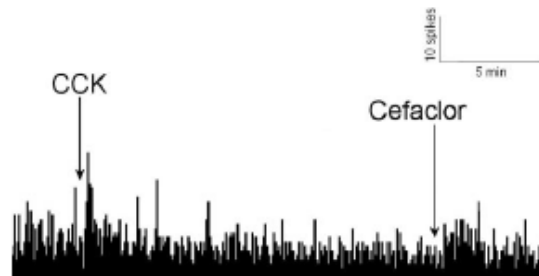


FIGURE 5 Effect of intraduodenal perfusion of Cefaclor, a cephalosporin antibiotic, on vagal afferent nerve fiber discharges. Rate histogram of single-unit vagal afferent fiber discharge innervating the duodenum showing an increase in fiber discharge to luminal perfusion with Cefaclor. The discharge of this duodenal vagal afferent was also increased by close arterial injection of CCK (10 pmol).

labeling to determine colocalization with enteroendocrine cell products has not been reported. In contrast, it remains possible that endocrine cells express PepT1. Recent studies used the STC-1 cell line as a model for release of CCK from endocrine cells (28). These cells, originally isolated from a mouse endocrine tumor, release several gastrointestinal hormones including CCK, glucagon-like peptides (GLP) 1 and 2, and glucose-insulinotropic peptide in response to pharmacologic and physiologic stimuli. Peptidomimetics stimulate the release of CCK and GLP-1 from STC-1 cells, associated with an increase in intracellular calcium (19,29). Peptones were also shown to increase transcription of the CCK and glucagon gene and to stimulate *c-fos* expression in STC-1 cells (19,29,30). Peptidomimetics also increased phosphorylation of p42/44 mitogen-activated protein (MAP) kinase [extracellular signal-regulated kinase (ERK)-1/ERK-2]; the increase in *c-fos* expression, but not CCK release, was reduced by a MAP kinase inhibitor (29). Thus, there is good evidence that STC-1 cells express PepT1, but whether native CCK endocrine cells express PepT1 is unclear. The effectiveness of hydrolysates of protein from a number of different sources was tested in a preparation of dispersed rat intestinal mucosal cells (31). Several different sources of protein were effective in releasing CCK including casein, soy protein, egg white, and wheat gluten. Although this study provides some evidence that native endocrine cells secrete CCK in response to protein hydrolysates, the preparation was undoubtedly contaminated with enterocytes; therefore the role of PepT1 expression in native endocrine cells remains to be determined.

In conclusion, this study provides evidence that the oligopeptide transporter PepT1 is a good candidate in the sensory transduction process involved in the intestinal release of CCK and the subsequent increase in spontaneous activity of CCK-sensitive duodenal vagal afferents. This could be due to an interaction of protein hydrolysate-derived peptides with PepT1 expressed either on absorptive enterocytes or directly on CCK-secreting endocrine cells. The possibility that dietary regulation of PepT1 and its putative role in the intestinal feedback regulation of gastric function and also food intake is suggestive of a mechanism by which high-protein diets may alter food intake.

ACKNOWLEDGMENT

The authors are grateful to Denise Ney for her thoughtful reading of the manuscript.

LITERATURE CITED

1. Raybould, H. E. & Lloyd, K. C. (1994) Integration of postprandial function in the proximal gastrointestinal tract. Role of CCK and sensory pathways. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 713: 143-156.
2. White, W. O., Schwartz, G. J. & Moran, T. H. (2000) Role of endogenous CCK in the inhibition of gastric emptying by peptone and Intralipid in rats. *Regul. Pept.* 88: 47-53.
3. Bensaid, A., Tomé, D., Gletzen, D., Even, P., Morens, C., Gausseres, N. & Fromentin, G. (2002) Protein is more potent than carbohydrate for reducing appetite in rats. *Physiol. Behav.* 75: 577-582.
4. Shi, G., Leray, V., Scarpignato, C., Bentoumou, N., Bruley, D. V., Cherbut, C. & Gaimiche, J. P. (1997) Specific adaptation of gastric emptying to diets with differing protein content in the rat: Is endogenous cholecystokinin implicated? *Gut* 41: 612-618.
5. Buchan, A. M. (1999) Nutrient tasting and signaling mechanisms in the gut. III. Endocrine cell recognition of luminal nutrients. *Am. J. Physiol.* 277: G1103-G1107.
6. Raybould, H. E. (1998) Does your gut taste? Sensory transduction in the gastrointestinal tract. *News Physiol. Sci.* 13: 275-280.
7. Berthoud, H. R. & Neuhuber, W. L. (2000) Functional and chemical anatomy of the afferent vagal system. *Auton. Neurosci.* 85: 1-17.
8. Eastwood, C., Maubach, K., Kirkup, A. J. & Grundy, D. (1998) The role of endogenous cholecystokinin in the sensory transduction of luminal nutrient signals in the rat jejunum. *Neurosci. Lett.* 254: 145-148.
9. Raybould, H. E., Zittel, T. T., Holzer, H. H., Lloyd, K. C. & Meyer, J. H. (1994) Gastrointestinal sensory mechanisms and CCK in inhibition of gastric emptying in response to a meal. *Dig. Dis. Sci.* 39: 419-435.
10. Forster, E. R., Green, T., Elliot, M., Bremner, A. & Dockray, G. J. (1990) Gastric emptying in rats: role of afferent neurons and cholecystokinin. *Am. J. Physiol.* 258: G552-G558.
11. Zittel, T. T., de Giorgio, R., Sternini, C. & Raybould, H. E. (1994) Fos protein expression in the nucleus of the solitary tract in response to intestinal nutrients in awake rats. *Brain Res.* 663: 266-270.
12. Glatzle, J., Kreis, M. E., Kawano, K., Raybould, H. E. & Zittel, T. T. (2001) Postprandial neuronal activation in the nucleus of the solitary tract is partly mediated by CCK-A receptors. *Am. J. Physiol.* 281: R222-R229.
13. Adibi, S. A. (2003) Regulation of expression of the intestinal oligopeptide transporter (PepT-1) in health and disease. *Am. J. Physiol.* 285: G779-G788.
14. Daniel, H. (2004) Molecular and integrative physiology of intestinal peptide transport. *Annu. Rev. Physiol.* 66: 361-384.
15. Beaucher, S., Levenez, F., Yvon, M. & Corring, T. (1994) Effects of gastric digestive products from casein on CCK release by intestinal cells in rat. *J. Nutr. Biochem.* 5: 578-584.
16. Miyasaka, K. & Funakoshi, A. (1998) Luminal feedback regulation, monitor peptide, CCK-releasing peptide, and CCK receptors. *Pancreas* 16: 277-283.
17. Liddle, R. A. (1994) Regulation of cholecystokinin synthesis and secretion in rat intestine. *J. Nutr.* 124: 1308S-1314S.
18. Liddle, R. A. (2000) Regulation of cholecystokinin secretion in humans. *J. Gastroenterol.* 35: 181-187.
19. Cordier-Bussat, M., Bernard, C., Haoche, S., Roche, C., Abello, J., Chayvialle, J. A. & Cuber, J. C. (1997) Peptones stimulate cholecystokinin secretion and gene transcription in the intestinal cell line STC-1. *Endocrinology* 138: 1137-1144.
20. Bozkurt, A., Deniz, M. & Yegen, B. C. (2000) Cefaclor, a cephalosporin antibiotic, delays gastric emptying rate by a CCK-A receptor-mediated mechanism in the rat. *Br. J. Pharmacol.* 131: 399-404.
21. Meredith, D., Boyd, C. A., Bronk, J. R., Bailey, P. D., Morgan, K. M., Collier, I. D. & Temple, C. S. (1998) 4-Aminomethylbenzoic acid is a non-translocated competitive inhibitor of the epithelial peptide transporter PepT1. *J. Physiol.* 512: 629-634.
22. Temple, C. S., Stewart, A. K., Meredith, D., Uster, N. A., Morgan, K. M., Collier, I. D., Vaughan-Jones, R. D., Boyd, C. A., Bailey, P. D. & Bronk, J. R. (1998) Peptide mimics as substrates for the intestinal peptide transporter. *J. Biol. Chem.* 273: 20-22.
23. Glatzle, J., Wang, Y., Adelson, D. W., Kalogeris, T. J., Zittel, T. T., Tso, P., Wei, J. Y. & Raybould, H. E. (2003) Chylomicron components activate duodenal vagal afferents via a cholecystokinin A receptor-mediated pathway to inhibit gastric motor function in the rat. *J. Physiol.* 550: 657-664.
24. Raybould, H. E. & Tache, Y. (1988) Cholecystokinin inhibits gastric motility and emptying via a capsaicin-sensitive vagal pathway in rats. *Am. J. Physiol.* 255: G242-G248.
25. Raybould, H. E. (1991) Capsaicin-sensitive vagal afferents and CCK in inhibition of gastric motor function induced by intestinal nutrients. *Peptides* 12: 1279-1283.
26. Li, Y. & Owyang, C. (1994) Endogenous cholecystokinin stimulates pancreatic enzyme secretion via vagal afferent pathway in rats. *Gastroenterology* 107: 525-531.
27. Oghara, H., Saito, H., Shin, B. C., Terado, T., Takenoshita, S., Nagamachi, Y., Inui, K. & Takata, K. (1996) Immunolocalization of H+/peptide co-transporter in rat digestive tract. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 220: 848-852.
28. Snow, N. D., Mangel, A. W., Sharara, A. I. & Liddle, R. A. (1993) Potassium channels regulate cholecystokinin secretion in STC-1 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 195: 1379-1385.
29. Mural, A., Noble, P. M., Deavall, D. G. & Dockray, G. J. (2000) Control of *c-fos* expression in STC-1 cells by peptidomimetic stimuli. *Eur. J. Pharmacol.* 394: 27-34.
30. Bernard, C., Sutter, A., Vinson, C., Ratineau, C., Chayvialle, J. & Cordier-Bussat, M. (2001) Peptones stimulate intestinal cholecystokinin gene transcription via cyclic adenosine monophosphate response element-binding factors. *Endocrinology* 142: 721-729.
31. Nishi, T., Hara, H., Hira, T. & Tomita, F. (2001) Dietary protein peptic hydrolysates stimulate cholecystokinin release via direct sensing by rat intestinal mucosal cells. *Exp. Biol. Med.* 226: 1031-1036.

Quatrième partie:

*Implication du nerf vague dans le contrôle de la prise alimentaire par
la détection des protéines dans l'intestin*

Étude 5: Effets d'un régime hyper-protéique sur l'activation des régions du système nerveux central impliquées dans la régulation de la balance énergétique

Introduction

Les protéines semblent pouvoir fortement influencer le comportement alimentaire. En effet, parmi les trois macronutriments, les protéines semblent posséder un puissant pouvoir inhibiteur sur la prise alimentaire (11). La compréhension des mécanismes à l'origine de ce phénomène est donc d'une importance critique. Pourtant ces mécanismes sont encore mal connus.

Nous avons vu dans la première partie que certains mécanismes ayant lieu au niveau de l'intestin permettent de détecter la présence de produits de la digestion des protéines lors de leur absorption. Toutefois, les liens entre cette détection précoce et les effets des protéines alimentaires sur le comportement alimentaire sont encore très mal connus.

Il s'agit ici de comprendre, en plus des effets des protéines sur le système nerveux central, si l'action des protéines sur la prise alimentaire peut être mise au crédit (au moins en partie) de la viscérosensibilité et notamment de sa composante vagale.

L'objet de cette étude était de répondre à plusieurs questions relatives à l'effet des protéines sur les systèmes centraux régulant le comportement alimentaire. Premièrement, il s'agissait de déterminer les régions du cerveau qui étaient activées par une alimentation riche en protéines. Deuxièmement, l'activation de ces régions était-elle cohérente avec l'hypothèse d'une influence de la détection périphérique sur le comportement alimentaire ? Troisièmement, pouvait-on déceler des changements dans les motifs d'activation du système nerveux central dans les conditions d'une stimulation importante et maintenue ?

Nous avons étudié les effets des protéines sur le comportement alimentaire grâce à un modèle expérimental assez répandu aujourd'hui: les régimes hyper-protéiques. Ces régimes ont une teneur en protéines largement supérieure aux régimes classiques. L'énergie fournie sous forme de protéines dépasse 50% (protéines/énergie) dans un régime hyper-protéique contre 14% dans une formulation classique (régime normo-protéique). Ces régimes sont connus pour induire des modifications du comportement alimentaire solides et durables, notamment des phénomènes de satiété (103).

Description de l'étude

L'objectif de cette étude était de déterminer les zones du cerveau impliquées dans la modulation du comportement alimentaire induite par des régimes hyper-protéiques. Nous avons collecté les cerveaux de rats adultes provenant de trois groupes différents: dans un premier groupe les rats étaient nourris avec un régime normo-protéique depuis 21 jours, dans un second groupe les rats étaient nourris avec un régime hyper-protéique depuis deux jours seulement. Dans un troisième groupe les rats étaient nourris avec le régime hyper-protéique depuis 21 jours.

Nous avons mesuré l'expression de c-fos (un gène précoce, marqueur de l'activation neuronale, voir annexe 3) pour ces trois conditions dans plusieurs zones du système nerveux central impliquées dans le contrôle de la prise alimentaire. Dans ces expériences, la stimulation consistait en l'ingestion d'une petite quantité fixe du régime auquel les rats étaient soumis.

Si de nombreux changements ont eu lieu dans les régions étudiées au moment de la transition depuis un régime normo-protéique vers un régime hyper-protéique, à long terme peu d'activations ont persisté, à savoir, une augmentation de l'activation du NTS, une baisse de la réponse de l'hypothalamus Ventro-Médian (VMH) et une baisse de la réponse de l'amygdale (figure 32).

Au regard des fonctions prises en charge par ces régions du cerveau, cette étude suggère que les systèmes parasympathiques et sympathiques ainsi que le système limbique sont, en partie, responsables des effets des protéines sur le comportement alimentaire. En effet le VMH est une des régions clés dans le contrôle du tonus sympathique et l'amygdale fait partie du système limbique.

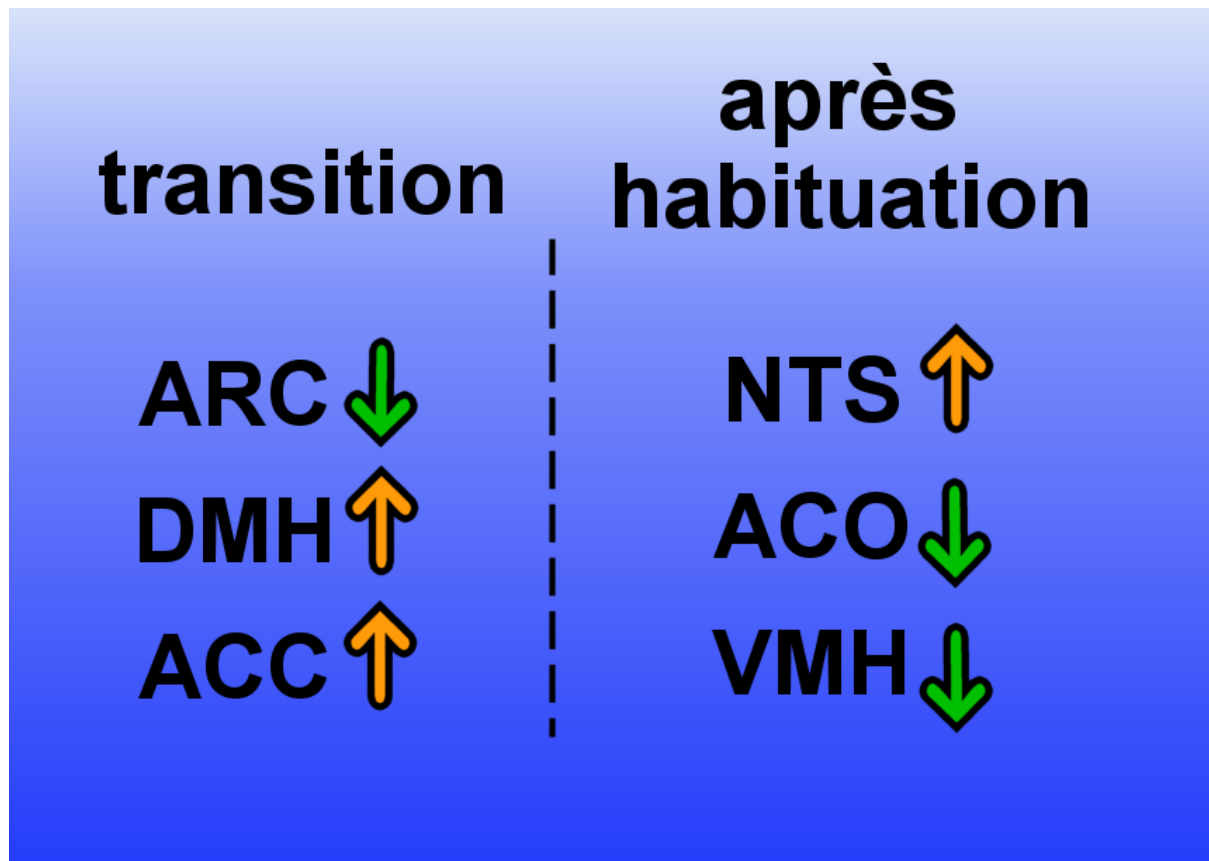


Figure 32: Résumé des activations observées dans le cerveau en réponse à une charge protéique.

Conditions de transition d'un régime NP vers un régime HP ou après habituation au régime HP. ARC: Noyau Arqué ; DMH: Hypothalamus Dorso-Médian ; ACC: Noyau Accumbens ; ACO: cortex de L'Amygdale ; VMH: Hypothalamus Dorso-Médian.

Dicussion

Dans cette étude, deux résultats sont tout particulièrement intéressants au regard de notre démarche.

Tout d'abord, le fait que le NTS soit activé par une stimulation protéique confirme notre hypothèse de la première partie selon laquelle c'est par le nerf vague que transitent les informations relatives à la quantité de protéines ingérées, l'état d'activation du NTS étant le reflet de l'activation du nerf vague. Cette étude montre donc que le système de la viscéro-sensibilité vagale participe activement aux effets inhibiteurs des protéines sur la prise alimentaire.

Ensuite, il est intéressant de remarquer que le niveau d'activation du NTS est différent-au début et à la fin du traitement. Plusieurs explications sont possibles. Deux facteurs peuvent activer l'expression de c-fos dans le NTS: une stimulation par le nerf vague ou une stimulation par l'hypothalamus. L'effet observé ici peut aussi bien résulter d'une activation directe par les afférences vagales ou d'un rétrocontrôle central. Rien de ce que nous savons maintenant ne peut orienter vers l'une ou l'autre des hypothèses. Mais dans le premier cas, une différence d'activation du NTS signifierait alors une

modification de l'intensité de la voie vagale au cours du temps, en réponse à des stimulations répétées.

Conclusion

Pour conclure, si cette étude confirme l'implication de la viscérosensibilité vagale dans l'effet des protéines ingérées sur le comportement alimentaire, elle soulève par là même deux nouvelles questions: s'il est acquis que le nerf vague est impliqué dans ce phénomène, dans quelle mesure y participe-t-il? Existe-t-il une modulation de l'activité du nerf vague en condition de stimulation massive et chronique par des protéines alimentaires? C'est à ces questions précisément que nous allons tâcher de répondre dans la seconde partie de ce chapitre.

Article: Darcel N, Fromentin G, Raybould HE, Gougis S, Gietzen DW and Tome D. Fos-positive neurons are increased in the nucleus of the solitary tract and decreased in the ventromedial hypothalamus and amygdala by a high-protein diet in rats.

Fos-Positive Neurons Are Increased in the Nucleus of the Solitary Tract and Decreased in the Ventromedial Hypothalamus and Amygdala by a High-Protein Diet in Rats

Nicolas Darcel, Gilles Fromentin, Helen E. Raybould,* Sylvette Gougis, Dorothy W. Gietzen,* and Daniel Tomé¹

UMR INRA 914 *Physiologie de la Nutrition et du Comportement Alimentaire*, Institut National Agronomique Paris-Grignon, F75231 PARIS Cedex 05, France and **Department of Anatomy, Physiology and Cell Biology, School of Veterinary Medicine, University of California-Davis, Davis, CA 95616*

ABSTRACT Transition from a normal- (NP) to a high-protein (HP) diet induces a rapid depression in food intake and a progressive but incomplete return to the initial intake during the succeeding days. The aim of this study was to determine which CNS regions are involved in the HP diet-induced satiety in rats. Brains were collected from 3 groups of adult rats after habituation to an NP diet (21 d), during the transition phase to a HP diet (2 d), or after habituation to the HP diet (21 d). Fos expression was measured in several brain areas that are involved in the control of food intake (solitary tract nucleus, anterior piriform cortex, lateral hypothalamus, arcuate nucleus, posterior para ventricular nucleus, medio ventral hypothalamus, dorso medial hypothalamus, amygdala, and accumbens nucleus). Changes occurred in the majority of these regions during the transition period from the NP diet to the HP diet. After habituation to the HP diet, significant changes in Fos expression were restricted to an increase in the nucleus of the solitary tract and a decrease in the ventromedial hypothalamus and the cortex of the amygdala. Considering the functional characteristics of these areas, the present results suggest that the vagus nerve conveys the information relative to the quantity of protein ingested, that hypothalamic sites regulate food intake and may alter sympathetic nervous system activity, and that higher brain functions such as memory processing by the limbic system or food reward system are involved in the HP diet-induced satiety in rats. *J. Nutr.* 135: 1486–1490, 2005.

KEY WORDS: • brain • vagus nerve • satiety • protein

Protein is considered to be a strong inhibitor of food intake in omnivores and to have the greatest appetite-suppressive effects of the 3 macronutrients (1,2). For instance, increasing the level of dietary protein from 14 to 50% was shown to decrease food intake in freely fed rats, and this effect seemed to be due to an enhancement of satiety rather than to low palatability or to the induction of a conditioned food aversion (3–5). Dietary proteins are also thought to be closely monitored by the central nervous system (CNS),² especially by central structures such as the hypothalamus and the anterior piriform cortex (APC), regions that control or influence food intake (6,7). Because proteins are likely to be monitored in the same regions in which satiety is thought to originate, dietary proteins may influence the onset of satiety in those regions (8).

HP diet-induced satiety may thus provide a promising model for studying satiety in omnivores.

Hypothesizing that dietary protein intake is centrally monitored and may influence central satiety pathways, the specific aims of the present study were to identify the CNS areas involved in the processing of information related to high dietary protein levels. For this purpose, the *c-fos* immediate early gene product, the Fos protein, was used as a probe for meal-induced neuronal activation in CNS regions involved in the control of food intake, viscerosensitivity, regulation of energy homeostasis, food reward system, and sensation reinforcement (9–13). These include the dorsal motor complex, the hypothalamus, the APC, the accumbens nucleus (ACC), and the extended amygdala.

MATERIALS AND METHODS

Drugs and chemicals. Pentobarbital sodium was purchased from Sanofi. Primary polyclonal antibody pAb5 raised against Fos protein was purchased from Oncogene Science. Secondary antibody and ABC kits (Vectastain) were purchased from Vector Laboratories. Basic laboratory chemical supplies were purchased from Sigma. Total milk protein was purchased from Armor Protéines; sucrose was purchased from Eurosucre; cornstarch was purchased from Cerestar; vitamin and salt mixtures AIN-93M and choline chloride were pur-

¹ To whom correspondence should be addressed. E-mail: tome@inapg.fr.
² Abbreviations used: ACC, nucleus accumbens; ACN, amygdala, central nucleus; ACO, amygdala, cortex; AP, area postrema; APC, anterior piriform cortex; ARC, arcuate nucleus; CCK, cholecystokinin; CNS, central nervous system; DAB, diaminobenzidine; DMH, dorsomedial hypothalamus; HP, high-protein diet; HP-d2, group of rats habituated to NP and fed HP for 2 d; HP-d21, group of rats habituated to HP; LH, lateral hypothalamus; NP, normal-protein diet; NP-d21, group of rats habituated to NP; NTS, nucleus of the solitary tract; PBN, parabrachial nucleus; P/E, percentage of total energy made up with protein; PVN, paraventricular nucleus; VMH, ventromedial hypothalamus.

chased from ICN Biomedicals; soy oil was purchased from Bailly; and cellulose was purchased from Medias Filtrants Durieux. Diets were prepared by the Atelier de Préparation des Aliments Expérimentaux (INRA) (Table 1).

