



Caractérisation de l'effet satiétogène des protéines et mécanismes centraux impliqués. Cas particulier des protéines et peptides de levure.

Rodolphe Faipoux

► To cite this version:

Rodolphe Faipoux. Caractérisation de l'effet satiétogène des protéines et mécanismes centraux impliqués. Cas particulier des protéines et peptides de levure.. Life Sciences [q-bio]. INAPG (AgroParis-Tech), 2007. English. NNT : . pastel-00003790

HAL Id: pastel-00003790

<https://pastel.hal.science/pastel-00003790>

Submitted on 3 Jun 2008

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

THESE

Pour obtenir le grade de
DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL AGRONOMIQUE PARIS-GRIGNON
Présentée et soutenue publiquement
Par

Rodolphe FAIPOUX
Ingénieur de l'Institut National Agronomique de Paris-Grignon

12 décembre 2007

**CARACTERISATION DE L'EFFET SATIETOGENE DES PROTEINES
ET MECANISMES CENTRAUX IMPLIQUES**

CAS PARTICULIER DES PROTEINES ET PEPTIDES DE LEVURE

Directeur de thèse : Daniel TOME

Jury

M. Daniel Tomé	Président
M. André Jean	Rapporteur
M. Luc Pénicaud	Rapporteur
M. Olivier Rampin	Examineur
M. Eric Oriol	Examineur
M. Gilles Fromentin	Examineur

COLLABORATIONS ET REMERCIEMENTS

Ce travail de thèse a été réalisé dans l'unité INRA/INAPG de Physiologie de la Nutrition et du Comportement Alimentaire, sur un projet développé et financé par la société Bio-Springer.

Je tenais tout d'abord à remercier très chaleureusement Daniel Tomé pour m'avoir conseillé et orienté ces dernières années avant de m'accueillir dans son laboratoire pour réaliser ce travail. Je le prie de trouver ici l'expression de ma profonde gratitude et de ma respectueuse considération.

Je remercie également la société Bio-Springer pour avoir porté ce projet et en particulier Eric Oriol pour son soutien et sa motivation constante à faire aboutir ce travail. J'ai pris beaucoup de plaisir à travailler avec le personnel de cette société, en particulier avec Laurent-Michel Bonanno, Olivier Euzenat, Alain Simmoneau ainsi qu'avec l'ensemble du personnel du laboratoire R&D et de l'atelier pilote.

Je remercie Luc Pénicaud et André Jean de m'avoir fait l'honneur d'être rapporteurs de cette thèse.

J'exprime toute ma reconnaissance à Gilles Fromentin pour son encadrement et ses conseils tout au long de cette thèse. Sa contribution à ce travail est inestimable tant sur le plan scientifique que sur l'esprit dans lequel il a été réalisé. Merci d'avoir rendu ces années si riches et passionnantes et d'avoir permis qu'elles se déroulent toujours dans la bonne humeur malgré les difficultés.

Je remercie tout le personnel de l'Unité avec lequel j'ai pris énormément de plaisir à travailler, en particulier Sylvette Gougis, dont l'aide a été précieuse, Angélique, Nicolas et Mylène, ainsi que les stagiaires avec lesquels j'ai eu la chance de travailler : Sandrine, Stéphane, Sandra, Cindy, Carolina et Florence.

Je remercie chaleureusement Olivier Rampin pour sa participation à ce travail, sa disponibilité et la passion communicative qu'il a insufflé dans notre collaboration.

Je remercie Robert Benamouzig et Georges Airinei pour m'avoir accueilli au sein du Centre de Recherche sur Volontaires de l'Hôpital Avicennes et pour leurs conseils avisés et leur participation au bon déroulement des études cliniques.

Enfin, merci à tous ceux dont l'amour et l'amitié m'ont porté et ont été ma plus grande force au cours de ces années. Merci à mes parents et à Maud...

TABLE DES MATIERES

Collaborations et Remerciements	2
Table des matières.....	4
Liste des figures	8
Liste des tableaux.....	10
Liste des abbréviations.....	11
Liste des publications.....	13
Introduction générale	14
A INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE.....	16
I. Le contrôle central du comportement alimentaire.....	17
I.1 Régulation court terme / repas : le noyau du tractus solitaire (NTS)	18
I.1.1 Neuroanatomie et organisation du NTS	18
I.1.2 Activation du complexe dorsal vagal lors du repas.....	19
I.1.3 Facteurs modulant l'activation du NTS par les afférences vagales.....	20
I.1.3.1 Paramètres généraux du repas	20
I.1.3.2 Cholécystokinine (CCK)	20
I.1.3.3 Glucagon-Like-Peptide-1 (GLP-1).....	21
I.1.3.4 Autres facteurs.....	21
I.1.4 Implications des différents phénotypes de neurones du NTS dans la régulation du comportement alimentaire.	22
I.1.4.1 Neurones noradrénergiques/adrénergiques.....	22
I.1.4.1.1 Moelle ventro-latérale.....	22
I.1.4.1.2 NTS.....	23
I.1.4.2 Neurones GLP-1	24
I.1.4.3 Neurones POMC.....	26
I.2 La région hypothalamique et le contrôle de la balance énergétique.....	28
I.2.1. Le noyau arqué (ARC)	28
I.2.1.1 Neurones POMC/CART.....	28
I.2.1.1.1 Le système mélanocortique	28
I.2.1.1.2 Activation des neurones POMC/CART au sein de l'ARC.....	29
I.2.1.2 Neurones NPY/AgRP	32
I.2.1.2.1 Tonus inhibiteur des neurones NPY sur les neurones POMC.....	34
I.2.1.2.2 Action centrale des neuropeptides ou des peptides gastro-intestinaux sur les neurones NPY	34
I.2.1.3 Projections des neurones POMC/CART et NPY/AgRP et intégration de l'homéostasie énergétique.....	36
I.2.1.3.1 Projection vers le noyau paraventriculaire (PVH).....	37
I.2.1.3.2 Projection vers l'hypothalamus latéral (LH)	38
I.2.1.3.4 Projection vers le noyau du tractus solitaire (NTS) et la moelle épineière.....	39
I.2.2 L'aire hypothalamique latérale (LH).....	39
I.2.3 Les noyaux ventro- et dorso-médian de l'hypothalamus (VMH et DMH) .	41
I.3 Facteurs modulant ces régulations : exemple de l'hédonisme	42

I.3.1 Définitions des différents aspects de l'hédonisme : « learning », « liking » et « wanting ».....	43
I.3.2 Le noyau accumbens, pivot de la modulation hédonique de la régulation du comportement alimentaire	44
I.3.2.1 Liking et systèmes GABA/glutamate et opioïdes.....	44
I.3.2.2 Wanting et système dopaminergique.....	46
I.3.2.2.1 Action de la dopamine dans l'AccSh	46
I.3.2.2.2 Manger : une addiction ?	46
II. Satiété induite par les protéines : observations et hypothèses.....	48
II.1 Protéines et satiété	48
II.1.1 Effet satiétogène des régimes HP	48
II.1.2 Satiété des charges HP	49
II.1.2.1 Pertinence du modèle	49
II.2.2.2 Effet des charges HP	49
II.1.3 Effet de la nature des protéines	50
II.2 Les différentes hypothèses expliquant la réduction de la prise alimentaire induite par les protéines	51
II.2.1 Aversion gustative conditionnée et palatabilité	52
II.2.1.1 Aversion gustative conditionnée	52
II.2.1.1.1 Qu'est ce qu'une aversion gustative conditionnée ?	52
II.2.1.1.2 Aversion gustative conditionnée et régime HP	53
II.2.1.2 Palatabilité.....	54
II.2.2 Facteurs pré-absorptifs influençant l'action des protéines.....	55
II.2.2.1 Régulation du volume gastrique.....	55
II.2.2.1.1 Principes et dynamique de la vidange gastrique	55
II.2.2.1.2 Rassasiement induit par l'estomac	56
II.2.2.1.3 Régulation de la vidange gastrique par les protéines	57
II.2.2.2 Digestion stomacale et intestinale : détection des nutriments dans le duodénum.....	58
II.2.3 Facteurs post-absorptifs.....	59
II.2.3.1 La théorie aminostatique	59
II.2.3.2 La théorie glucostatique	61
II.2.4 Intégration centrale de l'action des protéines.....	62
II.3 Un cas particulier : le rôle du cortex pyriforme antérieur (CPA) dans la détection des carences en acides aminés indispensables	63
II.3.1 Rôle du CPA chez le rat	63
II.3.1.1 Influence des régimes déficients ou carencés en acides aminés indispensables sur la prise alimentaire et sur les teneurs en acides aminés centrales	63
II.3.1.2 Implication du CPA dans cette réponse anorexigène.....	64
II.3.1.3 Mécanismes de détection des AAI dans le CPA	65
II.3.2 Le cortex pyriforme antérieur chez l'Homme ?	65

B TRAVAUX PERSONNELS	68
Objectifs des travaux personnels.....	69
I. Etude de la signalisation centrale des protéines	70
I.1 Introduction et objectifs.....	70
I.2 Matériels et méthodes.....	71
I.2.1 Activation de zones du système nerveux central en réponse à des repas protéiques chez le rat	71
I.2.2 Hypothèse du cortex pyriforme antérieur comme chimio-senseur des acides aminés indispensables chez le rat	72
I.3 Résultats et interprétations.....	74
I.3.1 Activation de zones du système nerveux central suite à l'ingestion de repas protéiques chez le rat	74
I.3.2 Les lésions du CPA ne modifient pas le comportement des rats vis-à-vis des régimes hyperprotéiques ou des régimes déficients en AAI chez le rat	76
I.4 Discussion.....	77
Les protéines activent des réseaux spécifiques du NTS et de l'hypothalamus impliqués dans la régulation du comportement alimentaire.	78
Le profil d'activation du NTS confirme l'absence d'aversion gustative conditionnée associée à l'ingestion des régimes hyperprotéiques.....	80
Les protéines diminueraient l'activation des circuits centraux de l'hédonisme.	80
Le cortex pyriforme antérieur n'intervient pas dans la signalisation des protéines...	82
II. Effet des protéines et des peptides de levure sur la prise alimentaire chez le rat et chez l'homme et signalisation centrale	86
II.1 Introduction et objectifs	86
II.2 Matériels et méthodes.....	87
II.2.1 Caractérisation de l'effet satiétogène des protéines de levure chez le rat.....	87
II.2.2 Effet satiétogène des peptides de levure chez le rat et chez l'Homme	88
II.2.2.1 Détermination de l'effet de différentes fractions peptidiques.....	88
II.2.2.2 Enregistrement continu de la prise alimentaire suivant l'ingestion d'un repas contenant des peptides de levure	89
II.2.2.3 Effet d'un repas contenant des peptides de levure après habituation chez le rat	90
II.2.2.4 Effet d'un en-cas contenant des peptides de levure sur la prise alimentaire chez l'Homme.....	90
II.2.2.5 Etude des régions centrales activées par un repas contenant des peptides de levure.....	91
II.3 Résultats et interprétations	91
II.3.1 Caractérisation de l'effet satiétogène des protéines de levure chez le rat.....	91
II.3.2 Effet satiétogène des peptides de levure chez le rat et chez l'Homme	93
II.3.2.1 Description des fractions peptidiques obtenues	93
II.3.2.2 La fraction dite « B » est plus satiétogène que les autres.....	93
II.3.2.3 Le pic de l'effet satiétogène induit par les peptides de levure apparaît au bout de 3-4 heures.....	94
II.3.2.4 Les peptides de levure induisent une dépression de la prise alimentaire chez le rat comme chez l'Homme après habituation	95
II.3.2.5 Les peptides de levure activent les neurones POMC du noyau arqué	95

II.4 Discussion	97
Les protéines et peptides de levure induisent une sur satiété par rapport aux autres protéines.....	97
Satiété accrue des protéines de levure	97
Intérêt industriel des peptides de levure.....	98
Les peptides de levure réduisent de manière importante et durable la prise alimentaire.....	99
Mécanismes expliquant l'effet satiétogène des protéines et des peptides de levure.....	100
La digestion des protéines de levure génère des signaux satiétogènes.....	100
Les peptides de levure activent le système mélanocortique de l'ARC.....	101
Les protéines et peptides de levure présentent des mécanismes d'action différents.	101
D CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....	105
Conclusions.....	106
Perspectives.	107
Signalisation des protéines au niveau central.	107
Perspectives d'utilisation des peptides de levure.....	108
Bibliographie	110
Annexes	130
Annexe 1 : Présentation du Groupe LESAFFRE.....	131
Annexe 2 : Résultats annexes des protéines et peptides de levure.	131
Annexe 3 : Remarque méthodologique : investigation de l'implication d'une région ou d'un groupe de neurones dans le comportement alimentaire.	133

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Position du NTS, AP et VLM chez le rat.

Figure 2 : Coupe sagittale d'un cerveau de rat décérébré.

Figure 3 : Synthèse du GLP-1 à partir du proglucagon.

Figure 4 : Corrélacion entre l'effet anorexigène de la CCK et le nombre de neurones noradrénergiques du NTS.

Figure 5 : Position des noyaux DMH, VMH et ARC chez le rat.

Figure 6 : Action de la leptine sur les neurones POMC et NPY.

Figure 7 : Représentation des récepteurs court (OB-RS) et long (OB-RL) à la leptine.

Figure 8 : Cascade de réactions suivant l'activation du récepteur à la leptine.

Figure 9 : Mécanisme intracellulaire de résistance à la leptine.

Figure 10 : Voies de signalisation intracellulaires suivant l'activation des récepteurs à la leptine et à l'insuline.

Figure 11 : Modulation des neurones POMC et NPY par les afférences sérotoninergiques.

Figure 12 : Effets opposés de la ghréline et du PYY sur les neurones POMC et NPY.

Figure 13 : Localisation des corps cellulaires des neurones ghréline dans l'hypothalamus.

Figure 14 : Position du LH et du PVH chez le rat.

Figure 15 : Principales projections des neurones de l'ARC.

Figure 16 : Schéma illustrant la théorie de l'adipostat au sein du PVH.

Figure 17 : Divergence des voies mélanocortiques concernant la prise alimentaire et la dépense énergétique.

Figure 18 : Position des noyaux accumbens et du cortex pyriforme antérieur chez le rat.

Figure 19 : Principaux circuits de l'hédonisme.

Figure 20 : Dépression de la prise alimentaire induite par une charge protéique par rapport à une charge glucidique.

Figure 21 : Dépression de la prise alimentaire induite par un régime hyperprotéique.

Figure 22 : Schéma résumé de l'action des protéines sur le NTS.

Figure 23 : Détermination de la vitesse de la séquence comportementale de satiété (BSS).

Figure 24 : Séquence comportementale de satiété sous régime hyperprotéique.

Figure 25 : Interaction leucine/mTOR dans les neurones de l'ARC.

Figure 26 : Effet d'une lésion électrolytique du CPA sur la détection des régimes déficients en AAI.

Figure 27 : Emplacement des lésions fonctionnelles du CPA chez le rat.

Figure 28 : Effets d'une lésion électrolytique du CPA sur la détection des régimes hyperprotéiques.

Figure 29 : Mécanisme intracellulaire de détection des carences en AAI.

Figure 30 : Activation du CPA par un régime Thr-Dev

Figure 31 : Activation c-fos du VMH et du DMH par un repas hyperprotéique.

Figure 32 : Activation de différentes régions du CNS en régime hyperprotéique.

Figure 33 : Procédés d'obtention des trois fractions peptidiques à partir des protéines de levure.

Figure 34 : Protocole alimentaire suivi par les animaux dans l'article 3.

Figure 35 : Chromatogrammes des différentes étapes de purification des peptides.

Figure 36 : Consommation relative une heure après l'ingestion de charges normo (A) ou hyperprotéiques (B) des différents peptides de levure testés.

Figure 37 : Consommation relative trois heures après l'ingestion de charges normo (A) ou hyperprotéiques (B) des différents peptides de levure testés.

Figure 38 : Evolution de la consommation cumulée pendant la première heure suivant l'ingestion d'une charge de peptides de levure ou de protéines de lait.

Figure 39 : Evolution de la consommation cumulée pendant toute la journée suivant l'ingestion d'une charge de peptides de levure ou de protéines de lait.

Figure 40 : Activation du NTS suivant un repas normoprotéique de levure.

Figure 41 : Schéma récapitulatif de l'activation du CNS par un repas hyperprotéique.

Figure 42 : Schéma récapitulatif de l'activation du CNS par un repas de peptides de levure.

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Dépression de la prise alimentaire induite par un en-cas hyperprotéique par rapport à un en-cas hyperlipidique.

Tableau 2 : Activation des neurones GABA et μ -opioïdes de l'AccSh suite à un repas hyperprotéique.

Tableau 3 : Consommation d'eau pendant et avant l'ingestion d'une charge hyperprotéique de levure ou de lait.

Tableau 4 : Paramètres de consommation des 15 premières minutes suivant l'ingestion d'une charge de peptides de levure ou de protéines de lait.

LISTE DES ABBREVIATIONS

(p)elF2 α :	Facteur d'initiation eukaryote α (phosphorylé)
(p)STAT3 :	Signal transducer and activator of transcription 3 (phosphorylé)
A :	Adrénaline
AA :	Acide aminé
AAI :	Acide aminé indispensable
AccCo :	Noyau accumbens central
AccSh :	Coque du noyau accumbens
ACTH :	Hormone adrénocorticotrophique
AGC :	Aversion Gustative Conditionnée
AgRP :	Agouti-gene Related Peptide
AMPA :	α -amino-3-hydroxi-5-methyl-4-isozazole propionate (récepteur au glutamate)
AP :	Area postrema
ARC :	Noyau arqué de l'hypothalamus
BSS :	Séquence comportementale de satiété
CART :	Cocaine and Amphetamine Releasing Hormone
CCK :	Cholécystokinine
CeA :	Noyau central de l'amygdale
CNS :	Système Nerveux Central
CPA :	Cortex pyriforme antérieur
CPP :	Cortex pyriforme postérieur
CRH :	Corticotropin Releasing Hormone
DAB :	3-3' diaminobenzidine tétrahydrochlorique
DMH :	Hypothalamus dorso-médian
DMX :	Noyau moteur dorsal du vague
DVC :	Complexe vagal dorsal
d β H :	Dopamine- β -Hydroxylase
EAAC1 :	Excitatory amino acid carrier 1 (Transporteur au glutamate)
G/E :	Energie ingérée sous forme de glucides p/r à la prise énergétique totale
GABA :	Acide γ -aminobutyrique
GCN2 :	General amino acid nondepressing kinase 2
GFP :	Green fluorescent protein
GLP-1 :	Glucagon-like-peptide-1
HP :	Hyperprotéique
k-o :	Knock out
LH :	Aire hypothalamique latérale
LiCl :	Chlorure de lithium
LRb :	Récepteur à la leptine B
MC3/4-R :	Récepteur à l' α -MSH de type 3 ou 4
MCH :	Melanin Concentrating Hormone
mTOR :	Mammalian target of rapamycin
NA :	Noradrénaline
NMDA :	N-methyl-D-aspartate
NP :	Normoprotéique
NPY :	Neuropeptide Y
NTS :	Noyau du tractus solitaire

P/E :	Energie ingérée sous forme de protéines p/r à la prise énergétique totale
P14 :	Régime contenant 14% de protéines totales de lait
P55 :	Régime contenant 55% de protéines totales de lait
PAF :	Paraformaldéhyde
PBN :	Noyau parabrachial
PC :	Cortex pyriforme
PirF :	Cortex pyriforme frontal
PirT :	Cortex pyriforme temporal
POMC :	Pro-opiomélanocortine
PVH :	Noyau paraventriculaire de l'hypothalamus
PYY :	Peptide YY
SOCS-3 :	Suppresseur de cytokine 3
TRH :	Tyrosine Releasing Hormone
VLM :	Moelle ventro-latérale
VMH :	Hypothalamus ventro-médian
MTA :	Aire tegmental ventrale
α -MSH :	Alpha-Melanocortin Stimulating Hormone

LISTE DES PUBLICATIONS

Faipoux R., Tomé D., Bensaid A., Morens C., Oriol E., Bonanno L.M et Fromentin G.
Yeast proteins enhance satiety in rats. *The Journal of Nutrition*. 2006 Sept; 136 (9): 2350-2356.

Faipoux R., Tomé D., Benamouzig R., Oriol E., Laurent Bonanno L.M et Fromentin G.
Yeast peptides induce satiety in rats and humans and activate hypothalamic pathways involved in satiety in rats. *International Journal of Obesity*, soumis.

Faipoux R., Tomé D., Gougis S., Darcel N. et Fromentin G.
Proteins activate satiety related neuronal pathways in the brainstem and hypothalamus of rats. *The Journal of Nutrition*, soumis.

Faipoux R., Tomé D., Rampin O., Gougis S., Morens C. et Fromentin G.
Electrolytic or exocytotoxic lesions of the CPA do not impair high protein and threonin-devoid diets in rats. *The Journal of Nutrition*, à soumettre.

INTRODUCTION GENERALE

Cette thèse est le fruit d'un partenariat entre l'entreprise Bio-Springer et l'UMR 914 INRA/INAP-G. Ce travail se situe dans le cadre de l'analyse du rôle des protéines dans l'induction de la satiété et s'intéresse plus particulièrement aux propriétés satiétogènes induites par des extraits de protéines de levure. Nous avons essayé de relier les effets sur la prise alimentaire aux mécanismes centraux impliqués dans son contrôle.

L'obésité, ainsi que l'ensemble des dysfonctionnements physiologiques qui lui sont associés, est devenue au cours des dernières décennies un problème important de santé publique, et sa prévalence ne cesse d'augmenter, dans les pays occidentaux comme dans les pays en voie de développement. Ainsi, l'organisation mondiale de la santé dénombrait 200 millions d'obèses (dont l'indice de masse corporelle excède 25) en 1995, et estime aujourd'hui ce nombre à plus de 300 millions, dont 115 millions vivaient dans les pays en voie de développement. Ces chiffres ne devraient pas diminuer dans les prochaines années, avec la progression exponentielle du nombre d'obèses dans des pays comme que la Chine.