Animals and feeding schedule. Male Wistar rats ($n = 18$; Harlan) weighing 200–220 g at the beginning of the experiment were housed individually in hanging wire cages in an artificially illuminated room at 22°C with light onset at 2000 h and a 12-h light:dark cycle; rats had free access to water. Rats were fed a normal-protein (NP) diet for 4 d, then divided into 3 groups of 6 rats, fed for 21 d as follows: the NP-d21 group (habituation to NP) was fed the NP liquid diet for 21 d; the high-protein (HP)-d2 group (transition to HP) was subsequently fed the NP diet and the HP liquid diet for 19 and 2 d, respectively; the HP-d21 group (habituation to HP) was fed the HP liquid diet for 21 d. The daily feeding schedule was as follows: 1) at the end of the light cycle (0800) rats were given a preweighed 2-g calibrated sample of their diet, which they were trained to ingest in 15 min; 2) from 0930 to 1700 h, rats consumed the diet *ad libitum*. To minimize spillage, both NP and HP diets were moistened (powder: water ratios were 1:1 and 1:2, respectively). Food intake was determined by the difference in weight of the food cup before and after each experimental period, corrected for spillage and evaporation. In the case of the preweighed NP and HP samples, the powder:water ratio was set to 1:1.5 (2 g powder:3 g water). The preweighed meal size was chosen so that the meal could be ingested within 15 min. This procedure allowed comparable experimental volume, weight, and energy meal-induced stimuli regardless of the diet rats were fed on the day of brain collection. Body weights and food intake were monitored daily.

Tissue collection and immunohistochemical staining. Considering the dynamics of Fos protein expression in the CNS (14), tissue was taken and fixed 90 min after the initial stimulation. On the experimental d 21, rats were fed the preweighed 2-g calibrated sample of their current diet and were killed 90 min later (without consuming their regular ration) with a lethal injection of pentobarbital sodium (90 mg/kg, i.p.). The thoracic cage was opened and rats were perfused intracardially with 500 mL of saline at 37°C followed by 1000 mL of 4% paraformaldehyde in PBS. The forebrain and spinal cord were exposed from the cervical spinal segment C2 to the olfactory bulb; the entire forebrain, cerebellum, and the first 2 cervical spinal segments were removed. This portion of the CNS was cryoprotected using 15% sucrose in PBS for 2 h and then stored in 30% sucrose in PBS with sodium azide to prevent bacterial contamination. The brain regions of interest were localized using a stereotaxic atlas. Transverse 40- μ m thick sections corresponding to the regions of interest were cut with a cryostat at -22°C and collected in PBS. One slice in 5 was collected to be processed as a free-floating section and was immunostained for Fos protein according to the avidin-biotin peroxidase method. Sections were incubated in normal goat serum (2% in PBS and 0.3% Triton X-100) for 1 h, then incubated in the primary antiserum containing the polyclonal pAb5 antibody raised against Fos protein diluted 1:5000 for 48 h. Sections were then washed in

PBS, incubated in biotinylated goat anti-rabbit antiserum for 24 h, washed, and incubated for 1 h in avidin-peroxidase complex. Staining was developed in 0.05% diaminobenzidine (DAB) with 0.03% hydrogen peroxide. The DAB reaction was halted with several PBS washes, and the sections were mounted on gelatin-coated slides. After being dried overnight, sections were cleared in an ascending series of ethanol baths (70, 95, and 100%, 10 min each bath) followed by a 5-min bath in xylene. Sections were mounted on gelatin-coated slides and cover-slipped. To control for staining variability between days, each immunohistochemistry run contained matched sections from all experimental groups.

Immunolabeling quantification. Sections were examined with a light microscope; for each rat and each brain region, 5 corresponding sections were chosen for further cell count, and sections were carefully selected to study a constant location in the brain. Analyzed sections were magnified under an Olympus BH-2 light microscope and the image was relayed to a computer through a video camera. Image processing was performed using the video-based analysis system BIO-COM. Pictures were then analyzed using an imaging software; c-fos-positive cells appeared in brown whereas the background remained slightly yellow. Immunolabeling quantification was processed automatically by the imaging program by setting minimum and maximum optical density levels and then manually by correcting the software miscounts.

Statistical analysis. Data from for each region and group were the mean sum of counts of the 5 slices/rat for each rat constituting the group. Results are expressed as means $\pm$ SEM. Data were evaluated by ANOVA or ANOVA for repeated measures (food intake data) (SAS version 6.11). A post-hoc Tukey's honestly significant difference test was used to compare between-group means when the ANOVA test was significant. Differences were considered significant at $P < 0.05$.

RESULTS

When the rats were switched from the NP to the HP diet, d 1 food intake decreased to ~50% (Fig. 1). Food intake then remained at ~80% of the NP intake after habituation. Rats rapidly became habituated to the daily feeding schedule and learned to eat the 2-g preweighed diet sample in 15 min. All CNS studied regions, except the parabrachial nucleus (PBN) and the area postrema (AP), clearly exhibited Fos protein expression (Table 2).

Fos expression during transition from the NP to the HP diet (NP-d21 vs. HP-d2). Three of the 12 CNS regions studied showed changes in Fos expression in the early phase of the transition from the NP to the HP diet: the arcuate nucleus (ARC), the DMH, and the ACC ($P < 0.01$) (Table 3). In contrast, the nucleus of the solitary tract (NTS); APC; paracentricular nucleus (PVN); amygdala, cortex (ACO); amygdala, central nucleus (ACN); PBN; and AP were not affected. In the early phase of the transition to a HP diet, Fos expression was significantly increased by 96 and 59% in the DMH and ACC, respectively, and significantly decreased by 51% in the ARC.

Fos expression after habituation to the HP diet (HP-d2 vs. HP-d21). In rats fed the NP-d2 diet, alterations in Fos protein expression were observed in the NTS, ARC, lateral hypothalamus (LH), DMH, ACN, and ACC ($P < 0.01$) but not in the APC, PVN, ventromedial hypothalamus (VMH), ACO, PBN, or AP. Fos expression was increased by 131 and 69% in the NTS and ARC, and significantly decreased by 47, 43, 42, and 51% in the LH, DMH, ACN, and ACC, respectively. In the APC, LH, DMH, ACN, and ACC, these changes constituted a return to NP-d21 levels.

Fos expression after habituation to the HP or to the NP diet (NP-d21 vs. HP-d21). In rats fed the HP-d21 diet, only 3 of the 12 areas studied differed significantly: the NTS, the VMH, and the ACO ($P < 0.001$). Fos expression was increased by 126% in the NTS, and decreased by 30 and 45% in

TABLE 1

Diet composition (powdered diets)

Ingredient	NP	HP
	<i>g/kg</i>	
Protein (Milk)	140	500
Cornstarch	619.7	312.7
Sucrose	103	50
Soybean oil	40	40
Vitamin mixture AIN-93M1	35	35
Salt mixture AIN-93M1	10	10
Cellulose	50	50
Choline chloride	2.3	2.3
Metabolizable energy, <i>kJ/g</i>	14.89	15.77

1 Source: Ref. (34).

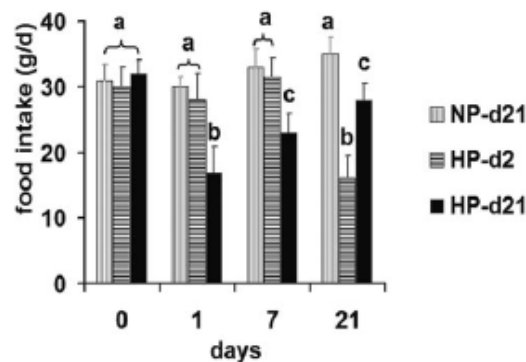


FIGURE 1 Food intake in rats fed a NP diet for 21 d or switched to a HP diet for 2 or 21 d. Values are means $\pm$ SEM, $n = 8$. Means with different letters differ, $P < 0.05$ (diet effect $P < 0.01$; time effect $P < 0.001$; time $\times$ diet effect $P < 0.001$).

the VMH and ACO, respectively. The NTS showed the most marked increase on d 21, whereas decreases in the VMH and ACO appeared to result from a trend on d 2 ($P = 0.1$ and 0.08 , respectively) and became significant by d 21.

DISCUSSION

Assuming that Fos expression provides a reliable marker of neuronal activation (14,15), the present study showed significant modifications in the activity of several CNS areas when rats were switched from NP to HP diets (NP-d21 to HP-d2) and after habituation to the HP diet (HP-d21). It is interesting that the patterns of Fos immunoreactivity were markedly different in the several brain areas studied.

During the transition period (HP-d2 vs. NP-d21), quantification of Fos expression revealed changes in the activity of 3 distinct brain areas: the ARC, the DMH, and the ACC. VMH ($P = 0.06$) and ACO ($P = 0.08$) tended to decrease over the course of HP feeding. Fos protein expression was decreased briefly by 51% in the ARC, which was reported to act as a central chemosensor for circulating satiety signals, including leptin and insulin (16). After adaptation (HP-d21 vs. NP-

TABLE 3

Changes in Fos expression in brain areas of rats switched from NP to HP diets¹

	Transition ² (HP-d2 vs. NP-d21)	Habituation (HP-d21 vs. HP-d2)	Overall (HP-d21 vs. NP-d21)
NTS	→	↑	↑
APC	→	→	→
ARC	↓	↑	→
PVN	→	→	→
LH	→	↓	→
VMH	→	→	↓
DMH	↑	↓	→
ACO	→	↓	↓
ACN	→	↓	↓
ACC	↑	↓	→

¹ ↑, significant increase or decrease in fos expression; →, no significant change in Fos expression.

d21), Fos in the ARC returned to NP-d21 levels. Alternatively, the ARC may have responded to the early energy deprivation associated with reduced food intake. Fos protein expression was increased by 96% in the DMH, a brain site previously shown to exhibit cholecystokinin (CCK)-1 receptors, thus being a target for the satiety signal CCK (17). Rats with DMH lesions increased their food intake even more than sham-operated controls in response to food deprivation, thus suggesting that the DMH might be involved in limiting food intake (18); this observation is consistent with our findings. DMH is also associated with protein intake. Fos protein expression was increased in the ACC, which is thought to participate in the central control of food intake (19). Indeed, because the ACC integrates various types of information (cognitive, emotional, energy balance) it is thought to be a site of complex control of ingestive behavior and to be associated with various reinforcers. Interestingly, most of the short-term changes were counterbalanced by long-term habituation processes, reducing the overall differences between the NP and HP diets in the long term. Whether changes observed in the transition period can be attributed solely to the change in dietary protein level remains unclear. It is indeed likely that the observed changes occurring during the transition period from NP to HP diets, which disappeared after habituation, were only partially induced by the increase in protein amount per se but were also due to the change in type of food and may have resulted from the decrease in food intake.

In contrast, after habituation to the HP diet (HP-d21 vs. NP-d21), significant changes in Fos expression consisted in an upregulation in the NTS and a downregulation in the VMH and the ACO. The NTS is the only brain area showing a late and marked upregulation in Fos expression in rats habituated to the HP diet. This is the first report showing activation of the NTS by increased protein intake in freely fed rats. The NTS is a part of the dorsal vagal complex, located in the medulla oblongata; it is the principal recipient of first-order visceral and gustatory afferent information conveyed by the vagus nerve. Information originating from the entire digestive tract (from the mouth to the rectum) is sent to the NTS, which has already been shown to be involved in regulation of food intake-related events such as glucose, lipid, and amino acid ingestion, and the production of satiating effects (20). Its projections to the hypothalamus and the amygdala and its innervation descending from these areas make the NTS a strategically important area in the central control of food

TABLE 2

Quantification of Fos expression in different CNS regions of rats switched from NP to HP diets¹

	NP-d21	HP-d2	HP-d21
NTS	53.8 $\pm$ 9.2 ^a	49.8 $\pm$ 11.0 ^a	122.3 $\pm$ 12.5 ^b
APC	240.5 $\pm$ 45.0	202.3 $\pm$ 24.4	159.5 $\pm$ 38.9
ARC	109.9 $\pm$ 31.9 ^b	53.8 $\pm$ 7.0 ^a	90.8 $\pm$ 9.9 ^b
PVN	110.1 $\pm$ 20.3	109.9 $\pm$ 21.1	88.2 $\pm$ 11.8
LH	234.7 $\pm$ 31.7 ^{ab}	325.7 $\pm$ 59.4 ^b	173.3 $\pm$ 24.8 ^a
VMH	151.0 $\pm$ 20.4 ^b	131.6 $\pm$ 24.0 ^{ab}	92.9 $\pm$ 10.7 ^a
DMH	382.2 $\pm$ 55.6 ^a	708.9 $\pm$ 97.8 ^b	404.4 $\pm$ 53.3 ^a
ACO	441.5 $\pm$ 56.3 ^b	339.3 $\pm$ 45.9 ^{ab}	265.2 $\pm$ 32.6 ^a
ACN	53.1 $\pm$ 11.0 ^{ab}	76.1 $\pm$ 12.6 ^b	44.0 $\pm$ 8.0 ^a
ACC	55.1 $\pm$ 11.9 ^a	88.9 $\pm$ 5.9 ^b	42.0 $\pm$ 8.6 ^a

¹ Values are means $\pm$ SEM, $n = 6$ rats. For each area, values are the mean sum of immunoreactive nuclei counted from 5 slices/rat. Means in a row with superscripts without a common letter differ, $P < 0.05$.

intake. In the present study, we did not observe NTS activation during the transition period. This may have resulted from an initial descending inhibition of peripheral input that would be subsequently overridden by an increase in peripheral sensitivity. Several studies indeed reported the occurrence of such a descending inhibition originating either in the amygdala or in the hypothalamus (21–24). Aberrant or abnormal states, such as continuous consumption of a high-fat diet or pathophysiological states, modulate the vagal sensitivity to nutrients (25). These results show that the NTS and likely the vagus nerve are involved in processing the information received after consumption of high dietary protein. However, the precise contribution of the parasympathetic system to the detection of HP intake is not understood. Indeed, the initial translating mechanisms likely to occur within the small intestine have not yet been elucidated.

The other long-term modification observed after habituation to the HP diet was a downregulation of Fos expression in both the VMH and the ACO. Interestingly, the VMH establishes bidirectional projection with the NTS and is the recipient of inputs from the amygdala. The VMH is also thought to play a crucial role in the regulation of food intake because it is a target of many mediators of satiety such as GLP-1, leptin, insulin, dopamine, NPY, CCK, histamine, or interleukin β (11,25–27). VMH lesions induce obesity (28) but the reported decrease in VMH activity is not actually consistent with this hypothesis. The VMH also influences sympathetic nervous system outflow. Considering that the sympathetic nervous system plays a major role in the control of body metabolism and because the VMH regulates sympathetic outflow, some observed metabolic changes such as a decrease in body fat following HP diet intake could originate in the VMH (29). The amygdala has been studied as a major central region in terms of food intake monitoring; lesions of various components of this complex cause changes in feeding behavior (8,30). The amygdala was shown to establish direct reciprocal connections with the dorsal vagal complex, and especially with the NTS and hypothalamic regions (31). This area is thus likely to be able to receive direct information from changes in the protein content of the diet. Furthermore, it was also established that the amygdala is associated with motivation, sensation reinforcement, and reward networks because it is an important part of the limbic system and has a reciprocal connection with the ACC region. Changes in activity in the amygdala suggest a processing of HP-related information by the limbic system (32).

The present study supports the general hypothesis that central control of food intake in omnivores is associated with peripheral information. Protein ingestion- and metabolism-related information may play a major role in these pathways. Although HP diets provide a strong and reliable model for satiety induction, it is unclear whether the present findings can be integrated into a general model of satiety. The physiological mechanisms of HP diet-induced depression of food intake are unknown. Video-based behavioral pattern analysis performed in our laboratory showed that HP diet-induced food intake depression was due either to an enhancement of normal physiological satiety or to poor palatability rather than to the induction of a conditioned taste aversion (4). In addition, we were unable to increase HP diet intake by modifying several orosensory characteristics. For example, adding sucrose to a HP diet, modifying the protein source, or replacing carbohydrates by fat did not reverse food intake depression (33), suggesting thus that the observed changes resulted from the dietary protein content rather than from an alteration of the diet sensory profile. However, additional research using gavage

techniques or gastric catheters would allow the collection of useful data that bypassed the oral-sensorial route. Of the 3 macronutrients, protein is likely to play a major role in the emergence of satiety (4,5). Our study showed that the HP diet not only dramatically suppressed food intake in rats but also elicited changes in various CNS areas such as the NTS, the amygdala, and the VMH. Considering the functional characteristics of these areas the present results suggest the following: 1) the involvement of the vagus nerve in conveying the information relative to the quantity of ingested proteins from the site of detection to the CNS; 2) the implication of hypothalamic sites regulating food intake and a putative alteration of sympathetic nervous system activity; 3) the involvement of higher brain function such as memory processing by the limbic system or the food reward system. To refine our understanding of these mechanisms, studies will require determination of the neurochemical pathways involved in the regulation of HP diet ingestion and the actual mechanisms of detection of dietary protein.

LITERATURE CITED

- Bensaïd, A., Tomé, D., Gietzen, D., Even, P., Morens, C., Gausseres, N., & Fromentin, G. (2002) Protein is more potent than carbohydrate for reducing appetite in rats. *Physiol. Behav.* 75: 577–582.
- Trigazis, L., Ortmann, L., & Anderson, G. H. (1997) Effect of a cholecystokinin-A receptor blocker on protein-induced food intake suppression in rats. *Am. J. Physiol.* 272: R1826–R1833.
- Jean, C., Rome, S., Mathe, V., Huneau, J. F., Aitouri, N., Fromentin, G., Achagiotis, C. L., & Tomé, D. (2001) Metabolic evidence for adaptation to a high protein diet in rats. *J. Nutr.* 131: 91–96.
- Bensaïd, A., Tomé, D., L'Heureux-Bouron, D., Even, P., Gietzen, D., Morens, C., Gaudichon, C., Larue-Achagiotis, C., & Fromentin, G. (2003) A high-protein diet enhances satiety without conditioned taste aversion in the rat. *Physiol. Behav.* 78: 311–320.
- L'Heureux-Bouron, D., Tomé, D., Bensaïd, A., Morens, C., Lacroix, M., Huneau, J. F., & Fromentin, G. (2004) Preabsorptive factors are not the main determinants of intake depression induced by a high-protein diet in the rat. *Physiol. Behav.* 81: 499–504.
- Gietzen, D. W., & Magrum, L. J. (2001) Molecular mechanisms in the brain involved in the anorexia of branched-chain amino acid deficiency. *J. Nutr.* 131: 851S–855S.
- Ciszewski, P. K., Wirth, M. M., Shaw, T. J., Grace, M. K., & Levine, A. S. (2003) Peptides that regulate food intake: effect of peptide histidine isoleucine on consummatory behavior in rats. *Am. J. Physiol.* 284: R1445–R1453.
- Petrovich, G. D., Setlow, B., Holland, P. C., & Gallagher, M. (2002) Amygdalo-hypothalamic circuit allows learned cues to override satiety and promote eating. *J. Neurosci.* 22: 8748–8753.
- Zittel, T. T., Glatzle, J., Kreis, M. E., Starlinger, M., Eichner, M., Raybould, H. E., Becker, H. D., & Jehle, E. C. (1999) C-fos protein expression in the nucleus of the solitary tract correlates with cholecystokinin dose injected and food intake in rats. *Brain Res.* 846: 1–11.
- Zittel, T. T., De Giorgio, R., Sternini, C., & Raybould, H. E. (1994) Fos protein expression in the nucleus of the solitary tract in response to intestinal nutrients in awake rats. *Brain Res.* 663: 266–270.
- Berthoud, H. R. (2002) Multiple neural systems controlling food intake and body weight. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 26: 393–428.
- Rinaman, L., Baker, E. A., Hoffman, G. E., Stricker, E. M., & Verbalis, J. G. (1996) Medullary c-fos activation in rats after ingestion of a satiating meal. *Am. J. Physiol.* 275: R262–R268.
- Wang, L., Martinez, V., Barrachina, M. D., & Tache, Y. (1998) Fos expression in the brain induced by peripheral injection of CCK or leptin plus CCK in fasted lean mice. *Brain Res.* 791: 157–166.
- Spencer, C. M., & Hout, T. A. (2001) Dynamics of c-fos and ICER mRNA expression in rat forebrain following lithium chloride injection. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 93: 113–126.
- Sharp, F. R., Sagar, S. M., & Swanson, R. A. (1993) Metabolic mapping with cellular resolution: c-fos vs. 2-deoxyglucose. *Crit. Rev. Neurobiol.* 7: 205–228.
- Schwartz, M. W., Woods, S. C., Porte, D., Jr., Seeley, R. J., & Baskin, D. G. (2000) Central nervous system control of food intake. *Nature (Lond.)* 404: 661–671.
- Bi, S., Scott, K. A., Kopin, A. S., & Moran, T. H. (2004) Differential roles for cholecystokinin-A receptors in energy balance in rats and mice. *Endocrinology* 145: 3873–3880.
- Bellinger, L. L., Mendel, V. E., Bernardis, L. L., & Castonguay, T. W. (1986) Meal patterns of rats with dorsomedial hypothalamic nuclei lesions or sham operations. *Physiol. Behav.* 36: 689–698.
- Kelley, A. E. (2004) Ventral striatal control of appetitive motivation: role

- in ingestive behavior and reward-related learning. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 27: 765–776.
20. Glatzle, J., Kreis, M. E., Kawano, K., Raybould, H. E. & Zittel, T. T. (2001) Postprandial neuronal activation in the nucleus of the solitary tract is partly mediated by CCK-A receptors. *Am. J. Physiol.* 281: R222–R229.
 21. Li, C. S., Cho, Y. K. & Smith, D. V. Taste responses of neurons in the hamster solitary nucleus are modulated by the central nucleus of the amygdala. *J. Neurophysiol.* 88:2979–2992, 2002.
 22. Smith, D. V. & Li, C. S. (2000) GABA-mediated corticofugal inhibition of taste-responsive neurons in the nucleus of the solitary tract. *Brain Res.* 858: 408–415.
 23. Cho, Y. K., Li, C. S. & Smith, D. V. (2002) Taste responses of neurons of the hamster solitary nucleus are enhanced by lateral hypothalamic stimulation. *J. Neurophysiol.* 87: 1981–1992.
 24. Schwartz, G. J. & Moran, T. H. (2002) Leptin and neuropeptide γ have opposing modulatory effects on nucleus of the solitary tract neurophysiological responses to gastric loads: Implications for the control of food intake. *Endocrinology* 143: 3779–3784.
 25. Covasa, M., Grahm, J. & Ritter, R. C. (2000) High fat maintenance diet attenuates hindbrain neuronal response to CCK. *Regul. Pept.* 86: 83–88.
 26. Bray, G. A. & York, D. A. (1996) The MONA USA hypothesis in the time of leptin. *Recent Prog. Horm. Res.* 53: 95–117.
 27. Meguid, M. M., Yang, Z. J. & Gleason, J. R. (1996) The gut-brain brain-gut axis in anorexia: toward an understanding of food intake regulation. *Nutrition* 12: S57–S62.
 28. Thornton, S. N., Nicolaidis, S., Liarue-Achagiotis, C. & Campfield, A. (1991) Body weight gain after VMH lesions in adult female rats guanethidine-sympathectomized at birth. *Appetite* 17: 47–53.
 29. Fagius, J. (2003) Sympathetic nerve activity in metabolic control—some basic concepts. *Acta Physiol. Scand.* 177: 337–343.
 30. Holland, P. C., Petrovich, G. D. & Gallagher, M. (2002) The effects of amygdala lesions on conditioned stimulus-potentiated eating in rats. *Physiol. Behav.* 76: 117–129.
 31. Giraudo, S. Q., Kotz, C. M., Billington, C. J. & Levine, A. S. (1998) Association between the amygdala and nucleus of the solitary tract in mu-opioid induced feeding in the rat. *Brain Res.* 802: 184–188.
 32. Ahn, S. & Phillips, A. G. (2003) Independent modulation of basal and feeding-evoked dopamine efflux in the ACC and medial prefrontal cortex by the central and basolateral amygdalar nuclei in the rat. *Neuroscience* 116: 295–305.
 33. Marsset-Baglieri, A., Fromentin, G., Tomé, D., Bensaid, A., Makkarios, L. & Even, P. C. (2004) Increasing the protein content in a carbohydrate-free diet enhances fat loss during 35% but not 75% energy restriction in rats. *J. Nutr.* 134: 2646–2652.
 34. Reeves, P. G., Nielsen, F. H. & Fahey, G. C., Jr. (1993) AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J. Nutr.* 123: 1939–1951.

Étude 6: Participation du nerf vague à la satiété induite par les protéines alimentaires

L'étude présentée précédemment suggère que le nerf vague est impliqué dans l'hypophagie induite par les protéines alimentaires. Reste alors à savoir quelle est l'implication précise de la sensibilité vagale dans les modifications du comportement alimentaire induits par les protéines. Cette question est l'objet de l'étude présentée maintenant.

Nous avons fait l'hypothèse que le nerf vague, et plus précisément les afférences chémosensibles du nerf vague participaient à l'effet des protéines sur le comportement alimentaire.

Introduction

Bien que notre compréhension des mécanismes précis de la détection des nutriments dans l'intestin avance nettement, certaines questions essentielles restent aujourd'hui encore sans réponse. Par exemple, les modalités d'action des protéines alimentaires sur le système nerveux central, responsable de la coordination des cinétiques digestives et du contrôle de la prise alimentaire sont largement méconnues.

Comme nous l'avons en effet décrit plus haut, il semble que l'absorption des protéines au niveau de l'intestin proximal génère des signaux physiologiques dont les principales conséquences sont les modifications des cinétiques digestives et l'arrêt du repas. Plus précisément, ce serait l'activité du principal transporteur d'oligopeptides, PEPT1, qui déclencherait une cascade de réactions conduisant à la libération de cholécystokinine (CCK) dans le milieu interstitiel (15; 31). Cependant le devenir de la CCK, et plus précisément les modalités par lesquels elle influence la mécanique gastrique et le comportement ingestif sont encore méconnus.

S'il semble que les phénomènes de détection des protéines au niveau de la muqueuse intestinale sont partiellement connus, il apparaît en revanche que les modalités d'action, autrement dit les voies par lesquelles l'information générée dans le tube digestif parvient au cerveau, sont encore largement ignorées.

On sait que les terminaisons des afférences vagales sont sensibles à la libération de CCK (73), toutefois certains travaux suggèrent que la CCK plasmatique peut aussi agir directement sur le système nerveux central. Déterminer laquelle des voies: humorale ou nerveuse est principalement responsable de l'effet des protéines sur la mécanique digestive et le comportement alimentaire est nécessaire à notre compréhension globale de l'effet de ce type de macronutriment et ses implications dans le comportement alimentaire.

Objet de l'étude

L'objet de cette étude était donc de déterminer laquelle des voies de transmission de l'information depuis le tube digestif vers le système nerveux central était impliquée dans la détection périphérique des protéines alimentaires.

Méthodes

Principes

Dans le cas où la voie dite nerveuse serait impliquée, la transmission de cette information par cette voie reposerait sur les afférences vagales. Ces neurones afférents du nerf vague se divisent en deux catégories anatomiquement et fonctionnellement distinctes: il existe des fibres de petit diamètre dites fibres de type C qui sont amyéliniques et possèdent par conséquent une vitesse de conduction de l'ordre de 1,4 m/s, mais on trouve aussi des fibres dites de type A, myélinisées et présentant des

vitesses de conduction pouvant atteindre 14 m/s (72). Parmi les afférences vagales les fibres amyéliniques seraient responsables de la transmission des informations relatives à la détection chimique des nutriments (32; 72; 83; 86; 87; 91; 9). En somme dans le cas de la transmission de l'information relative à la présence de protéines dans l'intestin par voie nerveuse, le transfert de l'information serait vraisemblablement assuré par des afférences vagales de type C.

Les fibres de type C expriment des récepteurs spécifiques de la capsaïcine, (et sont par conséquent sensibles à la capsaïcine). Cette propriété physiologique ouvre des possibilités méthodologiques intéressantes. Un excès de capsaïcine conduit, en effet, à la destruction spécifique par excitotoxicité des neurones sensibles à la capsaïcine. Ce type de traitement permet donc de supprimer spécifiquement la sensibilité viscérale chimique. Cette opération est appelée déafférentation sélective.

C'est donc par le biais d'un traitement à la capsaïcine que nous avons testé si l'information relative à la présence de protéines dans l'intestin circulait vers le cerveau via les afférences chémosensibles vagales donc via la voie nerveuse

Animaux

10 rats mâle (Sprague Dawley (Harlan)) pesant $261\text{g} \pm 5\text{g}$ au début de l'expérience ont été utilisés pour cette étude. Les rats étaient hébergés dans des cages individuelles dans une pièce à température contrôlée. Les rats étaient soumis à un

cycle nycthémeral 12h « jour » / 12h « nuit », avec début du « jour » à 9:00. Les rats avaient librement accès à l'eau.

Traitement à la capsaïcine

5 rats ont été traités avec des injections successives de doses croissantes de capsaïcine (90% grade, Sigma Chemical, St Louis, MO) en vue de leur déafferentiation spécifique par excitotoxicité (annexe 4). La solution de capsaïcine a été obtenue en dissolvant la poudre de capsaïcine dans une solution véhicule à base de Tween 80 (10%), de DMSO (10%) dans une solution de NaCl 0.9% (80%). Une série de 3 injections sous-cutanées (sous la peau du cou) ont été réalisées sur une période de 24h. Les rats ainsi traités ont reçu une première dose de capsaïcine (25 mg/kg) puis deux autres doses de solution de capsaïcine (50 mg/kg) ; toutes les injections étant espacées de 12h et réalisées sous anesthésie par inhalation de halothane. 10 min avant chaque anesthésie les rats recevaient une injection de sulfate d'atropine (15mg/ml, 0.2 ml, IP). A la suite des injections, les rats ont montré une vasodilatation cutanée témoin du succès du traitement (64). 5 autres rats (groupe témoin) ont subi un traitement similaire, à l'exception notable que la solution injectée ne contenait pas de capsaïcine.

Depuis leur arrivée et jusqu'à sept jours après le traitement à la capsaïcine les rats étaient nourris avec des granulées standard. A partir du huitième jour suivant le traitement les rats ont été nourris pendant 4 jours avec un régime normo-protéique

(NP), semi liquide dans le but d'habituer les rats au type d'aliment (texture nouvelle), puis les rats ont été soumis à un régime semi-liquide hyper-protéique (HP). La composition des aliments est donnée en table 1. Dans le but de minimiser le gaspillage, les régimes NP et HP étaient mélangés à de l'eau pour former une pâte, donc moins à même d'être éparpillée, (rapport poudre / eau 1:1 et 1:1.5, respectivement). La prise alimentaire était enregistrée chaque jour en calculant la différence entre les poids des gamelles en début et en fin de période d'alimentation. Les rats avaient accès à leur gamelle pendant 8 heures en début de cycle nocturne. La prise alimentaire et le poids corporel étaient mesurés quotidiennement.

Ingrédients	Quantité (g/kg)	
	Normo-Protéique (NP)	Hyper-protéique (HP)
Protéines	140	500
Amidon de maïs	622.4	312.7
Saccharose	103	50
Huile de soja	40	40
Vitamin mixture AIN-93M	35	35
Salt mixture AIN-93M	10	10
Cellulose	50	50
Typo-choline	2.3	2.3
Energie Métabolisable (kJ/g)	14.89	15.77

Table 4: Composition des régimes expérimentaux (poudres)

Traitement statistique.

Les résultats sont exprimés sous forme de moyennes $\pm$ SEM. L'existence de différences entre les paramètres des groupes a été vérifiée par un test de student. (poids initiaux et poids finaux) ou ANOVA pour mesures répétées (prise alimentaire) à l'aide du logiciel SAS (Version 6.11). Un test post hoc de Tuckey était utilisé quand le test ANOVA révélait une différence entre les moyennes. Les différences étaient considérées comme significatives pour $P < 0.05$.

Résultats

Suivi des traitements

Les rats ont récupéré rapidement des différents traitements et ont recommencé à prendre du poids. Au début du régime hyper-protéique nous n'avons pas constaté de différence significative ($p > 0.7$) entre les groupes expérimentaux.

Prise alimentaire

La prise alimentaire cumulée pendant la durée de l'expérience est présentée en figure 33. Il apparaît que le traitement à la capsaïcine n'a pas induit de changement

significatif dans la consommation du régime HP. Bien que nous ayons enregistré une augmentation totale de 5.9 %, cette augmentation n'a pas été significative. Néanmoins, nous avons observé une tendance des animaux ayant subi une déafférentation sélective à manger plus du régime HP que les animaux n'ayant subi qu'un traitement avec le véhicule (témoins).

Prise de poids

En revanche, nous avons observé au cours de cette expérience un gain de poids significativement plus élevé chez les rats préalablement traités à la capsaïcine par rapport aux rats traités avec le véhicule ($p=0.04$). Le gain de poids total au cours de l'expérience est présenté en figure 34. Le gain poids total des rats traités ayant subi une déafférentation sélective était supérieur de 29% au poids des rats témoins.

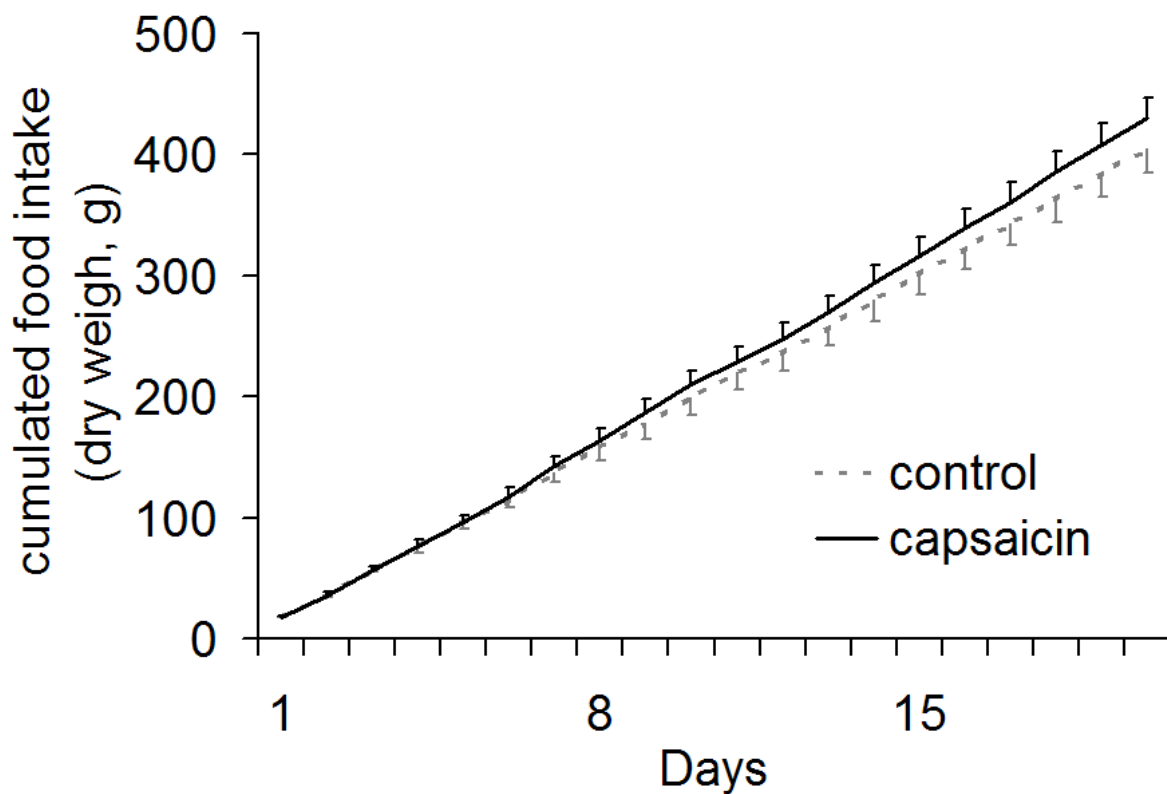


Figure 33: Une déafférentation ne modifie pas la consommation d'un régime hyper-protéique.

Prise alimentaire cumulée d'un régime hyper-protéique chez des rats traités à la capsaïcine (déafférentation sélective) ou témoins. Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne quotidienne $\pm$ SEM.

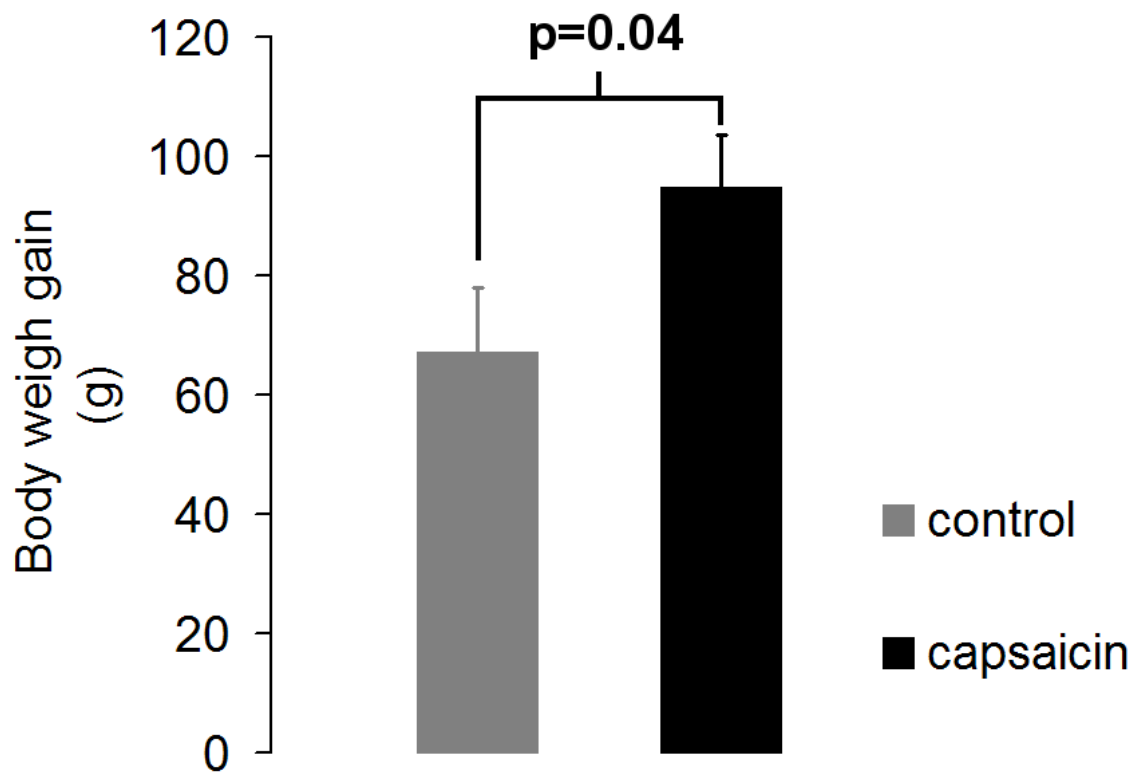


Figure 34: Une déafférentation augmente le gain de poids chez des rats soumis à un régime HP.

Gain de poids total, sur 21 jours, pour des rats soumis à un régime hyper-protéique. Les résultats sont exprimés sous forme de moyennes $\pm$ SEM.

Discussion

Nous avons montré dans cette étude qu'une déafférentation sélective n'a pas d'effet significatif sur la prise alimentaire d'un régime HP tandis qu'elle semble avoir un effet positif sur le gain de poids en condition de régime HP par rapport à des rats soumis aux mêmes conditions expérimentales. Si le gain de poids est le seul paramètre à différer significativement pour les rats ayant subi une déafférentation sélective par rapport aux rats témoins nous n'avons pas enregistré pour la prise alimentaire de différence (+6%, ns respectivement). Il est toutefois légitime d'émettre l'hypothèse que les changements observés du gain de poids sont le résultat des variations esquissés mais non significatives de la prise alimentaire.

Le nerf vague, et précisément les fibres afférentes amyéliniques de type C, a été proposé comme un élément clé dans l'intéroception chimique intestinale (71). D'après cette étude il apparaît clairement qu'un traitement à la capsaïcine n'a pas modifié la quantité de la prise alimentaire. Nous observons que la présence des voies de l'intéroception chimique intestinale vago-dépendantes (afférences vagales de type C) n'est pas nécessaires pour observer les effets des protéines sur le comportement alimentaire. Ce travail constitue la seconde étude présentée par notre laboratoire reportant l'absence d'effet d'une suppression de la voie nerveuse de transmission des informations intestinales depuis l'intestin vers le système nerveux central dans l'hypophagie impliquée par un régime HP (61).

Compte tenu de l'effet des protéines sur l'activité spontanée du nerf vague et ses effets sur l'activation du Noyau du Tractus Solitaire (15; 97; 75), il est toutefois très improbable que le nerf vague ne contribue pas à l'hypophagie induite par un régime HP. Néanmoins l'intéroception chimique intestinale pourrait ne pas être la seule voie par laquelle les protéines peuvent agir sur la prise alimentaire. En effet d'autres mécanismes comme l'action directe de la CCK sur le système nerveux central (20; 73) ou l'implication de systèmes anorexigènes postprandiaux (104) peuvent aussi contribuer à l'hypophagie induite par les protéines. Ces autres voies de communication entre cerveau et périphérie pourraient palier à l'absence d'une modalité de transfert de l'information, en l'occurrence la voie nerveuse. Ces mécanismes de "rattrapage" suite à la perte du nerf vague ont été déjà observés dans des cas de vagotomie (18) ou dans des cas de traitement avec la capsaïcine (107). Ces effets peuvent alors expliquer pourquoi aucun ou très peu d'effet sur la prise alimentaire et sur le poids corporel ont été observés lors de cette étude.

Une seconde hypothèse avancée pour expliquer le peu d'effet observé est que les paramètres dépendants de l'action du nerf vague sont principalement des paramètres internes au repas, à savoir sa taille, sa durée, la durée d'ingestion ou le déclenchement de la fin du repas (75) l'information transmise par le nerf vague n'influence pas ou très peu les phénomènes de satiété à long terme. En somme, il est improbable que le nerf vague induise, à lui seul, une hypophagie prolongée. Mais le nerf vague, en condition physiologique, participe bien à l'établissement d'une dépression prolongée de la prise alimentaire.

En conclusion cette étude montre que la présence des fibres afférentes du nerf vague sensibles à la capsaïcine n'est pas nécessaire dans l'établissement d'une hypophagie induite par les protéines. Nous faisons l'hypothèse que la contribution vagale à ces phénomènes consiste principalement en un contrôle des paramètres internes au repas et que, par conséquent, la suppression des afférences vagales n'affecte que très peu le contrôle du comportement alimentaire qui dépend de systèmes de contrôle à plus long terme. De nouveaux travaux seront nécessaires pour comprendre l'influence d'un tel traitement sur la structure des repas et plus généralement l'influence des protéines sur le contrôle immédiat de la prise alimentaire.

Conclusion générale

L'objectif premier fixé de ce travail était d'étudier les mécanismes de l'intéroception intestinale durant la digestion, l'implication du nerf vague dans ce phénomène et les conséquences de cette modalité sensorielle sur le comportement alimentaire.

Une conception communément admise du comportement alimentaire présente ce phénomène comme étroitement contrôlé par un réseau nerveux complexe situé dans le système nerveux central. Dans ce modèle, des informations d'origines diverses comme des signaux provenant des réserves en énergie ou des facteurs émotionnels convergent vers les systèmes centraux intégrateurs capables de générer des réponses comportementales.

Parmi ces informations qui convergent vers le système nerveux central, la sensibilité viscérale ou intéroception semble jouer un rôle de premier plan. Il s'agit ici des messages sensoriels inconscients qui parviennent au cerveau et qui transmettent des informations relatives à l'état mécanique des viscères, à la présence de composés chimiques notables dans le contenu digestif, tels que les macronutriments. Dans le cas du comportement alimentaire, deux paramètres sont principalement sous surveillance et ceci pendant la digestion. Il s'agit de l'état mécanique du tube digestif et de la présence de certains macronutriments dans l'intestin. Le nerf vague transmet les informations intéroceptives depuis le tube digestif jusqu'au cerveau.

Nous avons postulé que l'intéroception vago-médiée, et plus précisément sa composante intestinale (autrement dit la détection des nutriments dans l'intestin au cours de la digestion) pouvait influencer le comportement alimentaire, et c'est dans ce contexte théorique que nous avons choisi de travailler. Nous nous sommes concentrés sur trois aspects fondamentaux de la question de l'intéroception vago-médiée et de son implication dans le contrôle du comportement alimentaire.

La première question que nous avons formulée a concerné la nature des mécanismes cellulaires et moléculaires mis en œuvre dans la détection intestinale des nutriments au cours de la digestion. Il s'agissait autrement dit de comprendre comment la simple présence de certaines espèces de macronutriments dans l'intestin était transduite en un signal physiologique ayant une signification pour l'organisme et plus particulièrement le système nerveux en charge du contrôle du comportement alimentaire.

Une fois les mécanismes de la détection des nutriments dans l'intestin précisés, nous avons tenté d'apporter des éléments de réponse quant à la participation de ces phénomènes intéroceptifs dans le contrôle de la prise alimentaire. Autrement dit, nous avons voulu préciser dans quelle mesure la sensibilité viscérale impliquait des modifications du comportement alimentaire.

Enfin il nous a semblé important d'étudier comment ces messages pour la plupart supposés posséder un puissant effet anorexigène pouvaient être sujet à des

changements en conditions physiologiques, dans le cas de stimulations prolongées par exemple.

Vers une physiologie intégrative

Nous avons tenté d'apporter des éléments de réponse à ces trois questions en ciblant pour chacune d'elle les techniques et les démarches expérimentales appropriées. Soucieux de produire des connaissances en physiologie, et plus précisément d'inscrire notre travail dans le domaine de la physiologie intégrative (33) , nous avons produit un réel effort pour placer notre point de vue sur la question de la détection des nutriments dans l'intestin et son implication dans le contrôle du comportement alimentaire à différents niveaux, depuis les mécanismes cellulaires transmembranaires dans les cellules entéroendocrines jusqu'aux réponses comportementales.

Ainsi, pour étudier les mécanismes cellulaires de la détection des nutriments dans l'intestin nous avons utilisé principalement des techniques de mesure de l'activité électrophysiologique, comme le patch clamp ou l'enregistrement de l'activité spontanée de fibres nerveuses. Ces techniques sont des moyens d'investigation au niveau cellulaire, dans des préparations isolées (activité spontanée du nerf vague) ou sur des cellules en culture (patch clamp).

Pour étudier des phénomènes comportementaux, nous avons mesuré en revanche des paramètres tels que l'activation de régions du système nerveux central, le poids corporel ou la prise alimentaire. Ces techniques d'investigation ne concernent alors plus le niveau cellulaire, mais l'organisme, et les réponses comportementales.

En conséquence, ces démarches expérimentales ont apporté à la connaissance générale sur ce sujet, des éléments de réponse tant au niveau des mécanismes cellulaires qu'au niveau des modifications du comportement.

Nos résultats et les modèles que nous proposons

Les résultats des travaux d'électrophysiologie (études 1, 2, 3 et 4) réalisés sur des cultures de cellules entéroendocrine et à partir d'une préparation de duodénum isolé ont soutenu l'idée d'un modèle de la détection de nutriments dans l'intestin proposée par le Dr Raybould, (figure 35). Selon ce modèle, à la manière des cellules du goût, certaines cellules situées dans la paroi intestinale détectent la présence spécifique de nutriments dans l'intestin (88) .