Cette « pandémie » résulte principalement de deux phénomènes : l'augmentation de l'offre alimentaire, en particulier de produits manufacturés riches en sucres simples et en lipides, au détriment de l'alimentation traditionnelle généralement plus équilibrée, à laquelle s'ajoute la diminution de l'activité physique liée à la sédentarisation. L'augmentation de la masse grasse dans des proportions trop importantes entraîne de nombreuses complications (maladies cardio-vasculaires, diabètes insulino-dépendants, cancers, etc...) qui provoquent de nombreux décès : aux Etats-Unis, 17% de la totalité des décès résultent ainsi de pathologies liées à l'obésité. La régulation de la prise énergétique est donc devenue une réelle question de santé publique, dans laquelle les pouvoirs publics semblent vouloir s'investir de plus en plus, en raison de l'explosion des coûts de santé liée à cette pandémie (estimés en France à 3.3 milliards d'euros en 2002 et aux Etats-Unis à près de 100 milliards de dollars), comme l'attestent les récentes campagnes menées par le Plan National Nutrition et Santé (PNNS) ainsi que les nouvelles réglementations obligeant la présence de recommandations nutritionnelles dans toute publicité sur des produits alimentaires.

L'obésité (à l'exception de très rares cas de maladies génétiques) résulte d'un déséquilibre entre les apports et les dépenses énergétiques. La modernisation de la société,

occidentale ou non, ayant profondément modifié le niveau des dépenses énergétiques moyennes des populations de manière a priori irréversible, le contrôle de la prise alimentaire est un des leviers sur lequel il est possible de jouer pour tenter de rééquilibrer la balance énergétique. Il semble donc intéressant, dans le but de prévenir une croissance de la prévalence de l'obésité, de réduire les apports énergétiques. La mise sur le marché de produits coupe-faim ou augmentant les sensations de satiété représente donc un axe de développement de nouveaux produits importants pour l'industrie agro-alimentaire.

Dans cette optique, la société Bio-Springer, filiale du groupe Lesaffre, leader mondial de la production de levure (**Annexe 1**), s'est fortement intéressée à l'élaboration de produits à base de protéines ou de peptides de levure, qui présenteraient un effet satiétogène important. La satiété induite par les protéines a déjà été régulièrement décrite et il semble à peu près admis qu'à charge énergétique équivalente les protéines sont plus efficaces que les autres macronutriments, glucides et lipides, pour induire la satiété. Cependant, les mécanismes à l'origine de cet effet des protéines restent peu clairs, et il n'est pas non plus précisément démontré l'existence de différence selon la source protéique. L'objectif principal de mes travaux a donc été d'étudier les conséquences de l'ingestion de protéines, et en particulier de peptides de levure, sur la prise alimentaire. Nous avons comparé l'effet sur la satiété des protéines de levure avec l'effet de protéines témoins plus classiques (comme les protéines totales de lait). Nos résultats vont dans le sens d'une action plus efficace des protéines de levure. Un certain nombre de mécanismes sont susceptibles d'être à l'origine de cet effet particulier des protéines de levure et nous nous sommes donc intéressés à la mesure de l'activation de régions cérébrales connues pour être impliquées dans la signalisation des nutriments et donc dans la régulation du comportement alimentaire en réponse à des repas protéiques.

A INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

La **satiété** est définie comme l'absence de faim ou plus exactement de motivation alimentaire, qui caractérise les périodes interprandiales (Gerstein *et al.*, 2004). Elle a souvent été distinguée du **rassasiement**, qui désigne l'ensemble des mécanismes qui mettent fin à l'ingestion d'un aliment ou d'un repas. La satiété induite par un repas peut être décrite de façon comportementale par l'intervalle de temps séparant ce repas de la sensation de **faim** déclenchant le début du repas suivant, et/ou par la quantité énergétique ingérée lors de ce second repas. Booth et Thibaut (Booth & Thibaut, 2000) contestent les conséquences de la distinction faite entre les termes de rassasiement et de satiété, rappelant qu'ils viennent tous deux de la même racine « to sate », cesser ou rassasier ou satisfaire un appétit. Le rassasiement et la satiété correspondraient alors plus à deux facettes d'un même processus continu d'intensité variable au cours du temps en fonction de la nature du repas, du contexte de ce repas, des habitudes alimentaires, et de l'individu. L'état rassasié commencerait dès le début du repas, augmenterait et s'amplifierait après le repas. On passerait de la satiété à la faim lorsque le besoin métabolique de l'organisme ne serait plus satisfait par les nutriments disponibles dans l'organisme.

Cette partie bibliographique porte dans une première partie sur les régions et les réseaux de neurones du système nerveux central impliqués dans la détection des nutriments et le contrôle de la prise alimentaire et dans une deuxième partie sur l'étude des travaux menés sur la caractérisation de l'effet satiétogène des protéines et des acides aminés en général. Un problème particulier concerne en outre le rôle du cortex pyriforme antérieur dans la détection des carences en acides aminés indispensables.

I. Le contrôle central du comportement alimentaire

Le contrôle du comportement alimentaire sollicite au sein du système nerveux central (SNC) des mécanismes qui dépendent du degré de proximité des neurones avec l'aliment. Smith (Smith, 1996) a ainsi donné une classification de ces voies de contrôle de la prise alimentaire en distinguant les voies de contrôle directes, qui sont en contact direct avec les aliments, des voies indirectes, qui ne le sont pas. Les projections provenant des récepteurs oraux, olfactifs, sensoriels, chémorécepteurs, mécanorécepteurs, thermorécepteurs,... vont

stimuler les voies directes au niveau du SNC et moduler la taille du repas (rassasiement) selon la balance des messages activateurs et/ou inhibiteurs au niveau des centres intégrateurs. Le contrôle indirect est sous l'influence de signaux qui ne sont pas en contact avec l'aliment mais qui agissent tout de même sur les noyaux régissant le comportement alimentaire. Il existe plusieurs catégories de signaux du contrôle indirect, les principaux étant ceux d'ordre rythmique (nyctémère, taux d'oestrogène, ...), métabolique (insulinémie, taux d'acide gras circulant, leptinémie, ...), thermique (environnement externe, fièvre), conditionné (préférence, aversion, satiété), cognitif (environnement socioculturel) et écologique (disponibilité alimentaire). La somme des informations collectées au niveau des différents circuits neuronaux aboutit alors à un comportement alimentaire coordonné.

I.1 Régulation court terme / repas : le noyau du tractus solitaire (NTS)

Le noyau du tractus solitaire (NTS) constitue le principal point d'entrée du nerf vague (X) dans le système nerveux central et reçoit ainsi des projections afférentes depuis la majeure partie des organes de l'appareil gastro-intestinal. En outre, il reçoit certaines afférences des nerfs crâniens I, II, V, VII, IX qui véhiculent, depuis la sphère orosensorielle, de nombreuses informations relatives à la texture, au goût, à l'odeur, à l'aspect et à la palatabilité des aliments. Il a été récemment montré que certaines informations quant à la composition en macronutriments des aliments pouvaient être détectées par des récepteurs spécifiques dans la langue au cours du repas (Nelson *et al.*, 2002, Laugerette *et al.*, 2005) et donc rejoindre le NTS par ces voies. Le NTS constitue donc un centre privilégié pour l'intégration de toutes les informations liées au repas.

I.1.1 Neuroanatomie et organisation du NTS

Le noyau du tractus solitaire (NTS) est un noyau rhombencéphalique situé dans la partie dorso-médiane du bulbe rachidien (**Figure 1**). Un découpage selon l'axe antéropostérieur permet de définir des régions du NTS selon la branche du nerf vague ou des autres nerfs crâniens concernés. Un premier découpage permet de définir trois régions en fonction de la présence ou non de l'area postrema (AP) : caudale en arrière du début de l'AP, centrale quand l'AP est présente, rostrale après l'ouverture du canal central et la disparition de l'AP. La distribution rostrocaudale du NTS correspond en réalité assez bien à celle des organes concernés (Altschuler *et al.*, 1989). Ainsi, la partie la plus rostrale reçoit les afférences en

provenance de la sphère orosensorielle (palais, larynx, pharynx) et la partie la plus caudale les afférences en provenance des branches hépatique et coeliaque. Pour la partie commune avec l'AP, les distributions sont plus diffuses, et contiennent la majorité des projections en provenance de l'estomac et des intestins (Norgren & Smith, 1988).

I.1.2 Activation du complexe dorsal vagal lors du repas

Le complexe dorsal vagal comprend le NTS, l'AP ainsi que le noyau moteur dorsal du vague (DMX). Ces trois régions sont fortement interconnectées, et leur activation est généralement commune lors d'un repas (Rinaman *et al.*, 1998, Emond *et al.*, 2001b). Ainsi, le NTS reçoit les informations nerveuses en provenance de l'appareil gastro-intestinal qu'il transmet vers d'autres régions centrales, ou élabore une réponse qui est ensuite retransmise par exemple par le nerf vague, mais cette fois-ci dans un rôle moteur à travers le DMX. L'AP, grâce à une barrière hémato-encéphalique perméable (McKinley *et al.*, 2003), est sensible aux nutriments circulants et répercute les informations directement vers le NTS grâce à des projections très denses (Cunningham *et al.*, 1994). Ce complexe est donc en mesure d'intégrer les différents paramètres relatifs au repas et d'établir une réponse de manière autonome.

Ainsi, de nombreuses études, utilisant le modèle de rats décérébrés (dont toutes connexions autres qu'humorales entre l'avant et l'arrière du cerveau ont été abolies) (**Figure 2**), ont mis en évidence la capacité du complexe vagal dorsal à réguler, à l'échelle d'un repas, la prise alimentaire sans aucune intervention du reste du système nerveux central et en particulier de la région hypothalamique. Les rats décérébrés régulent alors leur prise alimentaire à court terme, et leur comportement n'est pas modifié par rapport aux rats témoins suite à une injection de CCK (Grill & Smith, 1988) ou d'insuline (Flynn & Grill, 1983), ou lors de l'utilisation du paradigme de « sham feeding »ⁱ (Grill & Kaplan, 1992), montrant la capacité du bulbe rachidien à réguler de manière indépendante la consommation énergétique lors d'un repas (Grill & Kaplan, 2001, Grill & Kaplan, 2002). En revanche, les rats décérébrés sont d'une part incapables d'initier un repas et d'autre part de compenser un jeun forcé par une surconsommation (Kaplan *et al.*, 1993), montrant l'implication d'autres régions dans la régulation du comportement alimentaire à moyen et à long terme. Le complexe vagal dorsal

ⁱ Le sham feeding désigne un procédé expérimental dans lequel l'animal mâche et avale un aliment mais ne le digère pas grâce à canule une placée au niveau de l'œsophage ou à l'entrée de l'estomac. Ce procédé permet d'étudier l'impact des informations générées par la sphère orosensorielle par rapport aux informations générées par le tractus digestif.

peut donc assurer à lui tout seul le contrôle direct de la prise alimentaire, mais les connections entre l'avant et l'arrière du cerveau sont nécessaires pour le contrôle indirect (Smith, 1996).