Dans ce modèle la détection des nutriments semble se faire grâce à des récepteurs membranaires, probablement des transporteurs ou des isoformes de ces transporteurs possédant une moindre capacité mais une affinité plus grande permettant de détecter la présence des macronutriments à des concentrations faibles. L'activation

de ces récepteurs à pour conséquence le déclenchement d'une cascade de signalisation intracellulaire aboutissant à la libération de neuromédiateurs dans l'espace interstitiel. A ce niveau, le nerf vague entretient un réseau dense de projections se rendant ainsi sensible à la libération de ces mêmes médiateurs. La détection chimique des nutriments au cours de la digestion apparaît donc comme un véritable sens chimique présentant à la fois de fortes analogies avec d'autres sens chimiques, (comme des mécanismes de transduction similaires) mais aussi des particularités (comme les voies nerveuses qu'elle emprunte, qui lui sont tout à fait spécifiques).

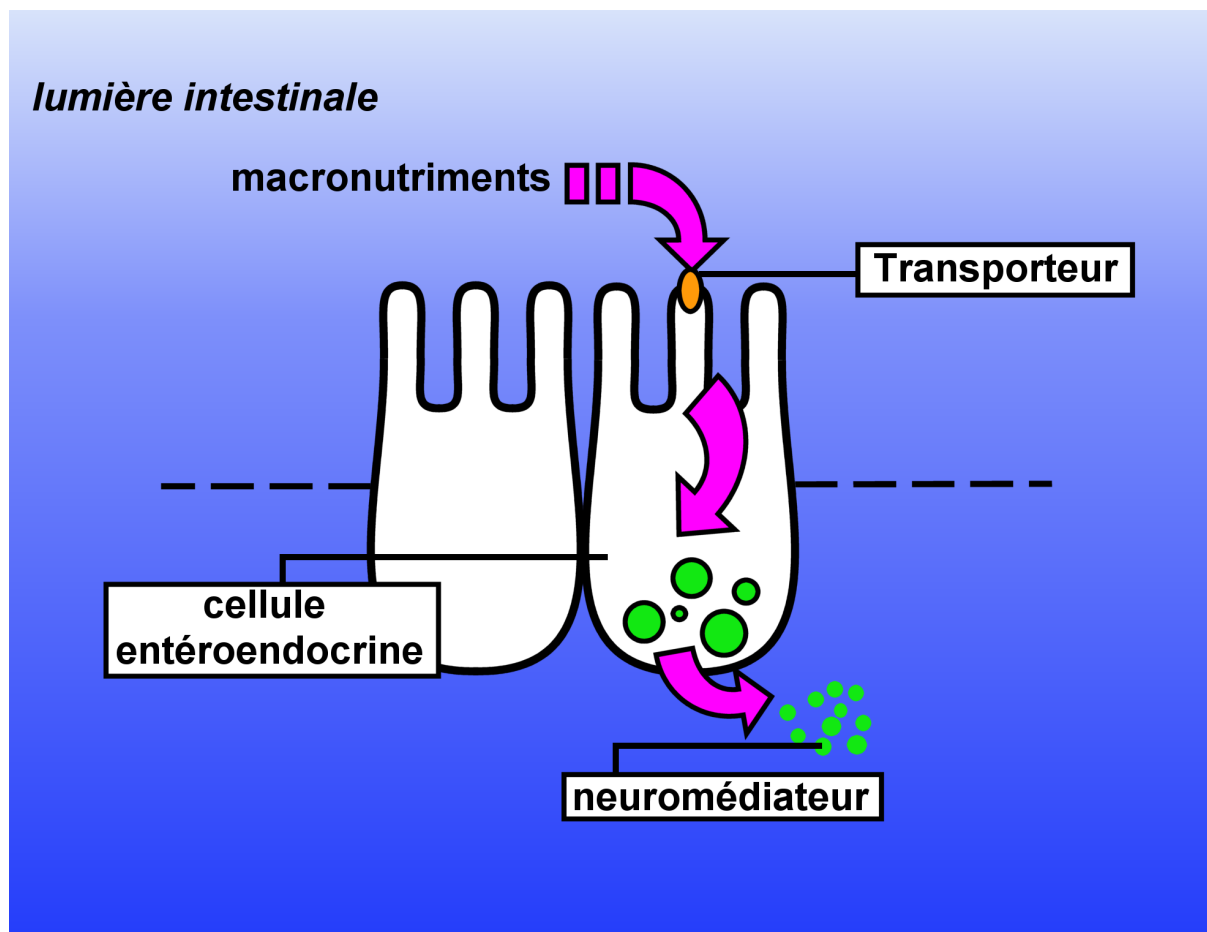


Figure 35: Hypothèse: mécanisme général de la détection des macronutriments au cours de la digestion

C'est l'activité de transporteurs, responsables en temps normal de l'absorption de macronutriments, mais cette fois localisés sur les cellules entéroendocrines elles-mêmes, qui déclenche la libération de médiateurs dans le milieu interstitiel.

Les résultats que nous avons présentés ici soutiennent largement cette vue:
Dans l'étude 1, nous avons montré que la détection du glucose se faisait à travers un transporteur membranaire « moins fonctionnel » d'un point de vue de sa capacité absorptive mais jouant un rôle crucial de détecteur de la présence du glucose.

Nous avons proposé dans l'étude 2 que l'activité de ce récepteur était associée à une cascade de signalisation intracellulaire ayant pour effet de libérer un neuromédiateur dans le milieu interstitiel.

Nous avons étudié en détail dans l'étude 3 cette voie de signalisation, cette fois dans le cas de la détection des acides gras à chaîne longue. Dans ce cas aussi, les mécanismes de la détection des nutriments et les mécanismes de l'absorption des nutriments semblent très proches.

Dans l'étude 4, nous avons montré que le modèle de la détection des nutriments par des cellules spécialisées à l'aide de transporteurs membranaires était aussi valable pour la détection des protéines.

S'il est admis que l'intéroception intestinale et notamment sa composante digestive chémosensible implique le nerf vague, le rôle de cette voie et son influence dans le contrôle du comportement alimentaire font encore débat. Nous avons montré dans les études 1 3 et 4 et dans l'étude 5 que le nerf vague était vraisemblablement

impliqué dans l'effet des protéines sur le comportement alimentaire. Dans les études 1, 3 et 4 nous avons directement enregistré l'activation des afférences vagales en réponse au passage de nutriments dans l'intestin (respectivement le glucose, les acides gras à chaîne longue et les oligopeptides), l'étude 5 témoigne aussi de l'implication du nerf vague dans ces phénomènes car le relais central de la sensibilité viscérale vagale (NTS) était activé en conditions de régime hyper-protéique. Nous avons aussi avancé l'idée que la sensibilité viscérale vago-dépendante n'était pas seule impliquée dans le contrôle du comportement alimentaire par le contenu digestif. L'étude 6 a confirmé cette idée selon laquelle d'autres mécanismes existent et que l'organisme pouvait même palier à la suppression de la sensibilité vagale.

Enfin, nous avons suggéré dans ces travaux (étude 5) la présence d'une modulation puissante de la sensibilité viscérale vagale. Nous avons en effet proposé que pour une même stimulation, le NTS, relais central des fibres vagales ne s'active pas de la même façon selon les conditions alimentaires. Les messages anorexigènes générés en périphérie et relayés vers le système nerveux central sont donc très probablement fortement sujets à des modulations dans le temps. Le nerf vague possède peut être grande plasticité et est loin d'être un simple câble passif entre les viscères et le cerveau.

Perspectives

La sensibilité viscérale ou intéroception, et notamment sa composante digestive, est une modalité sensorielle à part entière. Plus précisément, la détection chimique des nutriments au cours de la digestion apparaît comme un véritable sens chimique. Cette modalité sensorielle repose en grande partie sur les afférences vagues pour transmettre les signaux qu'elle génère vers le système nerveux central. Cette détection chimique des nutriments au cours de la digestion est un paramètre puissant dont l'influence dans le comportement alimentaire est forte. Elle joue principalement un rôle dans le rétrocontrôle de la prise alimentaire par l'ingesta au cours de la digestion. Ce rôle, joué dans le contrôle du comportement alimentaire, fait de la détection des nutriments dans l'intestin un paramètre clé dont une meilleure connaissance permettra sans aucun doute de développer des stratégies de lutte contre les troubles du comportement alimentaire tels que le surpoids et l'obésité.

Les recherches à venir devront certainement s'attacher à répondre à de nouvelles questions. Nous avons montré que des détecteurs spécifiques aux macronutriments étaient présents dans la paroi intestinale. Ceux-ci initient les phénomènes de transduction de l'information relative à la présence des macronutriments dans l'intestin. Toutefois si l'on suppose que les mécanismes cellulaires consécutifs à l'activation de ces récepteurs impliquent des seconds messagers intracellulaires, rien n'est connu à l'heure actuelle sur leur nature et leurs modalités d'action. Nous avons aussi montré que le nerf vague, support du transfert de

l'information intéroceptive vers le système nerveux central était un composant actif dans cette modalité sensorielle. Or les mécanismes cellulaires responsables de cette capacité que possède le nerf vague de moduler sa propre activité et sa propre sensibilité aux médiateurs anorexigènes sont largement inconnues.

A l'avenir, il semble que la compréhension de l'implication de la viscérosensibilité intestinale digestive requerra une connaissance précise des mécanismes cellulaires consécutifs à la détection des nutriments dans la lumière intestinale ainsi qu'une étude approfondie des mécanismes de la plasticité des afférences vagales.

Annexes

Annexe 1: Enregistrement de l'activité spontanée des afférences vagales à partir d'une préparation isolée de duodénum:

Cette technique a été développée par le Dr Wei à l'université de Californie à Los Angeles (1). Elle consiste à enregistrer l'activité spontanée des afférences vagales à partir d'une préparation isolée de duodénum (Figure A).

Déroulement de l'expérience:

- 1- Les rats sont décapités
- 2- La cage thoracique est ouverte
- 3- Un segment du tube digestif depuis l'œsophage jusqu'au duodénum est retiré et placé immédiatement dans du liquide physiologique oxygéné maintenu à 33°C.
- 4- Le nerf vague est isolé de l'estomac et de l'œsophage avant que ces derniers ne soient retirés de la préparation.
- 5- L'intestin reçoit deux canules permettant à l'entrée de perfuser des nutriments et à la sortie de drainer les solutions à tester et une canule intra-aortique donnant accès à la circulation sanguine. Le nerf vague est disséqué et placé sur le pôle d'une électrode de platine.
- 6- Un morceau de tissu conjonctif environnant est placé sur l'autre pôle de l'électrode et sert d'électrode de référence
- 7- Le bout de l'électrode est recouvert d'huile minérale, pour assurer une isolation entre les pôles de l'électrode.
- 8- Les potentiels d'actions ainsi enregistrés sont:

- Envoyés vers un amplificateur (modèle AM System 1700 différentiel AC Amplifier)
 - Affichés sur un oscilloscope (modèle 3012, Tektronix)
 - Enregistrés simultanément sur un ordinateur (PC) équipé du logiciel spike2 via un module de conversion A/D (Micro 1401 MK2, CED)
- 9- Les potentiels d'action pouvant provenir de plusieurs neurones, nous effectuons une discrimination des signaux basée sur certains paramètres morphologiques de la forme d'onde qu'ils génèrent.

Références bibliographiques

(1) Adelson DW, Wei JY and Kruger L. H₂O₂ sensitivity of afferent splanchnic C fiber units in vitro. *J Neurophysiol* 76: 371-380, 1996.

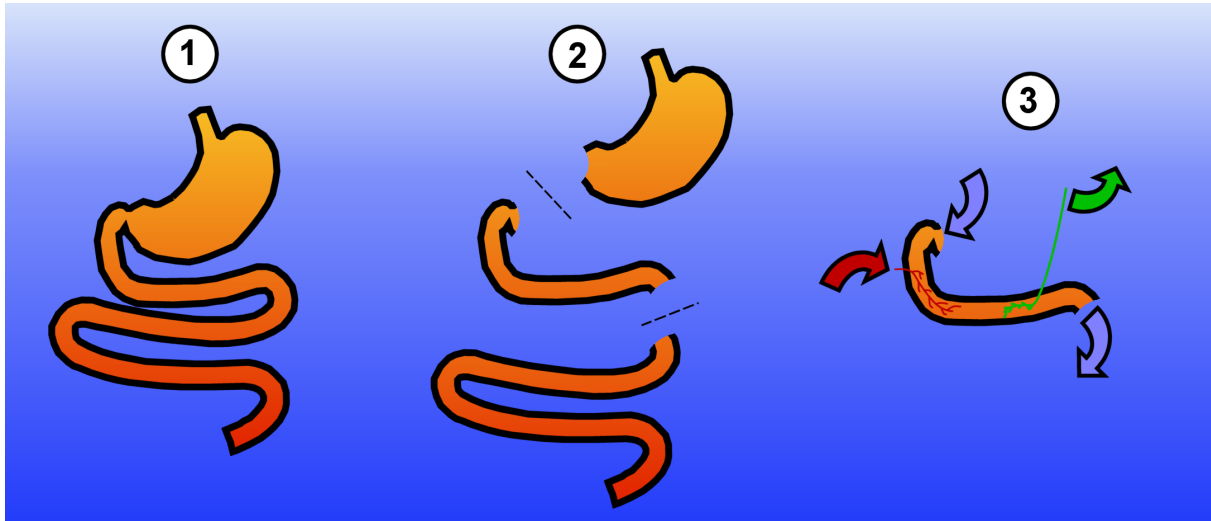


Figure A: Préparation électrophysiologique:

1, une section du tube digestif, allant de l'oesophage jusqu'au jéjunum est sortie de l'animal puis placée dans du liquide physiologique. 2, Après avoir identifié le nerf vague, seul le duodénum est conservé, 3 deux canules (flèches bleues) permettent d'injecter des solutions dans la lumière intestinale une canule intra-artérielle (flèche rouge) permet d'injecter des substances dans la circulation sanguine, enfin l'activité spontanée du nerf vague est enregistrée grâce à une électrode de platine (flèche verte).

Annexe 2: Le patch clamp

Le terme Patch-clamp est un terme anglais désignant une technique électrophysiologique d'enregistrement des courants ioniques transitant à travers les membranes cellulaires. Cette technique consiste à approcher une micropipette en verre (diamètre de contact de l'ordre de 1 μm) remplie d'une solution ionique de composition définie de la membrane d'une cellule vivante isolée. Elle fut découverte par Erwin Neher et Bert Sackmann (1) à Goettingue en 1978, ce qui leur valut le prix Nobel en 1991.

Il peut être utilisé sous deux modes principaux:

- * le Voltage-Clamp ou mesure de courant en potentiel imposé
- * le Current-Clamp ou mesure de potentiel en courant imposé

Plusieurs configurations de patch clamp existent:

Cellule entière, où l'activité macroscopique de l'ensemble des courants cellulaires est mesurée. "inside-out" (signifiant interne à l'extérieur), où le fragment de membrane accolé à la pipette de mesure possède sa face intracellulaire en contact avec l'extérieur de la pipette. "outside-out" (signifiant externe à l'extérieur), où le fragment de membrane accolé à la pipette de mesure possède sa face intracellulaire en contact avec l'intérieur de la pipette (figure B).

Dans l'étude 2 nous avons utilisé le mode « current clamp » en configuration cellule entière, Le courant imposé était de 0 ampères.

D'après Wikipedia

Références bibliographiques

(1) Neher E, Sakmann B and Steinbach JH. The extracellular patch clamp: a method for resolving currents through individual open channels in biological membranes. *Pflugers Arch* 375: 219-228, 1978.

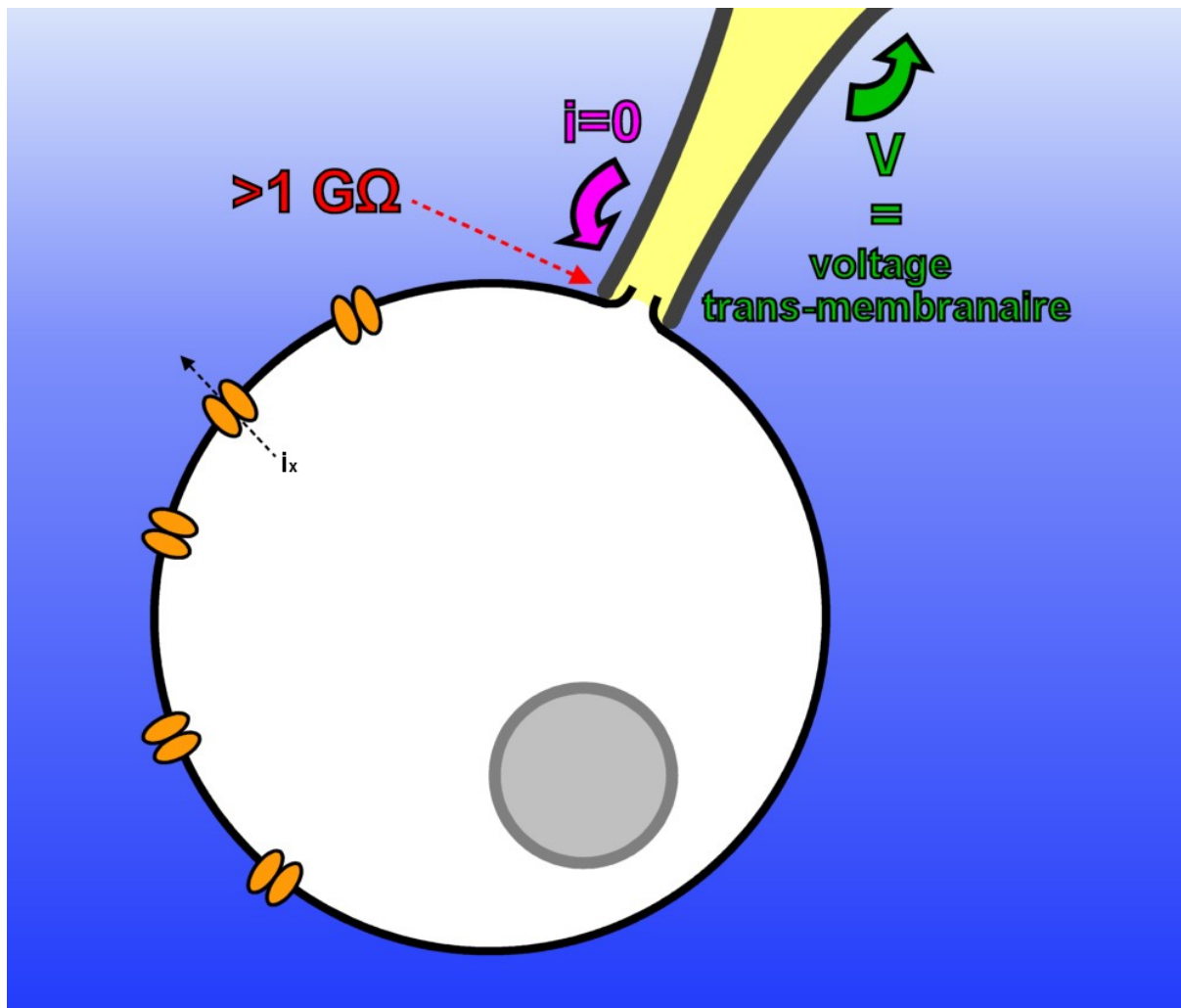


Figure B: Principe du patch clamp en mode « *current clamp* » et en configuration « *cellule entière* ».

Le courant à l'extrémité de l'électrode est maintenu nul. Le voltage est mesuré à la pointe de l'électrode. Le voltage mesuré correspond au voltage transmembranaire, il est fonction de la conductance ionique de l'intégralité de la membrane plasmique.

Annexe 3: Le c-fos, un marqueur de l'activation des neurones.

C-fos est un gène de la famille des gènes précoces ou IEG (*immediate early genes*). La protéine FOS codée par le gène c-fos a été identifiée d'abord dans le cadre de travaux en virologie, une altération de cette protéine est la cible d'un virus causant l'ostéosarcome (Le nom FOS signifie Feline Ostéoracome), en virologie le gène c-fos est classé comme proto-oncogène. Ces gènes sont présents dans de nombreux tissus mais sont présents très bas niveaux dans les tissus en conditions basales.

La protéine fos, produit du gène c-fos forme des complexes dimériques avec un autre IEG produit de c-jun qui en retour active un facteur de transcription inductible, P1, qui se lie à l'ADN pour contrôler spécifiquement l'expression de gènes.

Lorsque l'activité de la cellule augmente, les taux de Fos sont considérablement augmentés et se concentrent dans le noyau cellulaire, où ils permettent la transcription de l'ADN. Quantifier l'expression de c-fos est un bon moyen de déterminer de degré d'activation de cellules.

Les cellules du système nerveux central expriment c-fos (figure C) et la quantification de la protéine Fos comme marqueur de l'activité de c-fos est très répandue (1,2) (figure D). Dans les neurones l'expression de c-fos est maximale vers 90 minutes après la stimulation (figure E).

Références Bibliographiques

- (1) Chaudhuri A, Zangenehpour S, Rahbar-Dehgan F and Ye F.** Molecular maps of neural activity and quiescence. *Acta Neurobiol Exp (Wars)* 60: 403-410, 2000.
- (2) Sagar SM, Sharp FR and Curran T.** Expression of c-fos protein in brain: metabolic mapping at the cellular level. *Science* 240: 1328-1331, 1988.
- (3) Sutton GM, Duos B, Patterson LM and Berthoud HR.** Melanocortinergic modulation of cholecystokinin-induced suppression of feeding through extracellular signal-regulated kinase signaling in rat solitary nucleus. *Endocrinology* 146: 3739-3747, 2005.

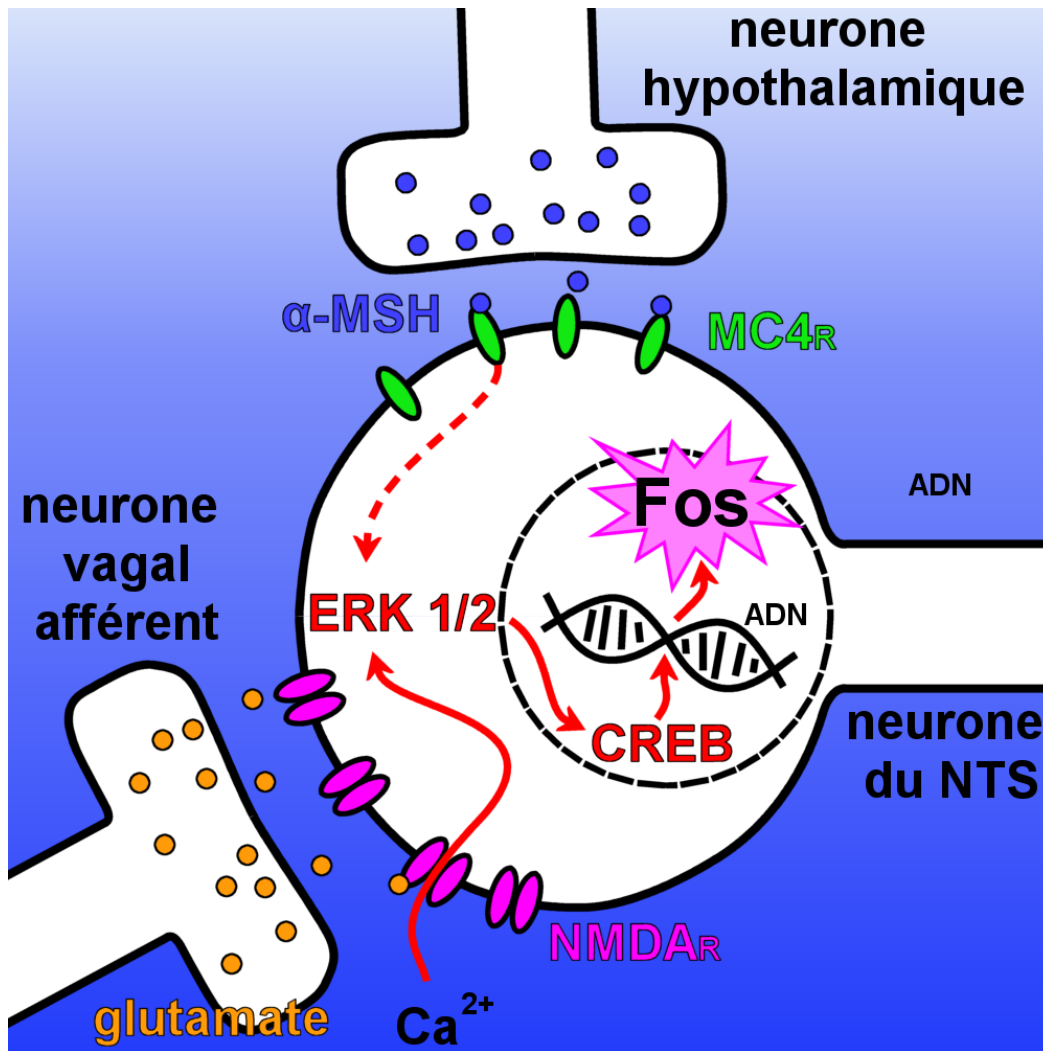


Figure C: exemple des mécanismes de l'induction du gène c-fos dans les neurones du NTS.