I.1.3 Facteurs modulant l'activation du NTS par les afférences vagales

I.1.3.1 Paramètres généraux du repas

Hormis les informations relatives aux propriétés orosensorielles des aliments, le NTS intègre les signaux pré absorptifs transmis par le nerf vague. Il est naturellement activé lors d'un repas, si celui ci est suffisamment rassasiant (Rinaman *et al.*, 1998, Emond *et al.*, 2001b), mais également suite aux différents types de stimuli conduisant à la satiété durant un repas (Powley & Phillips, 2004). Il est ainsi activé par une augmentation du volume gastrique (Traub *et al.*, 1996, Willing & Berthoud, 1997, Rinaman *et al.*, 1998) dans sa partie la plus rostrale (Vrang *et al.*, 2003). Il est également sensible aux infusions de nutriments dans le duodénum (Zittel *et al.*, 1994, Phifer & Berthoud, 1998) et la nature des nutriments ingérés a une influence sur son activation (Zittel *et al.*, 1994, Phifer & Berthoud, 1998, Yamamoto & Sawa, 2000b, Yamamoto & Sawa, 2000a). Dans le cas général, les protéines possèdent le taux d'activation le plus faible, et les sucres simples le plus important. Les afférences vagales contiennent également des récepteurs pour un grand nombre de peptides ou hormones secrétés durant la digestion, qui activent ou inhibent le nerf vague et donc le NTS par voie de conséquence. Nous pouvons cependant noter que les neurones du NTS possèdent en général des récepteurs pour ces mêmes peptides ou hormones, leur permettant d'agir également par voie humorale.

I.1.3.2 Cholécystokinine (CCK)

La cholecystokinine est produite par les cellules entéroendocrines de l'intestin durant le repas. Sa production constitue le signal de rassasiement par excellence, et son administration périphérique est à l'origine d'une forte réduction de la prise alimentaire (Gibbs *et al.*, 1973a). L'action anorexigène de la CCK s'effectue à plusieurs niveaux. Elle inhibe la vidange gastrique (McCann *et al.*, 1989, Schwartz *et al.*, 1993), ce qui augmente le rassasiement (Powley & Phillips, 2004). En outre, elle agit de façon paracrine sur les terminaisons des afférences vagales et les active (Schwartz *et al.*, 1991). Le NTS est alors sensible à l'administration de CCK (Zittel *et al.*, 1999) à travers les récepteurs CCK-1 (Wang *et al.*, 1999,

Glatzle *et al.*, 2001) dont l'effet est d'ailleurs potentialisé par la leptine (Emond *et al.*, 1999, Emond *et al.*, 2001a).

Les protéines induisent une augmentation plasmatique de la CCK (Blom *et al.*, 2006, Bowen *et al.*, 2006b) et peuvent activer le nerf vague par ce biais (Raybould, 1991, Liddle, 1995). Le nerf vague n'est cependant pas indispensable à cet effet, la CCK pouvant agir directement de manière centrale (Reidelberger *et al.*, 2004). Cette action centrale fournirait d'ailleurs une explication au maintien de l'effet anorexigène des régimes HP après vagotomie sub-diaphragmatique (L'Heureux-Bouron *et al.*, 2003).

I.1.3.3 Glucagon-Like-Peptide-1 (GLP-1)

Le GLP-1 est une hormone dérivée du proglucagon, produite par clivage avec le glucagon au niveau du pancréas, de l'intestin grêle et du système nerveux central (Kieffer & Habener, 1999) (**Figure 3**). Sa libération périphérique lors du repas réduit la prise alimentaire chez le rat (Chelikani *et al.*, 2005) et chez l'Homme (Verdich *et al.*, 2001), tout comme son injection centrale (Turton *et al.*, 1996).

L'action anorexigène du GLP-1 lors du repas résulte de plusieurs mécanismes parmi lesquels les plus importants sont une inhibition de la vidange gastrique (Nauck *et al.*, 1997) et une augmentation de la sécrétion d'insuline (Kreyman *et al.*, 1987, Mojsov *et al.*, 1987).

Chez l'homme, l'ingestion d'une charge riche en protéines entraîne une augmentation de la concentration plasmatique en GLP-1, plus importante que celle observée après une charge riche en glucides (Blom *et al.*, 2006, Bowen *et al.*, 2006a). Le pic de concentration plasmatique en GLP-1 apparaît plus tardivement après la charge riche en protéines, ce qui aboutit au maintien d'une concentration plus élevée plus longtemps. La nature des protéines pourrait également influencer le profil postprandial de GLP-1 : par exemple, les protéines de lactosérum entraînent une augmentation plus importante des teneurs plasmatiques de GLP-1 que les caséines (Hall *et al.*, 2003).

I.1.3.4 Autres facteursⁱⁱ

Divers autres neuropeptides induisent une dépression de la prise alimentaire au niveau du NTS, comme le peptide CART (Aja *et al.*, 2001, Smedh & Moran, 2003).

Deux autres peptides gastro-intestinaux, la ghréline et le PYY, ont une action importante sur le NTS. Le complexe vagal dorsal présente en effet de nombreux récepteurs à la

ⁱⁱ Le cas particulier de la leptine sera abordé dans la partie I.1.4.3.

ghréline, tout comme le nerf vague (Guan *et al.*, 1997) et l'injection centrale de ghréline induit une augmentation de la prise alimentaire similaire si elle est réalisée au niveau du complexe vagal dorsal ou de l'hypothalamus (Faulconbridge *et al.*, 2005). En outre, une vagotomie supprime l'effet orexigène d'une injection périphérique de ghréline (Date *et al.*, 2002). Cette région, qui possède de très abondantes projections vers l'hypothalamus et le noyau arqué (ARC) en particulier (Jobst *et al.*, 2004), servirait alors de relais en activant directement les neurones NPY/AgRP ou en activant les neurones ghréline présents dans cette région.

Le relais que représente le NTS vers d'autres régions du CNS, comme le noyau arqué, semblerait également important dans le cas du PYY (3-36), même si les expériences menées jusqu'alors sont controversées. Une vagotomie abolirait en effet l'effet anorexigène de l'injection périphérique de PYY mais surtout atténuerait fortement l'activation c-fos des neurones pro-opiomélanocortine (POMC) de l'ARC (Koda *et al.*, 2005), montrant que l'action du PYY sur ces neurones passerait préférentiellement par la connexion NTS-ARC plutôt que par l'activation directe des récepteurs Y2 au niveau des neurones POMC et NPY de l'ARC. Cette expérience est cependant en contradiction avec d'autres études montrant qu'une vagotomie n'affecte pas les propriétés anorexigènes du PYY (Halatchev & Cone, 2005) et que le PYY est capable de toucher les neurones du NTS par voie humorale (Hernandez *et al.*, 1994), et serait donc susceptible d'activer le NTS sans activation du nerf vague.

Malgré un grand nombre de stimuli potentiellement orexigènes ou anorexigènes, seules quelques populations de neurones assez bien définies ont été identifiées comme jouant un rôle prépondérant dans la régulation du comportement alimentaire.

I.1.4 Implications des différents phénotypes de neurones du NTS dans la régulation du comportement alimentaire.

I.1.4.1 Neurones noradrénergiques/adrénergiques

Au niveau du bulbe rachidien, deux populations de neurones noradrénergiques/adrénergiques présentent des projections fortement impliquées dans la signalisation des nutriments lors du repas.

I.1.4.1.1 Moelle ventro-latérale

Dans la partie ventro-médullaire du bulbe (**Figure 1**), la moelle ventro-latérale (VLM) comporte de très nombreux neurones catecholaminergiques, divisés en 3 groupes : A1, A1/C1

et C1 (les groupes A comprennent majoritairement des neurones noradrénergiques, les groupes C des neurones adrénérgiques).

Une grande partie des neurones des groupes A1 et A1/C1 et la partie la plus caudale du groupe C1 projettent vers le noyau paraventriculaire de l'hypothalamus (PVH), et en particulier vers la partie parvocellulaire, comme l'ont montré les études de traçages antérogrades et rétrogrades (Sawchenko & Swanson, 1982b, Cunningham *et al.*, 1990). Ces groupes projettent également vers d'autres régions de l'hypothalamus, en particulier le noyau supraoptique (Swanson *et al.*, 1981, Cunningham & Sawchenko, 1988) ainsi que le noyau préoptique médian (Tucker *et al.*, 1987). En outre, une partie totalement distincte de C1 (la plus rostrale) projette vers la corde spinale (Sawchenko & Swanson, 1982a, Tucker *et al.*, 1987, Ritter *et al.*, 2001).

Les projections de ces zones vers le PVH sont impliquées dans des comportements orexigènes, comme l'atteste la très forte co-localisation de ces neurones avec le neuropeptide Y (Everitt *et al.*, 1984, Sawchenko *et al.*, 1985), un des plus puissants orexigènes du système nerveux (Williams *et al.*, 2004). Ces neurones sont par exemple activés dans le cas d'une privation de glucose (Ritter *et al.*, 1998, Ritter *et al.*, 2001, Hudson & Ritter, 2004), phénomène facilité par la proximité de nombreux neurones gluco-sensibles (Ritter *et al.*, 2000). La connexion vers le PVH est alors indispensable à une hausse compensatoire de la prise alimentaire, alors que celle vers la corde spinale permet une activation de la néo-glucogénèse (Ritter *et al.*, 2001). Ces neurones sont inactifs lors de stimulations mécaniques gastriques ou lors de l'ingestion d'un repas (Rinaman *et al.*, 1998), contrairement aux groupes catecholaminergiques du NTS.

I.1.4.1.2 NTS

Les neurones noradrénergiques/adrénergiques du NTS (A2 et C2) sont activés suite aux stimulations mécaniques qui surviennent durant un repas (Willing & Berthoud, 1997, Rinaman *et al.*, 1998, Rogers *et al.*, 2003) et participent ainsi aux conséquences anorexigènes de ces stimulations (Rinaman, 2003).

Ces neurones projettent largement, tout comme les neurones du VLM, vers le PVH (Sawchenko & Swanson, 1982b, Sawchenko & Swanson, 1982a, Cunningham & Sawchenko, 1988, Cunningham *et al.*, 1990). En revanche, l'implication exacte de ces neurones dans des mécanismes orexigène ou anorexigène est ambiguë et controversée. En particulier, la participation de ces neurones dans la réponse à la CCK est encore peu claire.

Le bulbe rachidien répond de manière autonome à la CCK. En effet, les rats décérébrés présentent une réponse inchangée à la CCK (Grill & Smith, 1988). Par contre, la lésion des neurones A2/C2 entraîne une perte de l'effet anorexigène d'une injection de CCK, proportionnelle au nombre de neurones lésés (Rinaman, 2003) (**Figure 4**). Des rats lésés de cette manière depuis le PVH présentent néanmoins une réponse intacte à la CCK, montrant que la connexion NTS-PVH n'est pas impliquée (Ritter *et al.*, 2001). Cependant, seule la moitié des neurones de A2/C2 est alors lésée (Ritter *et al.*, 2001, Hudson & Ritter, 2004) et les neurones A2 ne sont pas activés lors d'une privation de glucose (Ritter *et al.*, 1998). Ainsi, environ la moitié des neurones A2 (ceux qui ne projettent pas vers le PVH) est indispensable à la médiation de l'effet de la CCK au niveau du NTS. Ces neurones pourraient projeter vers d'autres régions hypothalamiques impliquées dans la régulation du comportement alimentaire (Ter Horst *et al.*, 1989) ainsi que vers d'autres régions du bulbe rachidien, en particulier le VLM (Sawchenko & Swanson, 1982b).

Les neurones C2 projetant vers le PVH assurent comme pour les groupes A1, A1/C1 et C1 des fonctions orexigènes, et sont impliqués dans la réponse suite à une privation de glucose (Ritter *et al.*, 1998, Ritter *et al.*, 2001). De plus et contrairement aux neurones A2, les neurones C2 présentent une très forte co-localisation avec le NPY (Sawchenko *et al.*, 1985), confirmant l'effet orexigène des messages véhiculés par ces neurones C2.

Il semblerait également que la ghréline périphérique, autre puissant orexigène, augmente les teneurs en ARNm de la dopamine- β -hydroxylase (enzyme responsable de la conversion de la dopamine en noradrénaline) parmi les neurones du groupe A2 ainsi que la teneur en noradrénaline dans le noyau arqué au niveau des neurones NPY (Date *et al.*, 2006).

Les neurones A2 jouent donc un rôle à la fois anorexigène à travers leur rôle indispensable dans la baisse de prise alimentaire induite par la CCK et un rôle orexigène dans le cas des projections vers le PVH. Il est donc difficile de discriminer parfaitement au sein de cette zone le rôle des neurones noradrénergiques/adrénergiques.

I.1.4.2 Neurones GLP-1

Au sein du NTS, les neurones utilisant le GLP-1 comme neuromédiateur jouent un rôle prépondérant dans le comportement alimentaire. Le GLP-1 est produit, au niveau du CNS, uniquement dans le bulbe rachidien (Larsen *et al.*, 1997, Kieffer & Habener, 1999). Les neurones GLP-1 co-localisant parfaitement avec les neurones GLP-2 au niveau du NTS (Vrang

et al., 2003), nous emploierons par abus de langage le terme de neurones GLP-1 pour désigner l'ensemble des neurones GLP1/2 du NTS.

Il convient de distinguer l'action des GLPs en tant qu'hormone, agissant à la fois au niveau périphérique et central, des réseaux de neurones utilisant le GLP-1 en tant que neuromédiateur. L'action du GLP-1 en tant que peptide intestinal a fait l'objet de nombreuses recherches et nous avons évoqué son rôle précédemment. Au niveau central, et en particulier dans le NTS, le rôle des neurones GLP-1 diffère légèrement de son rôle hormonal. Sa fonction est toujours fortement anorexigène, mais avec composante aversive.

Ainsi, l'étude des phénomènes de « malaises viscéraux » induits par l'ingestion d'aliments toxiques, qui se traduit par une forte anorexie vis-à-vis de ces aliments, a permis de mettre en évidence le rôle des neurones GLP-1 du NTS dans cette anorexie. L'injection de GLP-1 dans le 3^{ème} ventricule entraîne en effet une baisse de consommation très similaire à celle induite par une injection de chlorure de lithium (LiCl) (Thiele *et al.*, 1997) et active les neurones GLP-1 du NTS (Rinaman, 1999b). Le LiCl est une molécule fortement anorexigène (McCann *et al.*, 1989) qui induit une aversion gustative conditionnée (Thiele *et al.*, 1997). L'injection d'un antagoniste du GLP-1 (exendine) abolit cette anorexie ainsi que celle induite par le LiCl (Rinaman, 1999a, Seeley *et al.*, 2000), et diminue fortement l'activation c-fos du NTS suite à une injection de LiCl. De plus, les neurones GLP-1 du NTS sont mis en jeu dans un grand nombre de stimuli associés à des phénomènes aversifs, comme l'administration de lipopolysaccharides (Rinaman, 1999b, Grill *et al.*, 2004), de doses aversives de CCK (Rinaman, 1999b), ou de distension gastrique nociceptive (Vrang *et al.*, 2003). Dans le cas des lipopolysaccharides, il a été montré que le site d'action était bien situé dans le bulbe rachidien et non dans la région hypothalamique (Grill *et al.*, 2004). Ces différents éléments montrent donc le rôle primordial des neurones GLP-1 du NTS dans la médiation de l'aversion gustative conditionnée.

En outre, les neurones GLP-1 du NTS projettent directement vers le noyau central de l'amygdale (CeA), une zone centrale qui possède un très fort taux de récepteur au GLP-1 (Goke *et al.*, 1995). Le CeA est indispensable dans la mise en place d'aversion gustative conditionnée (Aja *et al.*, 2000) et est fortement activé par une injection de LiCl (Yamamoto *et al.*, 1992, Spencer & Houpt, 2001). L'injection de GLP-1 au niveau du CeA entraîne une aversion gustative conditionnée (Kinzig *et al.*, 2002) mais pas d'anorexie, indiquant que le CeA est le site responsable de la composante d'apprentissage du conditionnement et non le site

effecteur de l'anorexie. Elle produit également une hausse du niveau d'anxiété chez le rat, qui est réversible suite à l'injection d'un antagoniste du GLP-1 (Kinzig *et al.*, 2003). Les noyaux GLP-1 projettent également indirectement vers le CeA par le biais du noyau parabrachial (PBN) (Herbert *et al.*, 1990, Jia *et al.*, 1994, Rinaman, 2003). Or le PBN est une zone fortement impliquée dans l'installation d'aversion gustative conditionnée (Fromentin *et al.*, 2000), et elle est fortement activée par une injection de LiCl (Yamamoto *et al.*, 1992), activation qui est abolie par l'administration d'exendine. Les projections des neurones GLP-1 confirment donc le rôle de ces neurones dans la réponse à des stimuli aversifs.

A faible dose, il est cependant pressenti que les neurones GLP-1 du NTS seraient également impliqués dans la satiété (Vrang *et al.*, 2003). Ce rôle est supporté par les projections de ces neurones vers d'autres régions du CNS. Les neurones GLP-1 du NTS sont des neurones non catécholaminergiques (Larsen *et al.*, 1997) et certains de ces neurones projettent vers le PVH (Larsen *et al.*, 1997, Rinaman, 1999b). Le rôle de ces neurones est cependant controversé. Ainsi, l'injection de GLP-1 dans le PVH ne produit pas d'aversion gustative conditionnée (McMahon & Wellman, 1998), alors que des injections de LiCl activent la majorité des neurones GLP-1 du NTS dont ceux projetant spécifiquement vers le PVH (Rinaman, 1999b). Même si ces neurones ne sont pas uniquement impliqués dans des phénomènes aversifs, il est probable qu'ils participent tout de même à la réponse anorexigène associée.

En conclusion, une modulation assez flexible des neurones GLP-1 du NTS permettrait à la fois de favoriser une anorexie liée à une aversion gustative conditionnée par le biais de projections directes ou indirectes (via le PBN) vers le CeA et de promouvoir également la satiété par des projections vers le PVH (Kinzig *et al.*, 2002).

I.1.4.3 Neurones POMC

Une troisième population de neurones est fortement impliquée dans la régulation du comportement alimentaire au niveau du NTS: les neurones POMC. Ces neurones sont phénotypiquement disjoints des deux populations décrites précédemment (Fan *et al.*, 2004).

Les corps cellulaires des neurones contenant de le gène POMC ne sont présents que dans deux régions bien définies du cerveau : l'ARC (Jacobowitz & O'Donohue, 1978) et le NTS (Joseph *et al.*, 1983, Yamazoe *et al.*, 1984). Alors que la population de l'ARC a fait l'objet de recherches intensives au cours de ces dernières années, celle du NTS a été beaucoup

moins étudiée et son rôle est donc moins bien connu. En outre, aucun article à notre connaissance n'a pu étudier précisément le rôle des neurones POMC du NTS chez un autre modèle que la souris transgénique car la détection immuno-histochimique des neurones POMC pose semble-t-il de nombreux problèmes qui nécessitent l'identification des neurones par ajout d'une protéine fluorescente dans la séquence du gène codant pour POMC (souris POMC-GFP). Malgré ces difficultés techniques, certaines différences intéressantes entre les deux populations de neurones POMC ont pu être mises en évidence.

Comme nous le verrons ultérieurement, les neurones POMC de l'ARC co-expriment le neuropeptide CART et forment avec les neurones NPY/AgRP un couple intégrateur des signaux relatifs à l'homéostasie énergétique. La plupart des signaux agissent ainsi de concert sur les deux populations neuronales qui génèrent une réponse coordonnée. Au sein de ce système, l'AgRP joue alors le rôle d'antagoniste des récepteurs à la mélanocortine (Ollmann *et al.*, 1997). Dans le NTS, la situation est fort différente. Ainsi, les neurones POMC du NTS ne co-localisent pas du tout avec le peptide CART (Ellacott *et al.*, 2006a), et il n'existe pour ainsi dire pas de corps cellulaire ou de fibres contenant de l'AgRP dans le NTS (Broberger *et al.*, 1998b). Le couple POMC/CART et AgRP/NPY n'existe donc pas dans le NTS.

En outre, les effecteurs du système mélanocortique dans le NTS sont très différents de ceux de l'ARC. Ainsi, les neurones POMC de l'ARC sont sensibles, en raison de leur proximité avec le 3^{ème} ventricule et d'une barrière hémato-encéphalique plus perméable à cet endroit (Peruzzo *et al.*, 2000), à un certain nombre de peptides ou d'hormones circulants tels que la ghréline, la leptine, le peptide YY... En particulier, la leptine joue un rôle très important sur la régulation des neurones POMC ainsi que sur ses « antagonistes », les neurones NPY. Il semble, mais les études réalisées sont contradictoires, que la leptine ne joue pas le même rôle auprès des neurones POMC du NTS. Si la leptine active une partie des neurones POMC (Cone, 2005), son implication dans l'activité de pSTAT3 (facteur de transcription intervenant dans la signalisation de la leptine en intracellulaire) est plus controversée. Une étude montre que la leptine augmente l'activité de pSTAT3 dans 50% des neurones POMC (Ellacott *et al.*, 2006a), là où une autre étude montre une absence totale d'effet de la leptine sur l'activité de pSTAT3 (Huo *et al.*, 2006) avec des protocoles pourtant similaires. En outre, le rôle de la leptine sur les teneurs en ARNm de POMC durant les périodes post-prandiales est très différent entre le NTS et l'ARC. Dans l'ARC, la leptine augmente l'expression de POMC après les repas (Bertile & Raclot, 2006) alors que dans le NTS, la leptine n'a aucun effet sur l'expression de POMC (Huo *et al.*, 2006, Perello *et al.*, 2007). Ces différents résultats tendent à nous faire penser que

contrairement aux neurones POMC de l'ARC, la leptine n'est pas le principal régulateur des neurones POMC du NTS.

En revanche, la CCK est un puissant régulateur de l'activité de cette population neuronale. La CCK active fortement les neurones POMC du NTS (Fan *et al.*, 2004, Appleyard *et al.*, 2005) et le récepteur MC4 est essentiel à l'effet satiétogène de la CCK (Fan *et al.*, 2004). En outre, la CCK et la leptine ont un pouvoir satiétogène synergique au niveau du NTS (Emond *et al.*, 1999, Emond *et al.*, 2001a). On peut donc penser que la leptine agit au niveau du NTS à travers des réseaux de neurones qui impliquent la CCK.