Les terminaisons en provenance du tube digestif (neurone afférent vagal) ou les terminaisons en provenance de l'hypothalamus peuvent activer l'expression de c-fos. ces deux voies nécessitent l'activation de la protéine kinase ERK1/2 qui va à son tour activer CREB pour qu'il déclenche la transcription de l'ADN et la production de Fos. (d'après (3)).

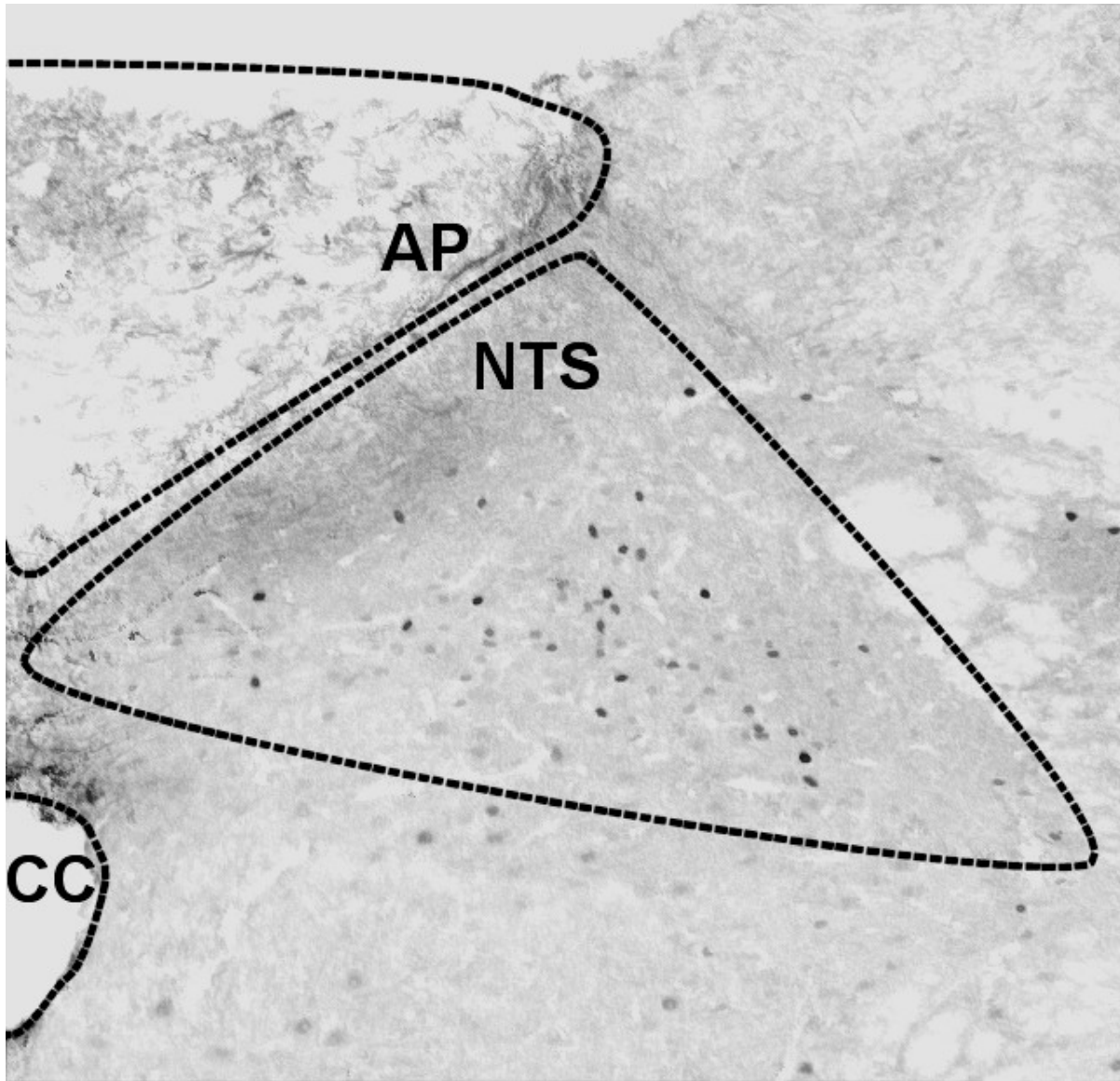


Figure D: exemple d'expression de c-fos dans le NTS.

AP, Area Postrema, CC canal central.

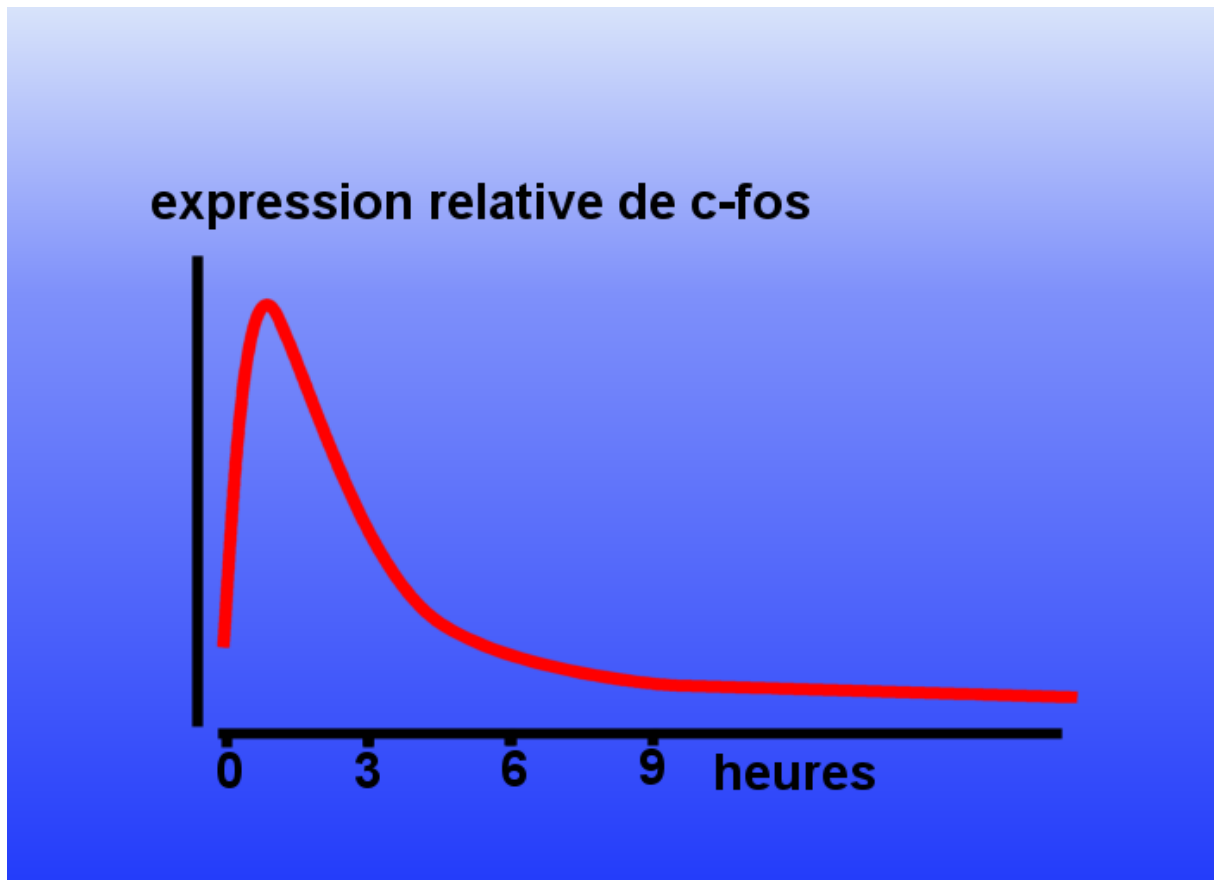


Figure E: expression relative de c-fos dans le temps.

Pour une stimulation à $t=0$

Annexe 4: Capsaïcine et excitotoxicité

La capsaïcine, 8-méthyl-N-vanillyle-6-nonénamide, est le composé actif dans le piment (1). La capsaïcine active une sous-classe de neurones, les fibres de type C, qui possède le récepteur VR-1. La capsaïcine déclenche l'ouverture des canaux VR-1 permettant l'entrée d'ions sodium et calcium dans la cellule (2) (figure F).

Appliquée à forte dose, la capsaïcine, déclenche une stimulation si intense que les neurones meurent (3).

Références bibliographiques

- (1) Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD and Julius D.** The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* 389: 816-824, 1997.
- (2) Szabo T, Biro T, Gonzalez AF, Palkovits M and Blumberg PM.** Pharmacological characterization of vanilloid receptor located in the brain. *Brain Res Mol Brain Res* 98: 51-57, 2002.
- (3) van de Wall EH, Pomp ER, Strubbe JH, Scheurink AJ and Koolhaas JM.** Deafferentation affects short-term but not long-term control of food intake. *Physiol Behav* 84: 659-667, 2005.

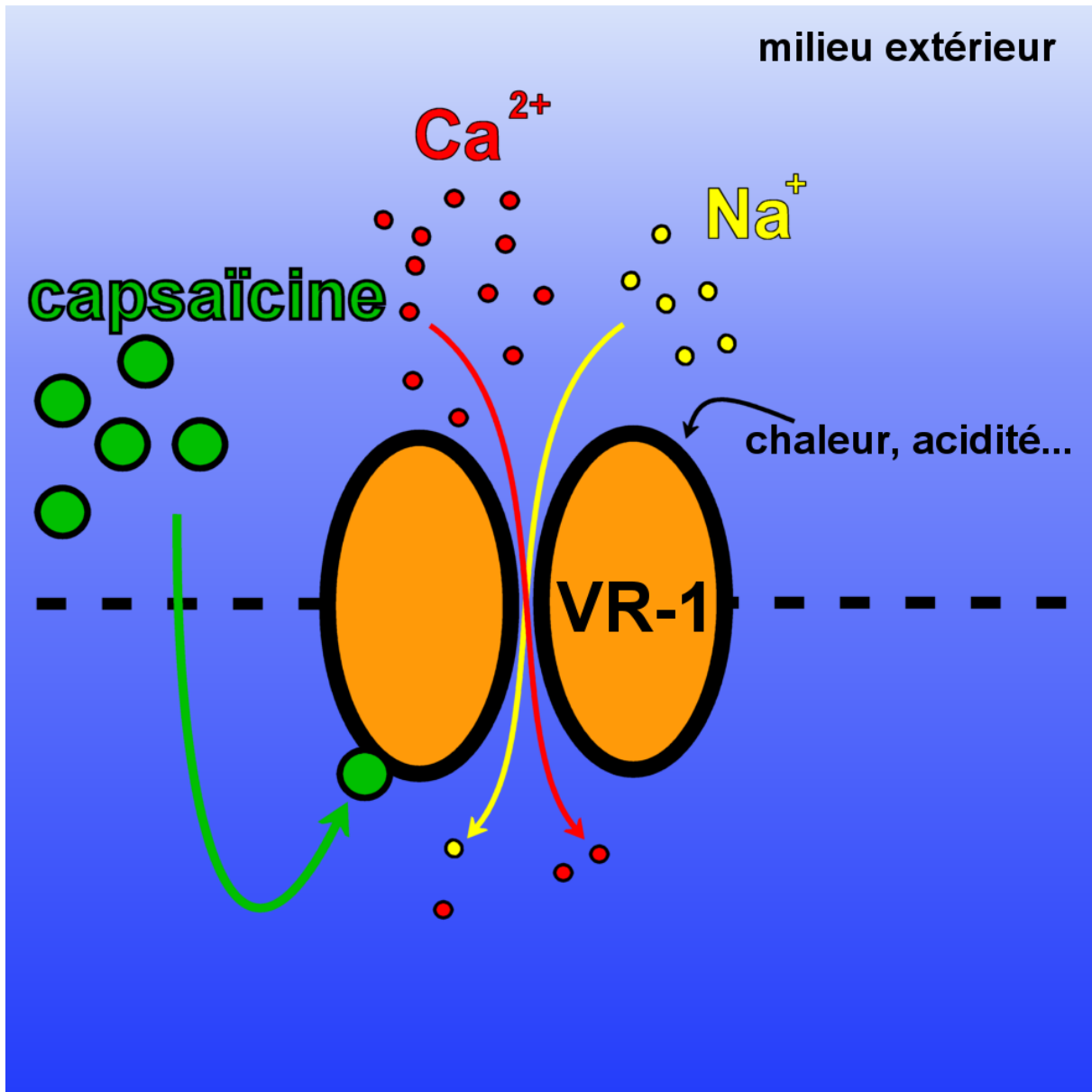


Figure F: le récepteur VR-1.

d'après (1)

Annexe 5: Publications et communications

Articles scientifiques

- Glatzle J, **Darcel N**, Rechs AJ, Kalogeris TJ, Tso P, Raybould HE. Apolipoprotein A-IV stimulates duodenal vagal afferent activity to inhibit gastric motility via a CCK1 pathway. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2004; 287(2): R354-9.

Darcel N, Fromentin G, Raybould HE, Gougis S, Gietzen DW and Tome D. Fos-positive neurons are increased in the nucleus of the solitary tract and decreased in the ventromedial hypothalamus and amygdala by a high-protein diet in rats. *J Nutr* 135: 1486-1490, 2005.

Darcel N, Liou AP, Tome D and Raybould HE. Activation of Vagal Afferents in the Rat Duodenum by Protein Digests Requires PepT1. *J Nutr* 135: 1491-1495, 2005.

Freeman, S.L., Bohan, D., **Darcel, N.** and Raybould, H.E. Glucose sensing in the intestinal lumen is dependent on a sodium glucose co-transporter. (soumis, *Am J Physiol GI*)

Communications orales

- **Darcel N.**, Fromentin G., Raybould HE., Gougis S., Gietzen DW., Rampin O., Tomé D. C-fos is up-regulated in the nucleus of the solitary tract and down-regulated in the ventro-medial hypothalamus and amygdala by a high protein diet in the rat. SSIB 2003, Groningen, Pays Bas.

- **Darcel N.**, Liou A.P., Tomé D., Raybould H.E., Proton-coupled oligopeptide transporter PEPT1 is required for duodenal vagal afferent activation by protein digest. Experimental Biology 2004, Washington, DC, Etats Unis.

- **Darcel N.**, Liou A.P., Tomé D., Raybould H.E. Implication du cotransporteur protons-oligopeptides PEPT1 dans l'activation des afférences vagues par les protéines. Journées Francophones de Nutrition, 2004, Lyon, France

- **Darcel N.**, Liou A.P., Tomé D., Raybould H.E., Proton-coupled oligopeptide transporter PEPT1 is required for duodenal vagal afferent activation by protein digest. European Winter Conference on Brain Research 2005, Les Arcs, France.

- **Darcel N.** Les Bases Neurophysiologiques du comportement alimentaire. Conférence organisée à la Maison de la Chimie par le groupe Oligosanté.

- **Darcel N.**, Paulino G., Milhas F., Gietzen D., Tomé D, Raybould H.E.,
Increased satiation induced by isocaloric, isonitrogenous, high fat diet in rats. SSIB
2005, Pittsburgh, PA, Etats Unis.

Posters

- **Darcel N.**, Fromentin G., Rampin O., Tomé D. Immunohistochemical identification of central nervous system areas involved in high-protein diets induced satiety. Experimental Biology 2003, San Diego, CA, Etats Unis.

- **Darcel N.**, Liou A.P., Tomé D., Raybould H.E., Proton-coupled oligopeptide transporter PEPT1 is required for duodenal vagal afferent activation by protein digest. Experimental Biology 2004, Washington, DC, Etats Unis.

- Liou AP., **Darcel N.**, Tomé D., Raybould HE. Vagally-mediated inhibition of gastric motility in response to protein digest is dependent on the oligopeptide transporter PepT1. Experimental Biology 2004, Washington, DC, Etats Unis.

- **Darcel N.**, Paulino G., Milhas F., Gietzen D., Tomé D, Raybould H.E., Increased satiation induced by isocaloric, isonitrogenous, high fat diet in rats. Experimental Biology 2005, San Diego, CA, Etats Unis.

Annexe 6: Publication additionnelle

L'article inclus ici reprend les résultats présentés dans l'étude 1.

GLUCOSE SENSING IN THE INTESTINAL LUMEN IS DEPENDENT ON A
SODIUM-GLUCOSE CO-TRANSPORTER

Freeman, S.L., Bohan, D., Darcel, N. and Raybould, H.E.

Department of Anatomy, Physiology and Cell Biology, UC Davis School of Veterinary
Medicine, University of California, Davis, CA 95616;

Running title: intestinal nutrient sensing and glucose

Address for correspondence:

Helen E. Raybould, PhD

School of Veterinary Medicine

Department of Anatomy, Physiology and Cell Biology

University of California Davis

1321 Haring Hall

Davis, CA 95616

Phone: 530-754-6555

Fax: 530-752-7690

email: heraybould@ucdavis.edu

Abstract

The presence of glucose in the intestinal lumen elicits a number of changes in gastrointestinal function including inhibition of gastric emptying and food intake, and stimulation of pancreatic and intestinal secretion. The aim of the present study was to test the hypothesis that a member of the SGLT family of transport proteins is involved in detection of luminal glucose in the intestine. Gastric emptying, measured in awake rats, was significantly inhibited by perfusion of the intestine with glucose (60 and 90 mgs); this effect was mimicked by α -methyl glucose (non-metabolizable substrate of SGLT-1 & 3), but not 2-deoxy-D-glucose (substrate for GLUT-2) or iso-osmotic mannitol. Gastric motility and intestinal fluid secretion, measured in anesthetized rats, were significantly inhibited and stimulated, respectively, by duodenal glucose, but not galactose, which has a fold lower affinity for SGLT-3 than glucose. Duodenal glucose but not galactose stimulated the release of 5-HT into mesenteric lymph and stimulated the discharge of duodenal vagal afferent fibers. mRNA for SGLT-3 was identified in the duodenal mucosa. Together these data suggest that detection of glucose in the intestine is dependent on SGLT-3, possibly expressed by enterochromaffin cells in the intestinal mucosa, and release of 5-HT.

Key words: gastric emptying; intestinal fluid secretion; sodium-glucose cotransporter; vagal afferents; serotonin; intestinal feedback.

Introduction

Ample evidence exists demonstrating the importance of the extrinsic sensory innervation in mediating inhibition of gastric emptying (7; 12; 23), gastric acid secretion (17), stimulation of pancreatic secretion (16) and inhibition of food intake (26; 28) in response to the presence of nutrients in the intestinal lumen. Ablation of small intestinal afferents using intraluminal perfusion of the sensory neurotoxin capsaicin, has demonstrated that afferent nerve terminals located in the wall of the gut mediate the majority of the response to macronutrients (30; 32). Different macronutrients can activate separate and distinct pathways via release of mediators, suggesting specific sensory transduction mechanisms exist in the gut wall. There is good evidence to suggest that 5-HT is involved in mediating inhibition of gastric motility and food intake, and stimulation of pancreatic secretion in response to intestinal perfusion with glucose via stimulation of 5-HT₃ receptors located on vagal afferent nerve terminals (15; 16; 22).

Glucose in the intestinal lumen results in the release of a number of peptides and neurotransmitters, including the incretin hormones, gastrointestinal inhibitory peptide (GIP) and the glucagon-like peptides, GLP-1, GLP-2 (4), and 5-HT (16; 18; 20). There is evidence that release of GIP and GLP-1 involves a mechanism similar to insulin release from the pancreas, via generation of ATP and opening of K_{ATP} channels in the membrane (25). However, a different mechanism for glucose-induced release of 5-HT from EC cells has been suggested. We have shown that in an enterochromaffin cell line, BON, release of 5-HT stimulated by glucose is mimicked by α -methyl glucose, a non-metabolizable analog of glucose and inhibited in the presence of the competitive blocker of SGLT, phloridzin (13). This suggests a mechanism involving transport of glucose via SGLT in glucose-mediated release of 5-HT in the gut. Further support of this hypothesis comes from observations that glucose-induced inhibition of gastric

motility in awake rats is attenuated by co-infusion of phloridzin, a competitive inhibitor of SGLT (24), suggesting that transport of glucose into enterocytes via SGLT-1 is important in the ability of the gut to detect the presence of luminal glucose and subsequent 5-HT-mediated activation of the vagal afferents.

Recently, evidence has been obtained to support the idea of a member of the SGLT family of transporter as a glucose sensor in smooth and skeletal muscle (3). Human SGLT-3 (hSGLT-3), which has 70% homology with hSGLT-1, is expressed in smooth and skeletal muscle, and possibly localized to neurons in the enteric nervous system. In hSGLT-3 transfected oocytes, glucose was not transported across the membrane but depolarized the membrane potential with a K_m of 20 mM; this depolarization was specific for D-glucose (galactose had no effect) and was blocked by phloridzin.

The specific aim of the present study was to determine the mechanism by which glucose is detected in the intestinal lumen, leading to release of 5-HT and activation of the vagal afferent pathway and alteration of intestinal function. Ingested carbohydrate is hydrolyzed within the lumen and the brush border of the intestine and is absorbed as monosaccharide. Glucose and galactose are absorbed via the sodium-coupled transporter SGLT-1 located on the apical surface of the enterocyte and extruded out of the basolateral membrane by facilitated diffusion via the carrier GLUT 2 (14). The sensory transduction mechanism may lie at or beyond the apical membrane and may reside within epithelial cells, possibly the EC cells. We test the hypothesis that an SGLT protein is involved in the sensory transduction for glucose, specifically involved in release of 5-HT from enterochromaffin cells in the intestinal mucosa. In order to test our hypothesis, we measured changes in gastric motor function, intestinal secretory function and

stimulation of vagal afferent fiber discharge in response to different analogues of glucose and to galactose. In addition, we measured release of 5-HT from the intestine in response to glucose and galactose by measuring concentration in mesenteric lymph harvested from awake rats. In order to determine whether SGLT-3 is expressed in the intestinal mucosa, we measured mRNA by real time quantitative PCR.

Methods

Animals: Experiments were performed in Sprague Dawley rats (Harlan, San Diego, CA) of initial weight 200-280 gms maintained on regular laboratory chow. Rats were fasted overnight but allowed water ad libitum prior to all surgical and experimental procedures. The institutional guidelines for the care and use of laboratory animals were followed throughout the study.

Measurement of gastric emptying

Surgical Procedures: The procedure to place gastric and duodenal cannulas has been described in detail elsewhere (12). Briefly, rats (n=6) were anesthetized with pentobarbital sodium (50 mg/kg ip; Nembutal, Abbott Laboratories, North Chicago, IL). A small stainless steel Thomas cannula was inserted into the forestomach, exteriorized through the abdominal wall and capped. The duodenal cannula (PE90, Intramedic; Clay Adams, Parsippany, NJ) was inserted into the duodenum 1-2 cm distal to the pylorus. Rats were allowed to recover for 2 weeks before being used in experiments and were used for a period of up to 3 months after surgery. In the period during which rats were recovering from surgery they were accustomed to light restraint in Bollman cages. The duodenal cannula was flushed daily with 0.9% saline and plugged with petroleum jelly.