I.2 La région hypothalamique et le contrôle de la balance énergétique

La région hypothalamique représente le point de convergence de nombreuses informations périphériques et participe au contrôle de l'homéostasie énergétique corporelle et de la prise alimentaire. Cette zone très vaste comporte de nombreux noyaux qui sont en interaction permanente (Berthoud, 2002). Elle représente donc la zone d'intégration par excellence.

I.2.1. Le noyau arqué (ARC)

En raison d'une barrière hémato-encéphalique perméable (Peruzzo *et al.*, 2000) et de son emplacement, adjacent au 3^{ème} ventricule (**Figure 5**), le noyau arqué (ARC) est un site privilégié pour le suivi des teneurs sanguines de nutriments, neuropeptides et hormones circulantes. En dehors de son emplacement privilégié, l'ARC possède également une structure neuronale singulière, en étant composé presque exclusivement de deux phénotypes bien définis (Bagnol *et al.*, 1999) et aux propriétés antagonistes, les neurones POMC/CART et les neurones NPY/AgRP.

I.2.1.1 Neurones POMC/CART

I.2.1.1.1 Le système mélanocortique

Le gène POMC (pour pro-opiomélanocortine) code pour un grand nombre de peptides, dont l'hormone adrénocorticotrophique (ACTH), la famille des MSH (pour melanocyte-stimulating-hormone), qui comprend trois peptides, α -, β - et γ -, et la β -endorphine. Ces peptides interviennent dans de nombreuses fonctions de régulation physiologique, mais au sein du système nerveux central, le gène POMC et son expression, l' α -MSH, ne sont présents que

dans deux régions bien définies : l'ARC (Jacobowitz & O'Donohue, 1978) et le noyau du tractus solitaire (NTS) (Joseph *et al.*, 1983, Yamazoe *et al.*, 1984). L' α -MSH agit au niveau du CNS par le biais de deux récepteurs : MC3R et MC4R (Ellacott & Cone, 2006), tous deux impliqués dans la régulation du comportement alimentaire (Cone, 1999) et dont la particularité est de posséder un antagoniste spécifique, l'agouti-gene-related protein (AgRP) (Ollmann *et al.*, 1997). De nombreux sites reçoivent à la fois des fibres en provenance de neurones POMC et de neurones AgRP (Bagnol *et al.*, 1999, Cone, 2005), ce qui est le cas des projections en provenance de l'ARC. Les récepteurs à l' α -MSH sont présents dans de nombreuses régions du cerveau impliquées dans la régulation du comportement alimentaire, en particulier dans la région hypothalamique et le bulbe rachidien (Mountjoy *et al.*, 1994). Les trois composantes α -MSH, MC3/4R et AgRP forment un système appelé système mélanocortique, fortement impliqué dans la régulation du métabolisme à moyen/long terme.

I.2.1.1.2 Activation des neurones POMC/CART au sein de l'ARC

I.2.1.1.2.a Implication de la leptine

Les neurones POMC/CART sont situés dans la partie ventrolatérale de l'ARC (Bagnol *et al.*, 1999). Le peptide CART (pour cocaine-and-amphetamine-related transcript), qui est un puissant anorexigène du CNS (Kristensen *et al.*, 1998, Vrang *et al.*, 1999), est co-exprimé presque totalement dans les neurones POMC de l'ARC (Elias *et al.*, 1998a, Elmquist *et al.*, 1999), ce qui explique l'appellation « neurones POMC/CART », que nous simplifierons en neurones POMC pour la suite.

Ces neurones ont été principalement étudiés en raison de leur implication dans la réponse anorexigène causée par la leptine. La leptine est une hormone sécrétée par les adipocytes, dont le taux circulant reflète la teneur en masse adipeuse de l'organisme et donc l'état des réserves énergétiques (Frederich *et al.*, 1995). La leptine, malgré l'emplacement privilégié de l'ARC, ne profite pas de la perméabilité de la barrière hémato-encéphalique à ce niveau pour atteindre l'ARC, mais utilise un transporteur spécifique (Banks, 2004).

Les neurones POMC de l'ARC co-expriment le récepteur à la leptine (Cheung *et al.*, 1997) et la leptine dépoliarise des neurones POMC (Cowley *et al.*, 2001), augmente l'activation *c-fos* de ces neurones (Elias *et al.*, 1998a, Elias *et al.*, 1999) ainsi que les teneurs en ARNm de POMC (Schwartz *et al.*, 1997) et du peptide CART (Kristensen *et al.*, 1998). Les neurones POMC sont donc sensibles et activés en cas de hausse du taux circulant de leptine (**Figure 6**).

Or la leptine est un agent anorexigène indispensable à une régulation normale de la prise alimentaire à moyen/long terme. Une injection de leptine réduit la prise alimentaire (Halaas *et al.*, 1995), et les souris déficientes en leptine (*ob/ob*), tous comme les êtres humains, présentent une hyperphagie et une obésité réversibles par l'injection de leptine (Campfield *et al.*, 1995). L'absence du récepteur à la leptine chez la souris mutante entraîne également hyperphagie et obésité, en particulier en cas d'absence sélective du récepteur dans l'ARC (Balthasar *et al.*, 2004). Cependant, des individus en surpoids ou obèses présentent des taux circulants en leptine plus élevés que la normale, sans pour autant réduire leur consommation énergétique (Frederich *et al.*, 1995), mettant en évidence un phénomène de résistance à la leptine qui serait impliqué dans la prévalence actuelle de l'obésité (Enriori *et al.*, 2006).

I.2.1.1.2.b Résistance à la leptine

Le phénomène de résistance à la leptine implique directement les neurones POMC de l'ARC, et n'est détectable qu'au sein de ces neurones (Munzberg *et al.*, 2004, Enriori *et al.*, 2007). Le récepteur à la leptine présent dans l'ARC est le récepteur dit long, qui présente un domaine extracellulaire avec site d'accrochage du ligand et un domaine cytoplasmique (Tartaglia, 1997) (**Figure 7**). Une fois la leptine liée au récepteur, le domaine intracellulaire, qui comprend une tyrosine kinase (Jak), impliquée dans la signalisation des cytokines, entraîne la phosphorylation du facteur de transcription STAT3 (Munzberg *et al.*, 2003) en pSTAT3. Ce dernier passe ensuite dans le noyau du neurone et active la transcription de POMC (Schwartz *et al.*, 2000) (**Figure 8**), causant l'activation du neurone. pSTAT3 favorise également la transcription du suppresseur de cytokine 3 (SOCS-3) (Munzberg & Myers, 2005). Dans le cas d'individus de poids normal, présentant des taux de leptine circulants faibles, la transcription de SOCS-3 reste faible. En revanche, dans le cas d'individus obèses et aux taux de leptine constamment élevés, les concentrations de SOCS-3 sont alors élevées (Munzberg *et al.*, 2004, Enriori *et al.*, 2007) entraînant une réduction de l'activité de phosphorylation de Jak et donc une baisse de pSTAT3 (Munzberg *et al.*, 2005, Munzberg & Myers, 2005). Les neurones POMC sont alors moins dépolarisables suite à une augmentation du taux circulant de leptine. Les neurones sont donc insensibilisés à la leptine et ne peuvent plus s'acquitter correctement de leur rôle dans la régulation du comportement alimentaire (**Figure 9**).

I.2.1.1.2.c Autres facteurs modulant l'activité des neurones POMCⁱⁱⁱ

Depuis la découverte de l'influence de la leptine sur les neurones POMC, d'autres sources d'activation ou d'inhibition ont été mises en évidence, montrant que de nombreux systèmes liés au comportement alimentaire convergent au niveau du système mélanocortique, soulignant l'importance de ces neurones dans l'homéostasie énergétique.

Insuline

L'insuline est une hormone sécrétée par les cellules β du pancréas. Outre son rôle dans l'homéostasie glucidique, l'insuline a une action anorexigène au niveau du système nerveux central (Woods *et al.*, 1998, Air *et al.*, 2002a), semblable à celle de la leptine. L'insuline, tout comme la leptine, voit son taux circulant corrélé avec la masse adipeuse de l'organisme (Bagdade *et al.*, 1967) et possède également un système de transporteur spécifique pour traverser la barrière hémato-encéphalique (Woods *et al.*, 2003). En outre, l'action conjuguée de la leptine et de l'insuline est généralement inférieure à l'action des deux hormones séparément, au mieux strictement additive, mais pas synergique (Air *et al.*, 2002b), suggérant des sites d'action semblables.

Au sein de l'ARC, les neurones POMC co-expriment le récepteur à l'insuline et y sont sensibles (Cone *et al.*, 2001, Benoit *et al.*, 2002). En outre, l'injection dans l'hypothalamus d'un antagoniste au récepteur MC3/4R abolit la réponse anorexigène de l'insuline, montrant l'implication du système mélanocortique dans la réponse à l'insuline.

Le récepteur à l'insuline, même s'il est distinct de celui de la leptine, présente des similitudes avec ce dernier (Schwartz *et al.*, 2000) et la réponse intracellulaire de ces deux hormones au sein des neurones POMC emprunte des voies communes (Niswender & Schwartz, 2003), ce qui explique en partie les similitudes de leurs effets (**Figure 10**).

Sérotonine

La sérotonine est un neuromédiateur connu depuis longtemps comme inhibiteur de la prise alimentaire, aussi bien au niveau central que périphérique (Simansky, 1996), comme l'a entre autres montré l'étude de la séquence comportementale de satiété à la suite d'une injection de sérotonine (Edwards & Stevens, 1991). La sérotonine ne franchissant pas la barrière

Dans cette partie, nous n'évoquerons que les neuropeptides ou neuromédiateurs produits centralement ou au niveau gastro-intestinal et qui traversent la barrière hémato-encéphalique pour agir sur les neurones POMC. Ceux agissant sur les neurones NPY ou via le nerf vague seront étudiés dans les parties concernées.

hémato-encéphalique, son action centrale est vraisemblablement liée à une production au sein du CNS. L'injection centrale de sérotonine implique des régions comme le noyau paraventriculaire de l'hypothalamus et l'hypothalamus latéral, régions qui sont fortement interconnectées avec les neurones POMC (Elias *et al.*, 1998b, Cowley *et al.*, 1999, Elias *et al.*, 1999).

La mise en évidence de l'implication des neurones POMC dans la réponse à la sérotonine centrale a été démontrée par l'emploi de la fenfluramine, agoniste indirect de la sérotonine, qui stimule la sécrétion et bloque la sérotonine dans la synapse en empêchant sa récupération par l'axone. Cette molécule était très efficace en thérapie de l'obésité mais a été retirée du marché en raison d'effets cardio-pulmonaires néfastes (Connolly *et al.*, 1997). La fenfluramine active les neurones POMC (Heisler *et al.*, 2002), tout comme la sérotonine, avec une réponse équivalente à celle de la leptine (Zhou *et al.*, 2005). En outre, les neurones POMC sont indispensables à la réponse anorexigène induite par la sérotonine centrale (Heisler *et al.*, 2006) (**Figure 11**). Même si l'activation des neurones sérotoninergiques au niveau central est encore mal connue, il semblerait donc que son action anorexigène soit la conséquence de l'activation du système mélanocortique au niveau de l'ARC.

Nutriments circulants

Le glucose est un métabolite essentiel et la variation de son taux sanguin est un des principaux marqueurs du repas. Tout comme l'ARC est sensible aux variations du taux circulant d'insuline, il l'est également aux variations de glucose (Ibrahim *et al.*, 2003). Ainsi, les neurones POMC de l'ARC sont sensibles aux variations de concentration du glucose, dont une augmentation les active (Cone *et al.*, 2001). Cependant, certaines études récentes remettent en question cette sensibilité directe des neurones POMC au glucose et la basent sur une inhibition des neurones NPY par le glucose (Burdakov *et al.*, 2005, Fioramonti *et al.*, 2007).

Enfin, les variations de taux circulant de certains lipides, même si la spécificité d'action sur l'ARC n'est pas encore avérée, seraient également suivies par les neurones de l'ARC, vraisemblablement par les neurones NPY/AgRP, même si les modalités d'action n'ont pas encore été élucidées [pour revue voir (Lam *et al.*, 2005)]

I.2.1.2 Neurones NPY/AgRP

Les neurones contenant le neuropeptide Y (NPY) sont situés dans la partie dorso-médiane de l'ARC (Bagnol *et al.*, 1999). Ces neurones présentent une co-expression quasi-

totale avec l'agouti-gene-related protein (AgRP) dans cette région (Broberger *et al.*, 1998a, Broberger *et al.*, 1998b). Ces deux neuropeptides sont de puissants orexigènes du système nerveux central. Le NPY est en effet considéré comme le plus puissant orexigène du CNS [pour revue voir (Levine *et al.*, 2004a, Williams *et al.*, 2004)]. L'injection d'AgRP, quant à elle, induit également une augmentation de la prise alimentaire et l'obésité (Ollmann *et al.*, 1997). Les neurones NPY/AgRP sont en réalité indispensables au comportement ingestif, puisqu'une lésion spécifique de ces neurones entraîne un arrêt quasi complet de la prise alimentaire (Gropp *et al.*, 2005). L'AgRP est en outre l'antagoniste des récepteurs mélanocortiques MC3/4R (Ollmann *et al.*, 1997) et il existe une très forte colocalisation à travers tout le CNS des fibres en provenance de l'ARC contenant de l'AgRP et de l' α -MSH (Bagnol *et al.*, 1999), montrant que les neurones POMC et AgRP projettent vers les mêmes régions du CNS où ils vont véhiculer pour les neurones POMC des messages anorexigènes et pour les neurones NPY/AgRP des messages contraires, orexigènes.

Les neurones NPY/AgRP forment donc avec les neurones POMC un tandem de neurones agissant de manière coordonnée pour suivre et réguler l'homéostasie énergétique de l'organisme (Cone, 1999, Elmquist *et al.*, 1999, Schwartz *et al.*, 2000, Cowley, 2003). Les facteurs qui agissent sur les neurones POMC agissent donc généralement également sur les neurones NPY, et vice et versa. (**Figure 6**)

En particulier, la leptine qui, comme nous l'avons vu, est un facteur d'activation primordial du système mélanocortique, agit également sur les neurones NPY (Elias *et al.*, 1999). Les neurones NPY co-expriment le même récepteur à la leptine que les neurones POMC (Hakansson *et al.*, 1998, Baskin *et al.*, 1999), mais ce dernier entraîne l'hyperpolarisation et donc l'inhibition des neurones NPY en présence de leptine (van den Top *et al.*, 2004). La leptine inhibe donc la synthèse de l'ARNm du NPY comme de l'AgRP. L'action de la leptine est également visible par l'augmentation des teneurs de SOCS-3, qui est de ce fait un bon marqueur d'interaction entre la leptine et les neurones NPY (Elias *et al.*, 1999, Elmquist, 2001). Le caractère inhibiteur de la leptine envers les neurones NPY empêche en effet l'utilisation de marquage de type *c-fos* (qui requiert une activation neuronale) pour étudier ces phénomènes.

D'autres facteurs activateurs du système mélanocortique inhibent également l'activité des neurones NPY comme l'insuline (Sato *et al.*, 2005) ou la sérotonine (Heisler *et al.*, 2006). Tous ces facteurs ont donc à la fois un rôle d'activateur des neurones POMC et d'inhibiteur des neurones NPY, ce qui permet l'élaboration d'une réponse coordonnée. Cette double action de

ces facteurs est également nécessaire en raison de l'existence d'un tonus inhibiteur des neurones NPY vis-à-vis des neurones POMC.

I.2.1.2.1 Tonus inhibiteur des neurones NPY sur les neurones POMC

Les neurones NPY projettent de nombreux axones vers les corps cellulaires des neurones POMC (Cowley *et al.*, 2001). Ces projections peuvent conduire à la libération de deux sortes de neuromédiateurs sur les neurones POMC, le NPY et le GABA. Les neurones POMC présentent des récepteurs au NPY (de type Y1) (Broberger *et al.*, 1997), dont l'activation inhibe ces neurones. Une partie de la population des neurones NPY est également GABAergiques (Horvath *et al.*, 1997) et le GABA libéré par ces neurones hyperpolarise et donc inhibe les neurones POMC (Cowley *et al.*, 2001) (**Figure 6**).

Cette action inhibitrice des neurones NPY vis-à-vis des neurones POMC n'a pas d'équivalent dans le sens inverse. De ce fait, le système formé par le POMC/NPY est déséquilibré en faveur des neurones NPY ce qui contribue à favoriser la prise alimentaire par rapport à son inhibition (Schwartz *et al.*, 2003).

Afin de pouvoir lever l'inhibition des neurones NPY sur les neurones POMC, les facteurs anorexigènes doivent non seulement inhiber les neurones NPY pour empêcher la sécrétion d'AgRP dans les régions vers lesquelles projettent les neurones POMC et NPY, mais également inhiber la sécrétion de GABA sur les neurones POMC. La leptine (Cone *et al.*, 2001) (**Figure 6**), tout comme la sérotonine (Heisler *et al.*, 2006) (**Figure 11**), possède des récepteurs à la fois sur les corps cellulaires et sur les axones des neurones NPY projetant vers les neurones POMC et peuvent donc inhiber les deux facettes orexigènes de ces neurones.

I.2.1.2.2 Action centrale des neuropeptides ou des peptides gastro-intestinaux sur les neurones NPY

I.2.1.2.2.a Peptide YY (PYY)

Le peptide YY (PYY) est sécrété par les cellules intestinales L dans le colon et l'iléon (pour revue voir (Ellacott *et al.*, 2006b)) de manière calorie dépendante à la suite du repas (Pedersen-Bjergaard *et al.*, 1996). Le PYY appartient à la même famille que le NPY et

présente une très forte affinité, sous la forme PYY (3-36)^{iv}, avec son récepteur Y2 (Keire *et al.*, 2000) présent sur les neurones NPY.

Une injection périphérique de PYY, qui franchit la barrière hémato-encéphalique (Nonaka *et al.*, 2003), entraîne une forte diminution de la prise alimentaire qui a d'ailleurs initialement été expliquée par une inhibition des récepteur Y2 des neurones NPY (Batterham *et al.*, 2002). En se liant à ces récepteurs, le PYY empêche la sécrétion de GABA sur les neurones POMC, levant ainsi l'action inhibitrice des neurones NPY sur les neurones POMC (**Figure 12**). Cette action s'accompagne d'une diminution de l'ARNm de NPY et va de pair avec l'augmentation de la synthèse d'ARNm de POMC et d'une activation de neurones POMC (Batterham *et al.*, 2002).

Cependant, le rôle des récepteurs Y2 est plus complexe qu'initialement suggéré, car une injection centrale de PYY est orexigène et non plus anorexigène comme en périphérique. Elle inhibe alors non seulement les neurones NPY mais également les neurones POMC (Acuna-Goycolea & van den Pol, 2005, Ghamari-Langroudi *et al.*, 2005). En outre, l'utilisation de modèles transgéniques a montré que le système mélanocortique, même s'il est activé par l'injection de PYY en périphérique, n'est pas indispensable à son effet (Halatchev *et al.*, 2004).

1.2.1.2.2.b Ghréline

La ghréline est un peptide sécrété par de nombreux tissus périphériques ou centraux mais principalement par les cellules de l'estomac (Kojima *et al.*, 1999, Date *et al.*, 2000). Il a tout d'abord été identifié comme stimulateur de l'hormone de croissance, mais la présence de son récepteur dans de nombreuses régions du système nerveux central impliquées dans la régulation alimentaire, en particulier dans l'hypothalamus et le complexe vagal dorsal (Guan *et al.*, 1997), a conduit à étudier son influence sur la prise alimentaire. Il a alors été montré qu'une injection centrale ou périphérique de ghréline entraîne une forte hausse de la prise alimentaire et inhibe la dépense énergétique (Nakazato *et al.*, 2001).

Par ailleurs, les seuls corps cellulaires connus synthétisant de la ghréline sont présents dans l'hypothalamus. Ils sont situés dans des espaces entre différents centres de l'hypothalamus comme l'ARC et les noyaux ventro-, dorso- et paraventriculaire de

^{iv} Le PYY est également produit par les cellules intestinales sous la forme de PYY (1-36) qui joue sur les récepteurs Y1 et Y5. Le PYY (1-36) franchissant également la barrière hémato-encéphalique, il serait susceptible d'inhiber les neurones POMC par activation du récepteur Y1. Si l'action du PYY (1-36) est orexigène (21. **Ballantyne, G. H.** (2006). "Peptide YY(1-36) and peptide YY(3-36): Part I. Distribution, release and actions." *Obes Surg.* 16(5): 651-8.), contrairement à celle du PYY (3-36), son action centrale précise est encore mal connue, les études s'étant focalisées sur le PYY (3-36) pour son action en thérapie de l'obésité.

l'hypothalamus (Cowley *et al.*, 2003) (**Figure 13**) et ils forment une population distincte de celles précédemment étudiées (POMC, NPY, orexine, dopamine, melanin-concentrating hormone). Les récepteurs à la ghréline sont présents sur les neurones NPY/AgRP (Willesen *et al.*, 1999) et la ghréline active ces neurones et augmente la synthèse de l'ARNm de NPY et d'AgRP (Nakazato *et al.*, 2001, Cowley *et al.*, 2003). En outre, les souris k-o à l'AgRP ou au NPY ne répondent pas à la ghréline, et l'injection dans l'hypothalamus d'antagoniste du NPY inhibe l'effet orexigène de la ghréline (Nakazato *et al.*, 2001).

L'action excitatrice de la ghréline sur les neurones NPY/AgRP est couplée avec une action inhibitrice sur les neurones POMC/CART, renforçant son effet orexigène. En effet, la ghréline stimule le tonus inhibiteur des neurones NPY sur les neurones POMC, en facilitant de manière pré synaptique, la sécrétion du GABA, qui inhibe les neurones POMC (Cowley *et al.*, 2003). Son action est donc exactement contraire à celle du PYY (Cowley, 2003) (**Figure 12**) et contribue donc au déséquilibre entre les systèmes orexigène et anorexigène de l'hypothalamus en faveur d'une augmentation de la prise alimentaire (Schwartz *et al.*, 2003).