On experimental days, fasted rats were placed in Bollman cages and the gastric cannula opened and any residual gastric contents flushed out with warm 0.9% saline. The stomach was then allowed to drain freely for 30-45 min. Three ml of 0.9% saline containing the non-absorbable marker phenol red (60 mg/l) was instilled into the stomach and the cannula closed. After 5 min, the contents of the stomach were collected, the volume measured and centrifuged. The concentration of phenol red was determined in the instilled and recovered fluid and the rate

of gastric emptying was calculated using the method of Hunt and Spurrell which calculates the volume emptied from the stomach including any gastric secretions. Data for gastric emptying are expressed as the % of the liquid emptied after 5 min as mean $\pm$ SEM.

Experimental Protocols: Gastric emptying was measured in two consecutive control periods with no perfusion of the duodenum with 10 min between procedures. Perfusion of the duodenum with glucose analogues or mannitol (330, 660 or 990 mM; total amounts 30, 60 or 90 mg) at a rate of 0.05 ml/min was started and continued for 10 min; gastric emptying measured in the 5-10 min period; in some experiments, gastric emptying was measured again at 20-25 min and 35-40 min after duodenal perfusion. Rats were randomized for treatment only one test perfusion was performed on each day and animals were used no more than every third day. Not all rats received each treatment since the full protocol could not be completed as one rat was euthanized because of a leaking gastric fistula.

Measurements of gastric motility in anesthetized rats

This method has been published previously (21). Briefly, rats (200-250 g) were anesthetized with urethane (1.25 g/kg i.p.; Sigma, St. Louis, MO), a catheter was placed into the trachea to ensure a clear airway (Polyethylene tubing, PE 240, 1.67 mm ID, 2.42 mm OD). The abdomen was opened, the pylorus was secured, gastric contents were gently flushed with warm saline 0.9% through an incision in the forestomach and a catheter (Silastic, 2 mm ID, 3.2 mm OD) was placed through the incision to measure intraluminal gastric pressure (IGP). After a recovery period of about 45-60 min, the stomach was filled with warm saline (0.9%, 1 ml) and kept under continuous pressure of 5-6 cm H₂O for 60 min to normalize baseline IGP. Catheters were placed in the jugular vein and femoral artery (Polyethylene tubing, PE 50, 0.58 mm ID,

0.965 mm OD) for administration of lymph or drugs. The catheter in the femoral artery was advanced up to the junction with the celiac artery for injections close-arterial to the upper GI tract. IGP was displayed and collected online for the duration of the experiment. Changes of IGP were measured, analyzed as the maximal decrease of ILP [cm H₂O].

Experimental Protocols: Inhibition of gastric motility was measured during duodenal perfusion with saline and compared to intraduodenal perfusion with glucose or galactose (10 min at 0.05 ml/min, 660 mM, 60 mg and 990 mM, 90 mg respectively); the order of perfusion was randomized.

Measurement of intestinal secretion in anesthetized rats

Net ileal fluid absorption or secretion was measured in anesthetized rats (sodium pentobarbital, 60 mg/kg ip) as previously described (19). Following a midline abdominal incision, a small incision was made into the terminal ileum approximately 2 cm rostral to the ileo-cecal junction. A pre-weighed 2.5% agarose cylinder (type II-A: 140 mM NaCl/5mM KCl; dimensions diameter 4 mm, length 3 cm) was inserted into the lumen and the intestine sutured closed. After 90 minutes, the agarose cylinder was removed and re-weighed; the difference between the initial and final weight of the agarose cylinder was taken as a representative measure of the net absorption/secretion in that segment of intestine. Data are expressed as $\mu\text{l fluid/cm}^2/\text{hr}$.

Experimental Protocols: Prior to anesthesia, rats were randomized into 3 groups; water 1 ml, glucose (660 mM, 990 mM, 120 and 180 mg) or galactose (990 mM, 180 mg) was administered by oral gavage and rats anesthetized after 15 min.

Collection of mesenteric lymph

Surgical preparation and lymph collection was performed as previously described (9). Briefly, rats (300 – 350 g) were anesthetized with methohexital sodium (60 mg/kg i.p.; Brevital, Jones Pharma Inc., St. Louis, MO). The mesenteric lymph duct was cannulated with a PVC tube (Medical Grade, 0.50 mm ID, 0.80 mm OD, Dural Plastics and Engineering, Dural, Australia), fixed in place with a drop of ethyl cyanoacrylate glue (Krazy Glue, Elmers Products Inc., Columbus, OH) and externalized through a stab wound in the right flank. A second cannula (Silastic 1 mm ID, 2.15 mm OD) was passed through the fundus of the stomach, extended 3 cm into the duodenum, secured in place with a silk suture and additionally fixed with a drop of ethyl cyanoacrylate glue and externalized. After surgery, rats were placed in Bollman cages and were allowed to recover, and a maintenance solution (lipid 0.2 mol/L, NaCl 145 mmol/L and KCL 4 mmol/L) was perfused continuously through the duodenal cannula at a rate of 3 ml/h for 24 h during the recovery period to ensure hydration, electrolyte and nutritional maintenance.

Control lymph was collected for 60 min during perfusion of the intestine with physiological saline followed by collection for a further 60 min during intestinal perfusion with 660 mM glucose or galactose (0.05 ml/min; 90 mgs). Lymph was collected in ice-chilled tubes, centrifuged and stored at -80°C until assayed for 5-HT using a commercial ELISA kit (Becton Coulter).

Recording of duodenal vagal afferent fiber discharge

The technique has been published previously (10). Briefly, a segment of the thoracic esophagus, stomach and proximal duodenum were removed from anesthetized rats and immersed

in oxygenated modified Ringer's solution. The pancreas and stomach were removed except for the pylorus and adjacent antrum, and the subdiaphragmatic dorsal vagus nerve was identified. A catheter was placed into the gastroduodenal artery and the hepatic, left and right gastric arteries were tied. The segment was placed into an organ bath and perfused continuously with oxygenated Ringer's solution at 2.0 - 2.5 ml /min flow rate and the temperature of the organ bath was maintained at $33 \pm 1^{\circ}\text{C}$.

Action potentials were recorded from the dorsal gastric vagus nerve trunk; action potentials were sent to a pre-amplifier (DAM-6 X100, 100-10 kHz band-pass filter; World Precision Instruments, Sarasota, FL), displayed on a digital storage oscilloscope (model 2211, Tektronix) and recorded on-line using a digital tape recorder (Sony high-density linear A/D D/A optical digital audio tape deck, DTC-700). In addition, unit potentials were simultaneously sent to a PC computer equipped with an A/D board (DT2831, Data Translation, Marlboro, MA). In addition, unit potentials were simultaneously sent to a A/D module (Micro 1401 MK2, CED, Cambridge England) connected to a PC computer. Electrophysiological recording from duodenal vagal afferents was started approximately 30 min after the preparation during stable recording conditions. Units were selected by the presence of spontaneous activity in the nerve strand. Each nerve strand containing spontaneously active units was tested for the response to intra-arterial injection of 2-methyl 5-HT (10pmol). In 7 preparations, nerve strands containing 5-HT-responsive units were tested to determine their response to intra-duodenal infusion of glucose and galactose (0.05 ml, 10 min, 50 mM).

Using the acquisition module of SPIKE2 impulse analysis software (SPIKE2 version 5, CED, Cambridge England), units within upper and lower threshold settings of the amplifier were

acquired on-line onto the hard drive of a PC. Single units were discriminated off-line from the multi-unit recordings based on their shape. The response pattern of different units was analysed and displayed separately. Response magnitudes were normalized by a response quotient (RQ), where $RQ = \frac{\text{spike count after treatment}}{\text{spike counts before}}$. A value of $RQ > 1.20$ was taken to indicate an excitatory response and $Q = 1 \pm 0.19$ indicates no response.

Real-time quantitative PCR

Tissue was taken from anaesthetized rats. The ileum was opened along the antimesenteric border and placed mucosal side up on an ice cold glass plate. The mucosa was scraped away from the muscle. The mucosal and muscle samples were lysed in 1x ABI lysis buffer (Applied Biosystems) and stored at -20°C until processing. Total RNA was extracted from the lysates using a 6700 Automated Nucleic Acid workstation (6700 ANA, Applied Biosystems) according to the manufacturer's instructions. Complementary DNA was synthesized using 100 units of SuperScript II (Invitrogen, Carlsbad, CA), 600 ng random hexadeoxyribonucleotide (pd(N)₆) primers, 10 U RNaseOut, and 1 mM dNTPs (Life Technologies) in a final volume of 40 μl . The reverse transcription reaction proceeded for 50 min at 42°C . After addition of 60 μl of water, the reaction was terminated by heating for 5 min to 95°C and cooling on ice.

Each PCR reaction contained 400 nM of each primer, 80 nM of the TaqMan probe and commercially available PCR mastermix (TaqMan Universal PCR Mastermix, Applied Biosystems) containing 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 50 mM KCl, 5 mM MgCl_2 , 2.5 mM deoxynucleotide triphosphates, 0.625 U AmpliTaq Gold DNA polymerase per reaction, 0.25 U

AmpErase UNG per reaction and 5 µl of the diluted cDNA sample in a final volume of 25 µl. The samples were placed in 96 well plates and amplified in an automated fluorometer (ABI PRISM 7700 Sequence Detection System, Applied Biosystems). Amplification conditions were 2 min at 50°C, 10 min at 95°C, 40 cycles of 15 s at 95°C and 60 s at 60°C.

For each target gene, two primers and an internal, fluorescent labeled TaqMan probe (5' end, reporter dye FAM (6-carboxyfluorescein), 3' end, quencher dye TAMRA (6-carboxytetramethylrhodamine)) were designed using Primer Express software (Applied Biosystems, Foster City, CA). SGLT3: forward primer SGLT3-38f 5'-CCCCAGAGCCACCTCCAT-3', reverse primer SGLT3-112r 5'-CCAGAAAATAGATGACAATGACTGAGAT-3', TaqMan probe SGLT3-58p 5'-6FAM-TCTGACCACATCCGAAATGCTGCTG-TAMRA-3'; glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH): forward primer GAPDHf 5'-GCACCACCAACTGCTTAGCAC-3', reverse primer GAPDH-557r 5'-TCTTCTGGGTGGCAGTGATG-3', TaqMan probe GAPDH-509p 5'-6FAM-TCGTGGAAGGACTCATGACCACAGTCC-TAMRA-3'. SGLT-1: Assay-on-Demand, Applied Biosystems, cat no Hs00165793_m1. The length of the PCR products was held very short (between 73 and 170 bp) to enable high amplification efficiencies.

Final quantitation was done using the comparative CT method (User Bulletin #2, Applied Biosystems, Foster City, CA) and is reported as relative transcription or the n-fold difference relative to a calibrator cDNA (control group). In brief, the endogenous control feline GAPDH was used to normalize the cytokine gene signals. The normalized values (Δ CT) were calibrated against the normalized values of the control group for each target gene ($\Delta\Delta$ CT). The relative

linear amount of target molecules relative to the calibrator, was calculated by $2^{-\Delta\Delta CT}$. Therefore, all gene transcription data is expressed as an n-fold difference relative to the calibrator.

Data Analysis. Values were compared using one way ANOVA followed by Tukey's test and considered significantly different if $P < 0.05$. Differences in mesenteric lymph concentrations were determined using a two-tailed unpaired t test.

Results

Effect of glucose analogs on gastric emptying in awake rats

Under control conditions, during intraduodenal perfusion of saline (0.05 ml/min for 10 min), $76 \pm 3\%$ of the contents of the stomach emptied in 10 min ($n=6$). Glucose produced a dose-dependent decrease in gastric emptying (Fig 1A); intraduodenal perfusion of glucose produced a significant inhibition of gastric emptying at doses of 60 and 90 mg but not 30 mg ($p<0.001$ vs saline, $n=5$). Perfusion of the intestine with glucose (90 mgs) produced a short-lasting decrease in gastric emptying; gastric emptying returned to control levels by 25 min after the start of infusion of glucose (glucose 5-10 min vs 20-25 min; 47 ± 2 vs 72 ± 2 , NS, $n=5$). Intraduodenal perfusion with mannitol (90 mg) had no significant effect on gastric emptying.

Intestinal perfusion with 3-O-methyl glucose (90 mgs; glucose analog that is a substrate for SGLT and is metabolized within enterocytes) or α -methyl glucose (90 mgs; glucose analog that is a substrate for SGLT and is not metabolized) produced an inhibition of gastric emptying that was not significantly different from that produced by glucose (NS, $n=5$, Fig 1B). In contrast, 2-deoxy-D-glucose (90 mgs) had no significant effect on gastric emptying.

Effect of glucose and galactose on gastric motility

As previously reported (21), perfusion of the duodenum with glucose (60 or 90 mg) produced a significant decrease in gastric motility in anesthetized rats compared with perfusion of saline (Fig 2). Tonic intragastric pressure decreased by 0.65 ± 0.11 cmH₂O during perfusion with 60 mg of glucose ($n=6$; $p<0.01$). In contrast, intraduodenal perfusion with galactose (60 and 90 mg) had no significant effect to inhibit gastric motility; rather at the

90 mg dose, galactose increased gastric motility (change in IGP; 0.6 ± 0.09 cmH₂O, respectively; $p < 0.05$).

Effect of glucose analogs and galactose on intestinal secretion

In anaesthetized rats treated with vehicle (1 ml water gavage, 15 min before induction of anesthesia), the net fluid movement across the ileum was absorptive ($n=16$, Fig 3). Treatment with glucose (120, 180 mgs) or α -methyl glucose (180 mgs) produced a significant decrease in intestinal fluid absorption ($p < 0.01$, $n=5-8$ in each group). However, treatment with galactose (180 mg) had no significant effect on intestinal fluid flux (NS, $n=5$).

Effect of glucose and galactose on release of 5-HT

In awake rats, basal release of 5-HT was measured in mesenteric lymph (Fig 4). The release of 5-HT was increased by perfusion of the intestine with glucose (660 mM, 0.05 ml/min for 60 mins; $n=7$). The peak increase in the output of 5-HT occurred in the first 15 min (equivalent to perfusion of 90 mgs glucose) and then decreased towards baseline despite continued glucose perfusion. 5-HT release was higher in rats in which the intestine was perfused with glucose compared to galactose perfusion (change from basal, pmol; glucose vs galactose; 2.64 ± 0.75 vs 0.66 ± 0.46); however, this did not reach statistical significance ($p < 0.055$; $n=7$ and 6, glucose vs galactose).

Effect of glucose and galactose on vagal afferent fiber discharge

Data was obtained from 7 fibers of the vagus nerve trunk and single fiber activity was obtained from 23 units. Of these 23 units, 19 responded with an increasing in firing to intra-arterial injection of the 5-HT₃R agonist, 2-methyl 5-HT (mean RQ = 1.54 ± 0.5). Of these 18 units, 7 responded to intraduodenal perfusion of glucose (mean RQ = 1.32 ± 0.2); however,

no glucose-sensitive units responded to intraduodenal galactose (mean RQ = 1.05 ± 0.4 , n=6 glucose-sensitive fibers).

Real time PCR for SGLT-1 and SGLT-3

mRNA for both SGLT-1 and SGLT-3 were detected in the rat intestinal mucosa.

Discussion

In the present study, we investigated the mechanism involved in the detection of monosaccharides in the intestinal mucosa. Initial experiments were aimed at determining whether the monosaccharide has to be a substrate for SGLT or to be able to enter metabolic pathways within the gut wall to initiate a response. Inhibition of gastric emptying in response to monosaccharide in the intestine was produced only in response to glucose analogues (3-O-methyl glucose and α -methyl glucose) that are substrates for the SGLT family of transporters. Metabolism of monosaccharide within the epithelial cell layer does not appear to be required because 3-O-methyl glucose, a non-metabolizable substrate of SGLT, was as effective to inhibit gastric motility as glucose and α -methyl glucose. GLUT-2, responsible for the transport of glucose across the basolateral membrane of enterocytes, is not involved since 2-deoxy-D-glucose had no effect on the rate of gastric emptying. This supports a role for SGLT in mediating the response to glucose in the intestine. In addition, this data is consistent with other published data; we previously demonstrated that intestinal perfusion of glucose inhibits gastric motility via a phloridzin-sensitive pathway in anesthetized rats suggesting that SGLT may play a role in the initiation of the response to glucose (24).

Recent evidence has suggested that hSGLT-3, a member of the SLC5 family of transporters, might be a glucose sensor because it binds but does not efficiently transport glucose (3). hSGLT-3 has a much lower affinity for galactose than glucose. In order to

functionally discriminate between SGLT-1 and SGLT-3, we determined the effect of glucose versus galactose on inhibition of gastric motility, stimulation of vagal afferent activity, release of 5-HT and stimulation of intestinal fluid secretion. Inhibition of proximal gastric motility, shown to be important in the regulation of gastric emptying, was observed in response to glucose but not galactose. Glucose-mediated inhibition of gastric motility is mediated via a vago-vagal reflex pathway involving 5-HT₃ receptors, located on vagal afferent nerve terminals in the intestinal mucosa (2;22). Similarly, galactose was ineffective to stimulate vagal afferent fiber activity than glucose. Because galactose has a much lower affinity for SGLT-3 than glucose, yet the same affinity for SGLT-1, these results suggests that the mechanism involved in detection of glucose in the intestinal mucosa to initiate release of 5-HT an activation of the 5HT₃R dependent vagal afferent pathway involves SGLT-3 rather than SGLT-1.

It has been known for sometime that instillation of glucose solutions into the intestine will release 5-HT from enterochromaffin cells in the wall of the gut. Release of 5-HT from enterochromaffin cells and results in activation of vagal afferents and vagal reflex pathways in response to intestinal glucose is mediated via 5-HT₃Rs but the exact mechanism between the lumen and the nerve terminals remains to be elucidated (20). Using the enterochromaffin-like cell line BON, we demonstrated that release of 5-HT in response to glucose is also dependent on a SGLT protein (13). We concluded that this was SGLT-1; BON cells express mRNA and the protein for SGLT-1 and release of 5-HT from BON cells was phloridzin-sensitive. However, in light of the new findings suggesting that the glucose sensor may be SGLT-3, two observations suggest that release of 5-HT maybe dependent on SGLT-3 rather than SGLT-1. Application of phloridzin alone stimulated release of 5-HT from BON cells suggesting that binding of glucose or phloridzin to SGLT-3 may be the sufficient stimulus to elicit 5-HT release. Second, the concentration required to elicit 5-HT release from BON cells in response

to glucose were in excess of the K_M for glucose binding to SGLT-1. Recent evidence suggests that, at least for human SGLT-3, the affinity for binding of glucose is considerable higher than hSGLT-1. Therefore, in BON cells it is possible that SGLT-3 mediates 5-HT release in response to glucose. We have preliminary evidence that BON cells express mRNA for SGLT-3 (Freeman and Raybould, unpublished observations). In the present study, we determined release of 5-HT into mesenteric lymph. Determining 5-HT concentrations in mesenteric lymph has several advantages over plasma; mesenteric lymph represents the interstitial fluid in the gut wall and the lack of platelets allow accurate determination of 5-HT concentrations. Glucose was more effective than galactose in releasing 5-HT. mRNA for SGLT-3 was detected in the intestinal mucosa, supporting a role for SGLT-3 in the detection of glucose, release of 5-HT and activation of reflex pathways to regulate gastrointestinal motor and secretory function.

In immunochemical studies of the human intestine, expression of SGLT-3 was localized to the neurons in the myenteric plexus; preliminary observations suggest that these were cholinergic neurons (3). Activation of cholinergic reflex pathway in the intestine by 5-HT and 5-HT₃ receptors has been shown to stimulate fluid secretion (19). Therefore, we determined the effect of glucose, given by oral gavage, on fluid secretion in the distal ileum. Under basal conditions in anesthetized rats, the intestine undergoes net absorption of fluid. The direct effect of glucose on net luminal fluid balance is to promote absorption, either by passive movement or by water transport along with glucose and sodium (6). The effect of glucose in the proximal gut on fluid secretion in the distal gut is to increase fluid secretion, presumably to bring intestinal contents to isotonicity in the first part of the postprandial period. It is well established that intestinal secretion can be regulated by the enteric nervous system and that 5-HT acting at 5-HT₃Rs plays a role (8;29). Activation of 5-HT₃ receptors on nerve terminals depolarizes myenteric neurons, some of which have been identified as

intrinsic primary afferent neurons (1;31). In the present study we measured effects of luminal glucose on fluid secretion in the terminal ileum. In this model, intestinal fluid secretion is stimulated by agonists of 5-HT₃R and secretion stimulated by mechanical stimulation of the mucosa or by abdominal irradiation is reduced by 5-HT₃R antagonist (19). In the present study, the terminal ileum was absorptive under basal conditions and glucose produced an increase in intestinal fluid secretion, the magnitude of which was dependent on the amount of glucose administered. In contrast, galactose had no effect on intestinal fluid absorption, suggesting the importance of SGLT-3 rather than SGLT-1 in the detection of glucose in the proximal GI tract.

There are other glucose-sensitive cells within the body that play a role in glucose homeostasis, including pancreatic β -cells, hypothalamic neurons and enteroendocrine cells. The release of the incretin hormones, gastrointestinal inhibitory peptide (GIP), and the glucagon-like peptides, GLP-1, in response to glucose is mediated by the regulation of ATP-sensitive K channels (27). However, more recent evidence suggests that other mechanism maybe involved, including SGLT-1 and G-protein coupled sweet-tasting receptors (5;11). There is evidence, as least for the glucose-induced release of GLP-1 may involve SGLT-1, although similar to beta cells of the pancreas, it is likely to also involve K_{ATP} channels. This mechanism is unlikely to be the case in release of 5-HT because non-metabolizable analogues of glucose are able to induce release of 5-HT and to activate vago-vagal reflexes.

In summary, we have obtained evidence to support the hypothesis that SGLT-3 is involved in glucose-sensing in the wall of the gut. Sensing of glucose at the brush-border membrane of the intestine is important to mount appropriate reflex control of gastrointestinal secretion and motility in the postprandial period.

Acknowledgements

This work supported by grant NIH DK58588 (HER) and Canadian (SLF). The authors are grateful to Dr Ernest Wright (UCLA School of Medicine) for his helpful discussions throughout the course of this work.

Figure Legends

Fig 1: Substrates of SGLT inhibit gastric emptying of liquid in awake rats. The rate of gastric emptying was measured in awake rats during duodenal perfusion with glucose (glu), 3-O-methyl glucose (3-OMG, metabolizable substrate of SGLT), α -methyl glucose (α -MG, non-metabolizable substrate of SGLT) and 2-deoxy-D-glucose (non-metabolizable substrate of GLUT-2). $P < 0.001$, $n = 5-6$ in each group.

Fig 2: Effect of intraduodenal perfusion of glucose or galactose on inhibition of gastric motility in anesthetized rats. The change in intragastric pressure was determined by the manometric techniques and the change from baseline taken as the response to intraduodenal perfusion with glucose or galactose. Glucose, but not galactose, produced an inhibition of gastric motility as previously described. (1) * $p < 0.01$ glucose 60 and 90 mg versus baseline intragastric pressure, $n = 6$ and # $p < 0.05$ glucose versus galactose, $n = 6$.

Fig 3: Net fluid movement across the wall of the distal small intestine of anesthetized rats in response to glucose or galactose. Fluid absorption was significantly decreased by glucose and α -methyl glucose but not galactose in the proximal small intestine. $P < 0.01$ glucose, α -methyl glucose vs vehicle, $n = 5-8$ in each group.

Fig 4: Increase in the concentration of 5-HT in mesenteric lymph in response to glucose. Mesenteric lymph was collected in awake rats fitted with a cannula in the mesenteric lymph duct and a cannula in the duodenum for perfusion of saline or glucose. Perfusion of glucose (60 mg over 60 min) caused a significant increase in 5-HT concentration in lymph. $P < 0.05$ saline vs glucose, $n = 7$).

Fig 1

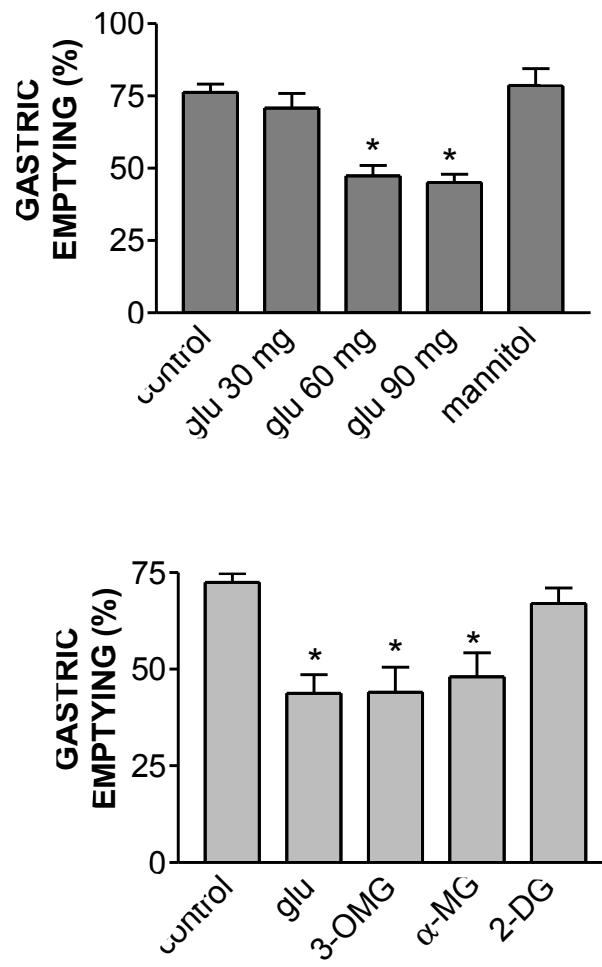


Fig 2

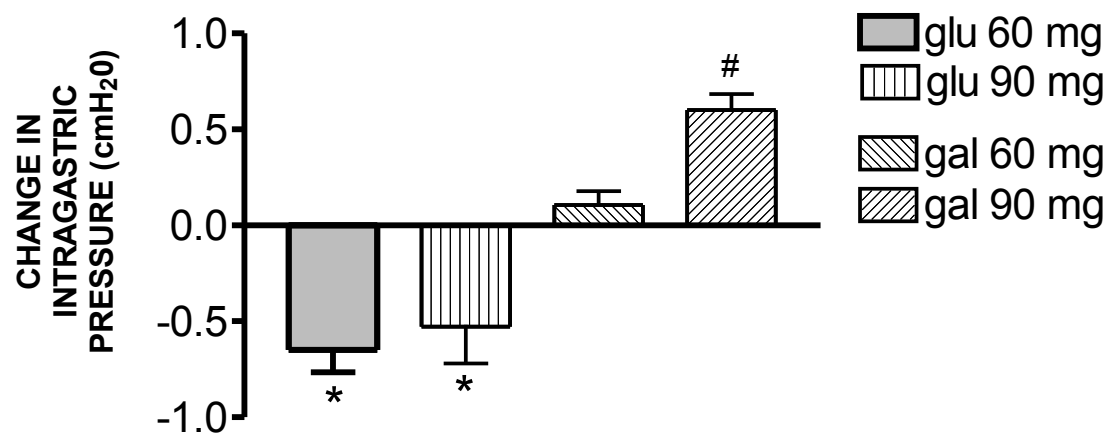


Fig 3

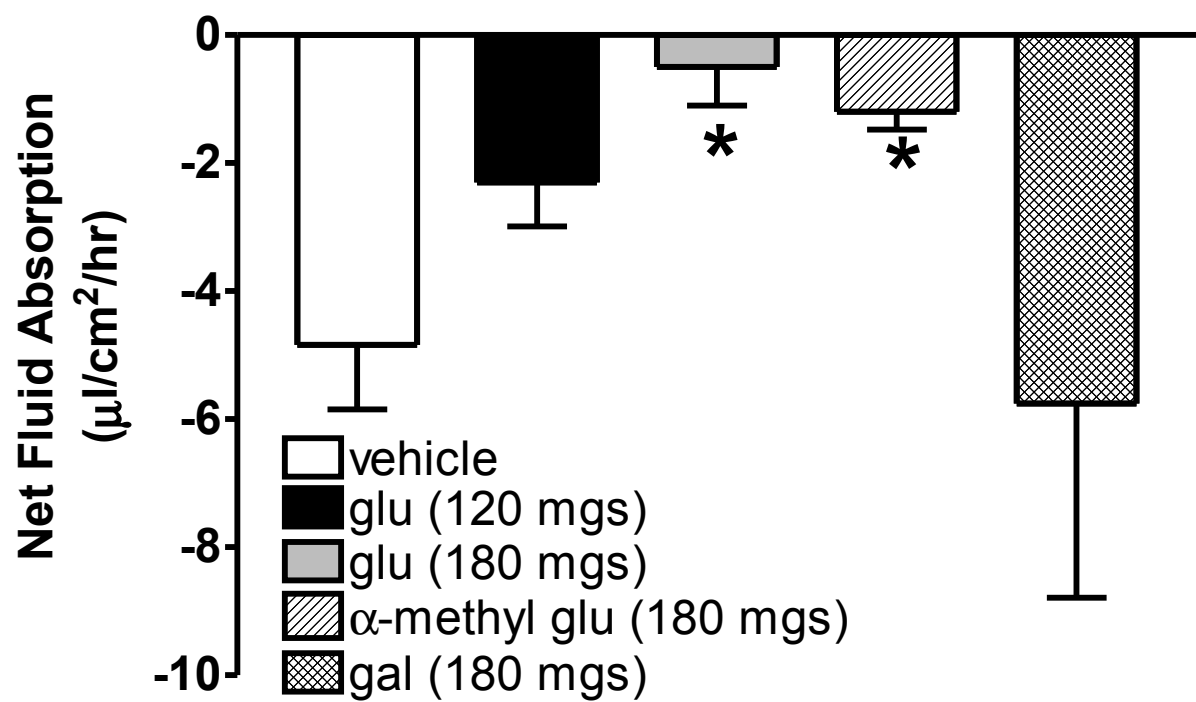


Fig 4



Reference List

1. Bertrand PP, Kunze WA, Furness JB and Bornstein JC. The terminals of myenteric intrinsic primary afferent neurons of the guinea-pig ileum are excited by 5-hydroxytryptamine acting at 5-hydroxytryptamine-3 receptors. *Neuroscience* 101: 459-469, 2000.
2. Blackshaw LA and Grundy D. Effects of 5-hydroxytryptamine (5-HT) on the discharge of vagal mechanoreceptors and motility in the upper gastrointestinal tract of the ferret. *J Auton Nerv Syst* 45: 51-59, 1993.
3. Diez-Sampedro A, Hirayama BA, Osswald C, Gorboulev V, Baumgarten K, Volk C, Wright EM and Koepsell H. A glucose sensor hiding in a family of transporters. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 11753-11758, 2003.
4. Dube PE and Brubaker PL. Nutrient, neural and endocrine control of glucagon-like peptide secretion. *Horm Metab Res* 36: 755-760, 2004.
5. Dyer J, Salmon KS, Zibrik L and Shirazi-Beechey SP. Expression of sweet taste receptors of the T1R family in the intestinal tract and enteroendocrine cells. *Biochem Soc Trans* 33: 302-305, 2005.
6. Ferraris RP and Diamond J. Regulation of intestinal sugar transport. *Physiol Rev* 77: 257-302, 1997.
7. Forster ER, Green T, Elliot M, Bremner A and Dockray GJ. Gastric emptying in rats: role of afferent neurons and cholecystokinin. *Am J Physiol* 258: G552-G556, 1990.
8. Gershon MD. Review article: roles played by 5-hydroxytryptamine in the physiology of the bowel. *Aliment Pharmacol Ther* 13 Suppl 2: 15-30, 1999.

9. Glatzle J, Kalogeris TJ, Zittel TT, Guerrini S, Tso P and Raybould HE. Chylomicron components mediate intestinal lipid-induced inhibition of gastric motor function. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 282: G86-G91, 2002.
10. Glatzle J, Wang Y, Adelson DW, Kalogeris TJ, Zittel TT, Tso P, Wei JY and Raybould HE. Chylomicron components activate duodenal vagal afferents via a cholecystokinin A receptor-mediated pathway to inhibit gastric motor function in the rat. *J Physiol* 550: 657-664, 2003.
11. Gribble FM, Williams L, Simpson AK and Reimann F. A novel glucose-sensing mechanism contributing to glucagon-like peptide-1 secretion from the GLUTag cell line. *Diabetes* 52: 1147-1154, 2003.
12. Holzer HH, Turkelson CM, Solomon TE and Raybould HE. Intestinal lipid inhibits gastric emptying via CCK and a vagal capsaicin-sensitive afferent pathway in rats. *Am J Physiol* 267: G625-G629, 1994.
13. Kim M, Cooke HJ, Javed NH, Carey HV, Christofi F and Raybould HE. D-glucose releases 5-hydroxytryptamine from human BON cells as a model of enterochromaffin cells. *Gastroenterology* 121: 1400-1406, 2001.
14. Levin RJ. Digestion and absorption of carbohydrates--from molecules and membranes to humans. *Am J Clin Nutr* 59: 690S-698S, 1994.
15. Li Y, Hao Y, Zhu J and Owyang C. Serotonin released from intestinal enterochromaffin cells mediates luminal non-cholecystokinin-stimulated pancreatic secretion in rats. *Gastroenterology* 118: 1197-1207, 2000.
16. Li Y, Wu XY, Zhu JX and Owyang C. Intestinal serotonin acts as paracrine substance to mediate pancreatic secretion stimulated by luminal factors. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 281: G916-G923, 2001.

17. Lloyd KC, Holzer HH, Zittel TT and Raybould HE. Duodenal lipid inhibits gastric acid secretion by vagal, capsaicin-sensitive afferent pathways in rats. *Am J Physiol* 264: G659-G663, 1993.
18. Martin DC, Magnant AD and Kellum JM, Jr. Luminal hypertonic solutions stimulate concentration-dependent duodenal serotonin release. *Surgery* 106: 325-331, 1989.
19. Picard C, Ksas B, Griffiths NM and Fioramonti J. Effect of granisetron on radiation-induced alterations of colonic motility and fluid absorption in rats. *Aliment Pharmacol Ther* 16: 623-631, 2002.
20. Racke K and Schworer H. Regulation of serotonin release from the intestinal mucosa. *Pharmacol Res* 23: 13-25, 1991.
21. Raybould HE. Capsaicin-sensitive vagal afferents and CCK in inhibition of gastric motor function induced by intestinal nutrients. *Peptides* 12: 1279-1283, 1991.
22. Raybould HE, Glatzle J, Robin C, Meyer JH, Phan T, Wong H and Sternini C. Expression of 5-HT₃ receptors by extrinsic duodenal afferents contribute to intestinal inhibition of gastric emptying. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 284: G367-G372, 2003.
23. Raybould HE and Holzer H. Dual capsaicin-sensitive afferent pathways mediate inhibition of gastric emptying in rat induced by intestinal carbohydrate. *Neurosci Lett* 141: 236-238, 1992.
24. Raybould HE and Zittel TT. Inhibition of gastric motility induced by intestinal glucose in awake rats: role of Na(+)-glucose co-transporter. *Neurogastroenterol Motil* 7: 9-14, 1995.
25. Reimann F and Gribble FM. Glucose-sensing in glucagon-like peptide-1-secreting cells. *Diabetes* 51: 2757-2763, 2002.

26. Ritter RC. Gastrointestinal mechanisms of satiation for food. *Physiol Behav* 81: 249-273, 2004.
27. Schuit FC, Huypens P, Heimberg H and Pipeleers DG. Glucose sensing in pancreatic beta-cells: a model for the study of other glucose-regulated cells in gut, pancreas, and hypothalamus. *Diabetes* 50: 1-11, 2001.
28. Schwartz GJ and Moran TH. Sub-diaphragmatic vagal afferent integration of meal-related gastrointestinal signals. *Neurosci Biobehav Rev* 20: 47-56, 1996.
29. Spiller RC. Effects of serotonin on intestinal secretion and motility. *Curr Opin Gastroenterol* 17: 99-103, 2001.
30. Tamura CS and Ritter RC. Intestinal capsaicin transiently attenuates suppression of sham feeding by oleate. *Am J Physiol* 267: R561-R568, 1994.
31. Zhou X and Galligan JJ. Synaptic activation and properties of 5-hydroxytryptamine(3) receptors in myenteric neurons of guinea pig intestine. *J Pharmacol Exp Ther* 290: 803-810, 1999.
32. Zittel TT, Rothenhofer I, Meyer JH and Raybould HE. Small intestinal capsaicin-sensitive afferents mediate feedback inhibition of gastric emptying in rats. *Am J Physiol* 267: G1142-G1145, 1994.

Annexe 7: Glossaire

α -MSH: Produit de POMC, l' α -MSH est un des 4 MSH melanocytes stimulating hormones, médiateur poly-peptidique (Ac-Ser-Tyr-Ser-Met-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Lys-Pro-Val-NH₂). L' α -MSH est impliquée dans de nombreuses fonctions physiologiques comme la coloration de la peau mais surtout dans le contrôle central de la prise alimentaire.

Acides gras à chaîne longue: acide carboxylique présentant la plupart du temps une queue hydrophobe carbonée pouvant être saturée ou insaturée dont le nombre d'atomes de carbones est généralement supérieur à 11.

Apo A-IV: lipoprotéines constituant des chylomicrons synthétisée lors de l'absorption des lipides.

Axe tube digestif-cerveau: (*gut brain axis*) ensemble des voies nerveuses et humorales par lesquelles le tube digestif et les systèmes centraux de la prise alimentaire communiquent pour réguler le comportement alimentaire.

Balance énergétique: différence entre les entrées en énergie et les sorties en énergie du corps

c-fos: Gène précoce exprimé notamment par les neurones du système nerveux central souvent utilisé comme marqueur de l'activation neuronale.

Capsaïcine: le composé chimique capsaïcine (8-méthyl-N-vanillyle-6-nonénamide) est le composé actif du piment rouge (*Capsicum*). Le capsaïcine se lie à un récepteur à travers la membrane appelée le récepteur vanilloïde sous-type 1 (VR1), lequel est un canal d'ion permettant des ions positivement chargés (c'est-à-dire cations) de passer à travers la membrane de la cellule dans la cellule.

Cefaclor: antibiotique de la famille des céphalosporines possédant une activité peptidomimétique.

Cellule entéroendocrine: (CEEC) type de cellule neuroendocrine présent dans la muqueuse de l'intestin. Ces cellules possèdent une activité sécrétrice importante notamment de sérotonine, ou de CCK. Elles sont impliquées dans la détection des nutriments dans le contenu digestif.

Cellules BON: Cellules entéroendocrines de type sérotoninergique.

Cellules STC1: Cellules entéroendocrines de type cholécystokinergique.

Cerveau: (ou encéphale) Partie du système nerveux central situé dans le crâne.

Cholécystokinine: (CCK), du grec ancien *kholê* (bile), *kustis*, (vessie) et *kinêsis* (mouvement), La CCK est un médiateur peptidique de taille variable, possédant une séquence terminale constante de type: Asp-Tyr-Met-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH₂. On la trouve dans le cerveau et dans le tube digestif, principalement dans le duodénum. La CCK agit sur deux types de récepteurs métabotropiques (couplés à une protéine G) CCK₁ et CCK₂. Libérée par le tube digestif la CCK déclenche la contraction de la

vésicule biliaire, le ralentissement de la motricité gastrique et active la sécrétion pancréatique. Elle joue aussi un rôle sur le contrôle de la prise alimentaire en activant les récepteurs CCK₁ du nerf vague.

Chylomicron: Les chylomicrons sont des complexes de lipoprotéines qui se forment en période de digestion. Elles sont responsables du transport des acides gras à chaîne longue de l'intestin grêle vers les tissus.

Comportement alimentaire: ensemble coordonné d'actions relatif à l'ingestion d'aliments par un organisme.

Comportement ingestif: composante du comportement alimentaire restreinte à la seule consommation d'aliments.

Consommation: Une des 5 phases du comportement alimentaire, correspond à l'ingestion de nourriture à proprement parler.

Cryptes intestinales: invaginations de la muqueuse intestinale situées à la base des villosités intestinales. On y trouve des cellules souches qui migrent peu à peu vers le sommet des villosités en se différenciant, on y trouve aussi de nombreuses cellules entéroendocrines.

Duodénum: le duodénum est le segment initial de l'intestin grêle (duodénum + jéjunum + iléon). Il fait suite à l'estomac par l'intermédiaire du pylore. C'est le seul segment fixe de cet intestin grêle, le reste étant mobile avec une activité péristaltique (contractile) permanente.

Électrophysiologie: étude des caractéristiques électrochimiques des organismes vivants.

Entérocyte: Les entérocytes sont un des quatre principaux types de cellules de l'épithélium intestinal. Ils sont la structure absorbante de l'intestin

Ganglion plexiforme: regroupement des corps cellulaires des neurones afférents du nerf vague situé à l'entrée de la boîte crânienne.

Homéostasie: *définition de Walter Cannon*, ensemble des processus organiques qui agissent pour maintenir l'état stationnaire de l'organisme, dans sa morphologie et dans ses conditions intérieures, en dépit de perturbations extérieures

Homéostasie énergétique: mécanisme physiologique visant à maintenir constant les réserves en énergie et le poids corporel.

Hypothalamus: ensemble de noyaux du système nerveux central qui contrôle, entre autres, l'homéostasie, la satiété et les comportements sexuels. Avec le NTS l'hypothalamus est un des deux processeurs centraux régulant le comportement alimentaire.

Iléon: l'iléon est la troisième partie de l'intestin grêle en amont du côlon et en aval du jéjunum.

Indice de masse corporelle: (IMC; *BMI en anglais*) Indice permettant d'évaluer la matière grasse d'une personne, de déterminer sa corpulence. Cet indice se calcule en fonction de la taille (en mètre) et du poids (en kilogramme) $IMC = \text{poids (en kilogrammes)} / \text{taille}^2 \text{ (en mètres)}$.

Initiation du repas: Une des 5 phases du comportement alimentaire, consiste en la prise de décision de s'alimenter.

Intéroception: voir sensibilité viscérale

Intestin grêle: l'intestin grêle est la partie de l'appareil digestif humain située entre l'estomac et le gros intestin (côlon). Il comprend un segment fixe, le duodénum, suivi de deux segments mobiles, le jéjunum puis l'iléon. L'intestin grêle est le lieu principal d'absorption des nutriments par l'organisme.

Jéjunum: le jéjunum est la partie centrale des trois divisions de l'intestin grêle

Leptine: La leptine est une protéine de 16 kDa découverte en 1994, sa concentration dans le plasma fournit au cerveau une estimation de la quantité de tissus adipeux dans l'organisme. La leptine participe au contrôle du comportement alimentaire.

Motricité gastrique: C'est un mécanisme spontané de l'estomac qui assure le brassage des aliments et contrôle le passage des aliments dans l'intestin.

Nerf vague: Le nerf vague ou nerf pneumo-gastrique est la Xe paire des nerfs crâniens. Il relie le tronc cérébral à nombre de viscères comme le système

respiratoire ou le tube digestif. C'est un nerf mixte. Il comprend en effet des fibres afférentes (sensitives) et des fibres efférentes (motrices), les corps cellulaires des fibres afférentes sont situées dans le ganglion plexiforme à l'entrée de la boîte crânienne (mais en périphérie), les corps cellulaires des fibres efférentes sont situées dans le système nerveux central dans le noyau moteur du nerf vague localisé dans le tronc cérébral. Le nerf vague joue un rôle important dans les échanges d'informations entre la périphérie et le cerveau. Dans le cadre du comportement alimentaire le nerf vague joue un rôle clé dans le contrôle de la prise alimentaire.

Neuropeptide Y: (NPY) neurotransmetteur peptidique formé de 36 acides aminés impliqué, entre autre, dans le contrôle central du comportement alimentaire. Il exerce généralement une action orexigène.

Neurophysiologie: La neurophysiologie, physiologie du cerveau et des cellules nerveuses est la partie de la physiologie qui traite du système nerveux.

Noyau arqué de l'hypothalamus: (ARC) région du système nerveux central appartenant à l'hypothalamus, siège du système mélanocortine central hypothalamique. L'ARC est sensible entre autre aux facteurs circulants tels que les concentrations de leptine ou d'insuline.

Noyau du tractus solitaire: (NTS) région du système nerveux central premier relais des afférences du nerf vague dans le cerveau et siège du système mélanocortine central du tronc cérébral. Avec l'hypothalamus, le NTS est un des deux processeurs centraux régulant le comportement alimentaire.

Obésité: Trouble pondéral qui se manifeste par une surcharge graisseuse et un excès de poids tel que l'indice de masse corporelle est supérieur à 30.

Oligopeptide: polymère d'acide aminé de petite taille (généralement inférieur à 4 acides aminés)

Patch clamp: technique électrophysiologique d'enregistrement des courants ioniques transitant à travers les membranes cellulaires

PEPT1: Symporteur de protons et d'oligopeptides exprimé par les entérocytes, responsable de l'absorption de la majorité de la fraction protéique du contenu digestif.

Peptidomimétique: composé chimique non peptidique mais présentant de fortes analogies avec les composés peptidiques.

Périodes de latences: phase du comportement alimentaire, périodes pendant lesquelles un sujet ne s'alimente ni ne cherche à s'alimenter, les périodes de latence sont associés à la sensation de satiété. S'oppose au repas.

Péristaltisme intestinal: Phénomène physiologique, appelé également motricité intestinale, est un mécanisme spontané de l'intestin assurant le brassage des aliments et l'absorption des nutriments.

Physiologie: La physiologie (du grec φύσις, phusè, la nature, et λόγος, logos, l'étude, la science) étudie le fonctionnement mécanique, physique et biochimique des

organismes vivants, animaux ou végétaux, de leurs organes et de leurs organisations, de leurs structures et de leurs tissus.

Potentiel d'action: élément constitutif de l'influx nerveux, dépolarisation transitoire (2-3 ms) et auto-entretenu de la membrane plasmique d'un neurone se déplaçant le long de cette dernière.

Potentiel transmembranaire: polarisation électrique en situation physiologique d'une membrane plasmique.

Procuration: Phase du comportement alimentaire, correspondant à la recherche de nourriture.

Proopiomélanocortine: (POMC) La proopiomélanocortine, est une molécule mère qui se dissocie en courts fragments peptidiques actifs, les β -endorphines et les MSH. Dans le système nerveux central deux régions, expriment POMC et forment le système mélanocortine central: le noyau arqué et le NTS, il est maintenant admis que le système mélanocortine central est un élément majeur dans le contrôle du comportement alimentaire.

Rassasiement: Phénomène physiologique associé à l'arrêt volontaire du repas

Réflexe vago-vagal: Phénomène de rétrocontrôle de la mécanique digestive impliquant successivement les afférences sensibles du nerf vague, le NTS, le noyau moteur dorsal du nerf vague et les efférences motrices du nerf vague.

Repas: Phase du comportement alimentaire correspondant à la recherche ou à la prise d'aliments. S'oppose aux périodes de latence.

Satiété: sensation prolongée de non faim

Sensibilité viscérale: Capacité de l'organisme à détecter les événements survenant en son sein, au niveau des viscères, notamment dans le tube digestif.

Sérotonine: la sérotonine, encore appelée 5-hydroxy-tryptamine (5-HT), est une molécule issue de l'acide aminé tryptophane. C'est un des principaux neuromodulateurs du système nerveux central. Quinze types de récepteurs de la sérotonine se répartissant en sept groupes différents ont été identifiés (notés 5-HT1 à 5-HT7). A l'exception des récepteurs 5-HT3 qui sont ionotropiques, les récepteurs à la sérotonine sont de type métabotrope (i.e. ils agissent sur des protéines G). On trouve la sérotonine dans le cerveau, où elle joue le rôle de neurotransmetteur ou de neuromédiateur, et dans le système digestif. Elle est impliquée dans le contrôle de fonctions telles que la thermorégulation, l'anxiété, le contrôle moteur, le comportement sexuel, le cycle veille-sommeil, la douleur, et surtout les comportements alimentaires. Le tube digestif est le plus gros producteur de 5HT de l'organisme. Le nerf vague exprime des récepteurs à la 5HT de type 5HT3.

SGLT1: Transporteur du glucose sodium dépendant, présentant une affinité faible pour le glucose mais une élevée efficacité absorbative.

SGLT3: Transporteur du glucose sodium dépendant, présentant une affinité élevée pour le glucose mais une faible efficacité absorbative.

Surpoids: Trouble pondéral qui se manifeste par une surcharge graisseuse et un excès de poids tel que l'indice de masse corporelle est compris entre 25 et 30.

Système nerveux: Ensemble des structures qui assurent la commande et la coordination des viscères et de l'appareil locomoteur, la réception des informations sensorielles ainsi que les fonctions cognitives. D'un point de vue anatomique, on distingue le système nerveux central, le système nerveux périphérique et le système nerveux entérique.

Système nerveux autonome: Composante du système nerveux périphérique qui contrôle les fonctions viscérales et involontaires du corps

Système nerveux central: (SNC; *CNS, central nervous system en anglais*) Partie du système nerveux contenu dans la cavité crânienne et la colonne vertébrale le SNC est composé de la moelle épinière et du cerveau.

Système nerveux entérique: Composante du système nerveux située autour tractus digestif.

Système nerveux périphérique: Partie du système nerveux situé ou s'étendant en dehors de la cavité crânienne et de la colonne vertébrale. Le système nerveux périphérique est composé du système nerveux somatique et du système nerveux autonome.

Système nerveux somatique: Partie du système nerveux périphérique associé au contrôle volontaire des muscles et à la perception du corps.

Terminaison du repas: Une des 5 phases du comportement alimentaire, correspond à l'arrêt de la phase de consommation d'aliments, la terminaison peut survenir à cause du rassasiement ou de l'apparition d'un phénomène entrant en compétition (la fuite par exemple).

Tube digestif: Le tube digestif ou gastro-intestinal est le système d'organes des animaux pluricellulaires qui prend la nourriture, la digère pour en extraire de l'énergie et des nutriments, et évacue le surplus.

Références bibliographiques

1. The hypothalamus and food intake regulation in response to amino acids and protein. *Nutr Rev* 29: 20-23, 1971.

2. Akram, D. S., Astrup, A. V, Atinmo, T., Boissin, J-L., Bray, G. A., Carroll, K. K, Chitson, A., Chunming, C., Dietz, W. H., Hill, J. O., Jéquier, E., Komodiki, C., Matsuzawa, Y., Mollentze, W. F., Moosa, K., Noor, M. I., Gibney, M. J., Rössner, S., Shaheen, F., Lakin, V., Seidell, J., Tanphaichitr, V., Uauy, R., Zimmet, P., Deurenberg, P., Gill, T., Khaltayev, N., and Napalkov, P. Obésité: Prévention et prise en charge de l'épidémie mondiale. OMS. 894, 1-300. 2003. OMS. Série de Rapports techniques.

3. Anthony JC, Anthony TG, Kimball SR and Jefferson LS. Signaling pathways involved in translational control of protein synthesis in skeletal muscle by leucine. *J Nutr* 131: 856S-860S, 2001.

4. Anthony TG, McDaniel BJ, Byerley RL, McGrath BC, Cavener DR, McNurlan MA and Wek RC. Preservation of liver protein synthesis during dietary leucine deprivation occurs at the expense of skeletal muscle mass in mice deleted for eIF2 kinase GCN2. *J Biol Chem* 279: 36553-36561, 2004.

5. Appleyard SM, Bailey TW, Doyle MW, Jin YH, Smart JL, Low MJ and Andresen MC. Proopiomelanocortin neurons in nucleus tractus solitarius are activated by visceral afferents: regulation by cholecystokinin and opioids. *J Neurosci* 25: 3578-3585, 2005.

6. Asakawa A, Inui A, Kaga T, Yuzuriha H, Nagata T, Ueno N, Makino S, Fujimiya M, Niijima A, Fujino MA and Kasuga M. Ghrelin is an appetite-stimulatory signal from stomach with structural resemblance to motilin. *Gastroenterology* 120: 337-345, 2001.

7. Attele AS, Shi ZQ and Yuan CS. Leptin, gut, and food intake. *Biochem Pharmacol* 63: 1579-1583, 2002.

8. Baskin DG, Blevins JE and Schwartz MW. How the brain regulates food intake and body weight: the role of leptin. *J Pediatr Endocrinol Metab* 14 Suppl 6: 1417-1429, 2001.

9. Bell FR. Hypothalamic control of food intake. *Proc Nutr Soc* 30: 103-109, 1971.

10. Benoit SC, Clegg DJ, Seeley RJ and Woods SC. Insulin and leptin as adiposity signals. *Recent Prog Horm Res* 59: 267-285, 2004.

11. Bensaid A, Tome D, L'Heureux-Bourdon D, Even P, Gietzen D, Morens C, Gaudichon C, Larue-Achagiotis C and Fromentin G. A high-protein diet enhances satiety without conditioned taste aversion in the rat. *Physiol Behav* 78: 311-320, 2003.

12. Bernard C. Introduction à l'étude de la médecine expérimentale. Paris: 1865.

13. Berthoud HR. Multiple neural systems controlling food intake and body weight. *Neurosci Biobehav Rev* 26: 393-428, 2002.

14. Berthoud HR, Blackshaw LA, Brookes SJ and Grundy D.
Neuroanatomy of extrinsic afferents supplying the gastrointestinal tract.
Neurogastroenterol Motil 16 Suppl 1: 28-33, 2004.

15. Bozkurt A, Deniz M and Yegen BC. Cefaclor, a cephalosporin antibiotic, delays gastric emptying rate by a CCK-A receptor-mediated mechanism in the rat. *Br J Pharmacol* 131: 399-404, 2000.

16. Bray GA. Afferent signals regulating food intake. *Proc Nutr Soc* 59: 373-384, 2000.

17. Broberger C and Hokfelt T. Hypothalamic and vagal neuropeptide circuitries regulating food intake. *Physiol Behav* 74: 669-682, 2001.

18. Broberger C, Holmberg K, Shi TJ, Dockray G and Hokfelt T.
Expression and regulation of cholecystokinin and cholecystokinin receptors in rat nodose and dorsal root ganglia. *Brain Res* 903: 128-140, 2001.

19. Buchan AM. Nutrient Tasting and Signaling Mechanisms in the Gut III. Endocrine cell recognition of luminal nutrients. *Am J Physiol* 277: G1103-G1107, 1999.

20. Burdakov D and Ashcroft FM. Cholecystokinin tunes firing of an electrically distinct subset of arcuate nucleus neurons by activating A-Type potassium channels. *J Neurosci* 22: 6380-6387, 2002.

21. Burdyga G, Lal S, Varro A, Dimaline R, Thompson DG and Dockray GJ. Expression of cannabinoid CB1 receptor by vagal afferent neurons is inhibited by cholecystokinin. *J Neurosci* 24: 2708-2715, 2004.

22. Burdyga G, Spiller D, Morris R, Lal S, Thompson DG, Saeed S, Dimaline R, Varro A and Dockray GJ. Expression of the leptin receptor in rat and human nodose ganglion neurones. *Neuroscience* 109: 339-347, 2002.

23. Cannon CM and Palmiter RD. Peptides that regulate food intake: norepinephrine is not required for reduction of feeding induced by cholecystokinin. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 284: R1384-R1388, 2003.

24. Cannon WB. *The Wisdom of the Body*. New York: 1939.

25. Carter DA and Lightman SL. alpha-MSH exhibits opioid antagonist-like effects in the brainstem of rats. *Peptides* 8: 1173-1175, 1987.

26. Chapelot D, Aubert R, Marmonier C, Chabert M and Louis-Sylvestre J. An endocrine and metabolic definition of the intermeal interval in humans: evidence for a role of leptin on the prandial pattern through fatty acid disposal. *Am J Clin Nutr* 72: 421-431, 2000.

27. Cone RD. Anatomy and regulation of the central melanocortin system. *Nat Neurosci* 8: 571-578, 2005.

28. Coutant F, Agaugue S, Perrin-Cocon L, Andre P and Lotteau V. Sensing environmental lipids by dendritic cell modulates its function. *J Immunol* 172: 54-60, 2004.

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

30. Daniel H. Molecular and integrative physiology of intestinal peptide transport. *Annu Rev Physiol* 66: 361-384, 2005.

31. Darcel NP, Liou AP, Tome D and Raybould HE. Activation of Vagal Afferents in the Rat Duodenum by Protein Digests Requires PepT1. *J Nutr* 135: 1491-1495, 2005.

32. Dixon KD, Williams FE, Wiggins RL, Pavelka J, Lucente J, Bellinger LL and Gietzen DW. Differential effects of selective vagotomy and tropisetron in aminoprivic feeding. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 279: R997-R1009, 2000.

33. Dow JT and Davies SA. Integrative physiology and functional genomics of epithelial function in a genetic model organism. *Physiol Rev* 83: 687-729, 2003.

34. Dyer J, Vayro S, King TP and Shirazi-Beechey SP. The expression of sugar transporter in the endocrine cell line STC-1. *Biochem Soc Trans* 25: 487S, 1997.

35. Dyer J, Vayro S, King TP and Shirazi-Beechey SP. Glucose sensing in the intestinal epithelium. *Eur J Biochem* 270: 3377-3388, 2003.

36. Eastwood C, Maubach K, Kirkup AJ and Grundy D. The role of endogenous cholecystokinin in the sensory transduction of luminal nutrient signals in the rat jejunum. *Neurosci Lett* 254: 145-148, 1998.

37. Ellacott KL and Cone RD. The central melanocortin system and the integration of short- and long-term regulators of energy homeostasis. *Recent Prog Horm Res* 59: 395-408, 2004.

38. Elmquist JK, Elias CF and Saper CB. From lesions to leptin: hypothalamic control of food intake and body weight. *Neuron* 22: 221-232, 1999.

39. Evans RM, Barish GD and Wang YX. PPARs and the complex journey to obesity. *Nat Med* 10: 355-361, 2004.

40. Fan W, Ellacott KL, Halatchev IG, Takahashi K, Yu P and Cone RD. Cholecystokinin-mediated suppression of feeding involves the brainstem melanocortin system. *Nat Neurosci* 7: 335-336, 2004.

41. Farooqi IS, Yeo GS, Keogh JM, Aminian S, Jebb SA, Butler G, Cheetham T and O'Rahilly S. Dominant and recessive inheritance of morbid obesity associated with melanocortin 4 receptor deficiency. *J Clin Invest* 106: 271-279, 2000.

42. Feinle C, D'Amato M and Read NW. Cholecystokinin-A receptors modulate gastric sensory and motor responses to gastric distension and duodenal lipid. *Gastroenterology* 110: 1379-1385, 1996.

43. French S. Effects of dietary fat and carbohydrate on appetite vary depending upon site and structure. *Br J Nutr* 92 Suppl 1: S23-S26, 2004.

44. Fujimoto K, Cardelli JA and Tso P. Increased apolipoprotein A-IV in rat mesenteric lymph after lipid meal acts as a physiological signal for satiation. *Am J Physiol* 262: G1002-G1006, 1992.

45. Furness JB and Clerc N. Responses of afferent neurons to the contents of the digestive tract, and their relation to endocrine and immune responses. *Prog Brain Res* 122: 159-172, 2000.

46. Gevrey JC, Cordier-Bussat M, Nemoz-Gaillard E, Chayvialle JA and Abello J. Co-requirement of cyclic AMP- and calcium-dependent protein kinases for transcriptional activation of cholecystokinin gene by protein hydrolysates. *J Biol Chem* 277: 22407-22413, 2002.

47. Gilbertson TA, Damak S and Margolskee RF. The molecular physiology of taste transduction. *Curr Opin Neurobiol* 10: 519-527, 2000.

48. Hao S, Sharp JW, Ross-Inta CM, McDaniel BJ, Anthony TG, Wek RC, Cavener DR, McGrath BC, Rudell JB, Koehnle TJ and Gietzen DW. Uncharged tRNA and sensing of amino acid deficiency in mammalian piriform cortex. *Science* 307: 1776-1778, 2005.

49. Havel PJ. Peripheral signals conveying metabolic informations to the brain: short term and long term regulation of food intake and energy homeostasis. *Exp Biol Med (Maywood)* 226: 963-977, 2001.

50. Hayashi H, Nutting DF, Fujimoto K, Cardelli JA, Black D and Tso P. Transport of lipid and apolipoproteins A-I and A-IV in intestinal lymph of the rat. *J Lipid Res* 31: 1613-1625, 1990.

51. Hewson AK and Dickson SL. Systemic administration of ghrelin induces Fos and Egr-1 proteins in the hypothalamic arcuate nucleus of fasted and fed rats. *J Neuroendocrinol* 12: 1047-1049, 2000.

52. Horvath TL. The hardship of obesity: a soft-wired hypothalamus. *Nat Neurosci* 8: 561-565, 2005.

53. Isaacs PE, Ladas S, Forgacs IC, Dowling RH, Ellam SV, Adrian TE and Bloom SR. Comparison of effects of ingested medium- and long-chain triglyceride on gallbladder volume and release of cholecystokinin and other gut peptides. *Dig Dis Sci* 32: 481-486, 1987.

54. Jacobowitz DM and O'Donohue TL. alpha-Melanocyte stimulating hormone: immunohistochemical identification and mapping in neurons of rat brain. Proc Natl Acad Sci U S A 75: 6300-6304, 1978.

55. Jequier E. Leptin signaling, adiposity, and energy balance. Ann N Y Acad Sci 967: 379-388, 2002.

56. Joseph SA and Michael GJ. Efferent ACTH-IR opiocortin projections from nucleus tractus solitarius: a hypothalamic deafferentation study. Peptides 9: 193-201, 1988.

57. Kennedy DJ, Leibach FH, Ganapathy V and Thwaites DT. Optimal absorptive transport of the dipeptide glycylsarcosine is dependent on functional Na⁺/H⁺ exchange activity. Pflugers Arch 445: 139-146, 2002.

59. King PJ. The hypothalamus and obesity. Curr Drug Targets 6: 225-240, 2005

59. Kojima M, Hosoda H, Matsuo H and Kangawa K. Ghrelin: discovery of the natural endogenous ligand for the growth hormone secretagogue receptor. Trends Endocrinol Metab 12: 118-122, 2001.

60. Krude H, Biebermann H, Luck W, Horn R, Brabant G and Gruters A. Severe early-onset obesity, adrenal insufficiency and red hair pigmentation caused by POMC mutations in humans. Nat Genet 19: 155-157, 1998.

61. L'Heureux-Bouron D, Tome D, Rampin O, Even PC, Larue-Achagiotis C and Fromentin G. Total subdiaphragmatic vagotomy does not suppress high protein diet-induced food intake depression in rats. *J Nutr* 133: 2639-2642, 2003.

62. Lam TK, Pocai A, Gutierrez-Juarez R, Obici S, Bryan J, guilar-Bryan L, Schwartz GJ and Rossetti L. Hypothalamic sensing of circulating fatty acids is required for glucose homeostasis. *Nat Med* 11: 320-327, 2005.

63. Lam TK, Schwartz GJ and Rossetti L. Hypothalamic sensing of fatty acids . *Nat Neurosci* 8: 579-584, 2005.

64. Ledda F, Amerini S, Filippi S, Mantelli L, Morbidelli L, Rubino A and Ziche M. Cardiovascular effects of capsaicin-sensitive neurons. *Cardioscience* 4: 1-7, 1993.

65. Lemagnen J. Body energy balance and food intake: a neuroendocrine regulatory mechanism. *Physiol Rev* 63: -314, 1983.

66. Lloyd KC, Holzer HH, Zittel TT and Raybould HE. Duodenal lipid inhibits gastric acid secretion by vagal, capsaicin-sensitive afferent pathways in rats. *Am J Physiol* 264: G659-G663, 1993.

67. Mangel AW. Electrophysiology of intestinal cholecystokinin secretion. *Regul Pept* 56: 121-129, 1995.

- 68. Mangel AW.** Electrophysiology of intestinal cholecystokinin secretion. Regul Pept 56: 121-129, 1995.
- 69. Mangel AW, Prpic V, Scott L, Liddle RA.** Inhibitors of ATP-sensitive potassium channels stimulate intestinal cholecystokinin secretion. Peptides 15: 1565-6, 1994.
- 70. Méi N.** Recent studies on intestinal vagal afferent innervation. Functional implications. J Auton Nerv Syst. 9:199-206, 1983.
- 71. Méi N.** La sensibilité viscérale. Paris: 1998.
- 72. Mei N.** La sensibilité viscérale. Paris: 1998.
- 73. Moran TH.** Cholecystokinin and satiety: current perspectives. Nutrition 16: 858-865, 2000.
- 74. Moran TH and Kinzig KP.** Gastrointestinal satiety signals II. Cholecystokinin. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 286: G183-G188, 2004.
- 75. Moran TH, Ladenheim EE and Schwartz GJ.** Within-meal gut feedback signaling. Int J Obes Relat Metab Disord 25 Suppl 5: S39-S41, 2001.
- 76. Murai A, Noble PM, Deavall DG and Dockray GJ.** Control of c-fos expression in STC-1 cells by peptidomimetic stimuli. Eur J Pharmacol 394: 27-34, 2000.

77. Neher E, Fernandez JM and Lindau M. The calcium dependence of vesicle exocytosis. *Res Publ Assoc Res Nerv Ment Dis* 65: 103-110, 1987.

78. Neher E, Sakmann B and Steinbach JH. The extracellular patch clamp: a method for resolving currents through individual open channels in biological membranes. *Pflugers Arch* 375: 219-228, 1978.

79. Nemoz-Gaillard E, Bernard C, Abello J, Cordier-Bussat M, Chayvialle JA and Cuber JC. Regulation of cholecystokinin secretion by peptones and peptidomimetic antibiotics in STC-1 cells. *Endocrinology* 139: 932-938, 1998.

80. Nilaver G, Zimmerman EA, Defendini R, Liotta AS, Krieger DT and Brownstein MJ. Adrenocorticotropin and beta-lipotropin in the hypothalamus. Localization in the same arcuate neurons by sequential immunocytochemical procedures. *J Cell Biol* 81: 50-58, 1979.

81. Niswender KD, Baskin DG and Schwartz MW. Insulin and its evolving partnership with leptin in the hypothalamic control of energy homeostasis. *Trends Endocrinol Metab* 15: 362-369, 2004.

82. Obici S, Zhang BB, Karkanias G and Rossetti L. Hypothalamic insulin signaling is required for inhibition of glucose production. *Nat Med* 8: 1376-1382, 2002.

83. Phillips RJ and Powley TL. Gastric volume rather than nutrient content inhibits food intake. *Am J Physiol* 271: R766-R769, 1996.

84. Pilcher WH and Joseph SA. Differential sensitivity of hypothalamic and medullary opiocortin and tyrosine hydroxylase neurons to the neurotoxic effects of monosodium glutamate (MSG). *Peptides* 7: 783-789, 1986.

85. Prentki M, Tornheim K and Corkey BE. Signal transduction mechanisms in nutrient-induced insulin secretion. *Diabetologia* 40 Suppl 2: S32-S41, 1997.

86. Raybould HE. Visceral perception: sensory transduction in visceral afferents and nutrients. *Gut* 51 Suppl 1: i11-i14, 2002.

87. Raybould HE. Capsaicin-sensitive vagal afferents and CCK in inhibition of gastric motor function induced by intestinal nutrients. *Peptides* 12: 1279-1283, 1991.

88. Raybould HE. Does Your Gut Taste? Sensory Transduction in the Gastrointestinal Tract. *News Physiol Sci* 13: 275-280, 1998.

89. Raybould HE. Nutrient tasting and signaling mechanisms in the gut. I. Sensing of lipid by the intestinal mucosa. *Am J Physiol* 277: G751-G755, 1999.

90. Raybould HE. Visceral perception: sensory transduction in visceral afferents and nutrients. *Gut* 51 Suppl 1: i11-i14, 2002.

91. Raybould HE, Holzer P, Reddy SN, Yang H, Tache Y. Capsaicin-sensitive vagal afferents contribute to gastric acid and vascular responses to intracisternal TRH analog. *Peptides* 11: 789-95. 1990

92. Raybould HE and Lloyd KC. Integration of postprandial function in the proximal gastrointestinal tract. Role of CCK and sensory pathways. *Ann N Y Acad Sci* 713: 143-156, 1994.

93. Raybould HE, Meyer JH, Tabrizi Y, Liddle RA and Tso P. Inhibition of gastric emptying in response to intestinal lipid is dependent on chylomicron formation. *Am J Physiol* 274: R1834-R1838, 1998.

94. Raybould HE and Zittel TT. Inhibition of gastric motility induced by intestinal glucose in awake rats: role of Na(+)-glucose co-transporter. *Neurogastroenterol Motil* 7: 9-14, 1995.

95. Schwartz GJ. The role of gastrointestinal vagal afferents in the control of food intake: current prospects. *Nutrition* 16: 866-873, 2000.

96. Schwartz GJ, McHugh PR, Moran TH. Pharmacological dissociation of responses to CCK and gastric loads in rat mechanosensitive vagal afferents. *Am J Physiol* 267:R303-R308, 1994.

97. Schwartz GJ and Moran TH. Duodenal nutrient exposure elicits nutrient-specific gut motility and vagal afferent signals in rat. *Am J Physiol* 274: R1236-R1242, 1998.

98. Schwartz GJ, Moran TH. CCK elicits and modulates vagal afferent activity arising from gastric and duodenal sites. *Ann N Y Acad Sci* 713: 121-128, 1994.

99. Schwartz GJ and Moran TH. Duodenal nutrient exposure elicits nutrient-specific gut motility and vagal afferent signals in rat. *Am J Physiol* 274: R1236-R1242, 1998.

100. Schwartz MW. Brain pathways controlling food intake and body weight. *Exp Biol Med (Maywood)* 226: 978-981, 2001.

101. Schwartz MW, Woods SC, Porte D, Jr., Seeley RJ and Baskin DG. Central nervous system control of food intake. *Nature* 404: 661-671, 2000.

102. Schwartz RP. Super-size kids' meals lead to super-size kids. *N C Med J* 63: 305-307, 2002.

103. Tome D. Protein, amino acids and the control of food intake. *Br J Nutr* 92 Suppl 1: S27-S30, 2004.

104. Tome D. Protein, amino acids and the control of food intake. *Br J Nutr* 92 Suppl 1: S27-S30, 2004.

105. Tschop M, Wawarta R, Riepl RL, Friedrich S, Bidlingmaier M, Landgraf R and Folwaczny C. Post-prandial decrease of circulating human ghrelin levels. *J Endocrinol Invest* 24: RC19-RC21, 2001.

106. Vaisse C, Clement K, Guy-Grand B and Froguel P. A frameshift mutation in human MC4R is associated with a dominant form of obesity. *Nat Genet* 20: 113-114, 1998.

107. van de Wall EH, Duffy P and Ritter RC. CCK enhances response to gastric distension by acting on capsaicin insensitive vagal afferents. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2005.

108. Watson SJ, Akil H, Richard CW, III and Barchas JD. Evidence for two separate opiate peptide neuronal systems. *Nature* 275: 226-228, 1978.

109. Watts AG. Understanding the neural control of ingestive behaviors: helping to separate cause from effect with dehydration-associated anorexia. *Horm Behav* 37: 261-283, 2000.

110. Willesen MG, Kristensen P and Romer J. Co-localization of growth hormone secretagogue receptor and NPY mRNA in the arcuate nucleus of the rat. *Neuroendocrinology* 70: 306-316, 1999.

111. Wood IS and Trayhurn P. Glucose transporters (GLUT and SGLT): expanded families of sugar transport proteins. *Br J Nutr* 89: 3-9, 2003.

112. Woods SC, Schwartz MW, Baskin DG and Seeley RJ. Food intake and the regulation of body weight. *Annu Rev Psychol* 51: 255-277, 2000.

113. Wright EM, Hirsch JR, Loo DD and Zampighi GA. Regulation of Na⁺/glucose cotransporters. J Exp Biol 200: 287-293, 1997.

114. Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L and Friedman JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. Nature 372: 425-432, 1994.

115. Zheng H, Patterson LM, Berthoud HR. CART in the dorsal vagal complex: sources of immunoreactivity and effects on Fos expression and food intake. Brain Res 957: 298-310, 2002.

116. Zittel TT, De GR, Sternini C and Raybould HE. Fos protein expression in the nucleus of the solitary tract in response to intestinal nutrients in awake rats. Brain Res 663: 266-270, 1994.