L'effet de la ghréline sur l'hypothalamus n'est cependant pas dû directement à une hausse de la ghréline circulante car cette molécule ne franchit la barrière hémato-encéphalique que dans le sens cerveau -> sang chez la souris (Banks *et al.*, 2002). L'activation des neurones NPY/AgRP par la ghréline est donc vraisemblablement due à une sécrétion centrale au niveau de l'hypothalamus (Cowley *et al.*, 2003), ou à une activation indirecte mettant en jeu la ghréline périphérique via le complexe vagal dorsal (Ellacott & Cone, 2006) (voir I.1.3.4).

I.2.1.3 Projections des neurones POMC/CART et NPY/AgRP et intégration de l'homéostasie énergétique

Les neurones POMC et NPY de l'ARC développent des projections vers de très nombreuses régions du CNS impliquées dans la régulation du comportement alimentaire et en particulier des zones de l'hypothalamus comme le noyau paraventriculaire (PVH) et l'hypothalamus latéral (LH) (Jobst *et al.*, 2004) (**Figure 14**). Il est intéressant de noter que les neurones de l'ARC développent ces connexions à l'état néonatal sous l'impulsion de la leptine (Bouret *et al.*, 2004b), qui joue alors un rôle non seulement neurotrophique, mais ne possède pas encore de pouvoir anorexigène avant l'établissement de ces projections (Bouret *et al.*, 2004a). La visualisation de l'effet de la leptine à ce stade permet de mettre en évidence des projections très denses des neurones de l'ARC vers le PVH, le LH, ainsi que vers les noyaux

dorso- et ventro-médian de l'hypothalamus et le noyau supraoptique (Bouret *et al.*, 2004b, Bouret *et al.*, 2004a, Bouret & Simerly, 2004).

I.2.1.3.1 Projection vers le noyau paraventriculaire (PVH)

Les neurones POMC et NPY présentent d'importantes projections vers le noyau paraventriculaire de l'hypothalamus (PVH) (**Figure 15**) et en particulier sa partie parvocellulaire, où ils innervent des neurones sécrétant de la corticotropin-releasing hormone (CRH) (Fekete *et al.*, 2000b) ou de la thyrotropin-releasing hormone (TRH) (Legradi & Lechan, 1998, Fekete *et al.*, 2000a), deux puissants anorexigènes. Les neurones POMC activent directement ou indirectement ces neurones (Fekete *et al.*, 2000b) (Fekete *et al.*, 2000a), qui projettent vers le système sympathique (Schwartz *et al.*, 2000).

Dans cette région, les fibres POMC et NPY sont fortement interconnectées (Cowley *et al.*, 1999), et on trouve de nombreux récepteurs MC4R (Mountjoy *et al.*, 1994). Cowley a émis l'hypothèse que la connexion des neurones POMC et NPY avec ceux du PVH formait un « adipostat », régulant la mise en réserve ou la libération des lipides. Dans ce modèle, les neurones POMC/NPY vont réguler des interneurones GABAergiques par le biais de récepteurs MC4R et NPY (Cowley *et al.*, 1999) (**Figure 16**). La libération d' α -MSH par les neurones POMC favorise le tonus GABAergique sur des neurones favorisant les réserves et la prise alimentaire en entraînant l'inhibition de ces neurones. La libération de NPY a l'effet inverse sur ces neurones, et celle d'AgRP antagonise le récepteur à l' α -MSH (Cowley *et al.*, 1999).

Cette théorie de l'adipostat et l'implication du système mélanocortique ont cependant été contestées depuis. En effet, les projections POMC en provenance de l'ARC favorisent deux comportements : une diminution de la prise alimentaire et une hausse de la dépense énergétique. Or les projections vers le PVH sont responsables de la diminution de la prise alimentaire (Balthasar *et al.*, 2005) (**Figure 17**) mais ne sont pas impliquées dans la hausse de la dépense énergétique, ce qui va à l'encontre de la théorie développée par Cowley.

Même si les messages d'entrée dans le PVH commencent donc à être connus, le processus d'intégration est très complexe. Cette région reçoit des afférences de très nombreuses régions (Swanson & Sawchenko, 1980, Sawchenko & Swanson, 1982b, Swanson & Sawchenko, 1983, Cunningham *et al.*, 1990), et même si le rôle de tel ou tel type de neurone vis-à-vis d'un stimulus spécifique peut être étudié, le comportement général de ces neurones est très difficile à déterminer. Le PVH demeure donc une sorte de « boîte noire » qui élabore

une réponse comportementale adéquate, sans qu'on soit réellement en mesure aujourd'hui de la déchiffrer.

I.2.1.3.2 Projection vers l'hypothalamus latéral (LH)

Contrairement au PVH, l'hypothalamus latéral (LH) est une région dont la vocation est depuis très longtemps connue. Une lésion électrolytique du LH entraîne en effet une perte totale d'appétit, qui peut aller jusqu'à la mort (Anand & Brobeck, 1951), et sa stimulation électrique induit une forte prise alimentaire (Delgado & Anand, 1953), ce qui a valu à cette région le surnom de centre de la faim.

Deux populations de neurones impliqués dans la régulation du comportement alimentaire ont été identifiées dans le LH : les neurones orexines et les neurones contenant la melanin-concentrating-hormone (MCH). Ces neurones forment deux populations distinctes qui reçoivent des afférences à la fois des neurones NPY et des neurones POMC (Broberger *et al.*, 1998a, Elias *et al.*, 1998b). Ces afférences proviennent de neurones de l'ARC directement sensibles à la leptine (Elias *et al.*, 1999).

Les orexines et la MCH sont deux puissants orexigènes du système nerveux. Les corps cellulaires des neurones contenant ces neuromédiateurs sont trouvés presque exclusivement dans le LH (Bittencourt *et al.*, 1992, Sakurai *et al.*, 1998), et la synthèse de leur ARNm est fortement augmentée en période de jeun (Qu *et al.*, 1996, Sakurai *et al.*, 1998), confirmant leur caractère orexigène. Il n'y a pas eu à notre connaissance d'étude expliquant directement la régulation des neurones orexines et/ou MCH par les neurones POMC et NPY. Cependant, il existe de fortes présomptions selon lesquelles les neurones POMC inhiberaient ces populations neuronales, là où les neurones NPY les activeraient. En effet, ces populations co-expriment à la fois le récepteur MC4R et Y5 (récepteur au NPY). Les souris sur-exprimant AgRP (Ay type) voient leur taux d'ARNm de MCH fortement augmenté, comme dans le cas d'inhibition des récepteurs MC4R par une injection d'AgRP ou d'antagoniste de MC4R (Hanada *et al.*, 2000). Paradoxalement, ces manipulations n'ont aucun effet sur l'ARNm des orexines, impliquant un autre mécanisme d'inhibition/activation, probablement via les neurones NPY (Sahu, 2002).

Les neurones MCH seraient impliqués dans la régulation de la dépense énergétique plutôt que dans celle du comportement alimentaire (Segal-Lieberman *et al.*, 2003). Les neurones POMC, en les inhibant, augmenteraient ainsi la dépense énergétique. Les neurones MCH seraient donc une des voies effectrices des neurones POMC dans ce domaine (Balthasar *et al.*, 2005).

Les projections entre les neurones du LH et ceux de l'ARC sont fortement réciproques (voir ci-après) et la régulation est en réalité mutuelle.

I.2.1.3.4 Projection vers le noyau du tractus solitaire (NTS) et la moelle épinière

Les neurones POMC projettent vers la seule autre région où sont présents des corps cellulaires présentant de l' α -MSH, le noyau du tractus solitaire (NTS) (**Figure 15**). Cette projection n'est pas très importante comparativement aux autres projections depuis l'ARC (Zheng *et al.*, 2005), mais elle présente l'intérêt de ne pas être jumelée avec une projection des neurones NPY/AgRP, puisque aucune fibre positive à l'AgRP n'est présente dans le NTS (Broberger *et al.*, 1998b), et de présenter la plus forte densité de récepteur MC4R (Mountjoy *et al.*, 1994), qui, dans cette région, n'est donc jamais en présence de son antagoniste central.

L'implication de ces neurones peut être étudiée par l'injection d'agoniste du récepteur MC4R (MTII) dans le NTS ou le 4^{ème} ventricule (car les neurones POMC du NTS ne se régulent vraisemblablement pas eux-mêmes par ce récepteur). Le MTII réduit fortement la prise alimentaire et provoque une perte de poids (Grill *et al.*, 1998, Williams *et al.*, 2000) en réduisant la taille des repas et non leur fréquence (Azzara *et al.*, 2002, Zheng *et al.*, 2005) alors qu'un antagoniste de MC4R produit exactement l'effet contraire. La baisse de prise alimentaire induite par l'injection de MTII souligne le rôle des neurones POMC de l'ARC par leurs projections et non ceux du NTS.

Cette projection « descendante » des neurones POMC vers le NTS met en exergue le rôle de régulateur de ces neurones (Schwartz, 2006), à la fois comme nous l'avons vu dans le cas du PVH, sur l'homéostasie énergétique générale, et sur la prise énergétique à court terme, en modulant l'activité du NTS.

Ces neurones projettent également directement vers les pré-ganglions sympathiques (Elias *et al.*, 1998a), qui possèdent de très nombreux récepteurs MC4R (Kishi *et al.*, 2003). Cette projection constitue une autre possibilité pour les neurones POMC de jouer sur la dépense énergétique (Balthasar *et al.*, 2005), en modulant le flux sympathique qui est un acteur majeur de la thermogenèse et de la dépense énergétique (Landsberg *et al.*, 1984).

I.2.2 L'aire hypothalamique latérale (LH)

Comme nous l'avons précédemment, l'aire hypothalamique latérale est fortement impliquée dans la régulation du comportement alimentaire. En particulier, sa lésion entraîne une profonde hypophagie qui conduit les animaux à la mort. L'action du LH sur la prise

alimentaire est donc pour partie liée à la motivation à manger, et comme nous le verrons, cette zone est la plaque tournante de l'intégration entre les régulations homéostatique et non-homéostatique de la prise alimentaire (Berthoud, 2004b) (cf I.3).

Comme nous l'avons vu, les deux principaux phénotypes de neurones présents dans le LH sont les neurones orexines et les neurones MCH. En raison de la faible implication directe des neurones MCH dans la régulation de la prise alimentaire (mais plutôt dans la dépense énergétique), nous nous intéresserons uniquement aux neurones orexines.

Les corps cellulaires des neurones orexines sont trouvés exclusivement dans le LH (Sakurai *et al.*, 1998). Ces neurones sont inhibés par le glucose et la leptine et activés par la ghréline (Shiraishi *et al.*, 2000, Olszewski *et al.*, 2003, Yamanaka *et al.*, 2003). Ils projettent vers de très nombreuses régions du système nerveux central (mettre schéma Peyron 1998) (Peyron *et al.*, 1998, Date *et al.*, 1999). Les plus denses projections concernent tout d'abord la modulation des neurones MCH et des très nombreux neurones gluco-sensibles (environ 30% des neurones du LH) présents dans le LH, dont la plupart seraient d'ailleurs des neurones orexines. Ces neurones gluco-sensibles sont fortement activés par une hypoglycémie et par l'orexine (Liu *et al.*, 2001).

Dans l'hypothalamus, cette innervation touche [pour revue voir (Jobst *et al.*, 2004)]:

- l'ARC, qui présente de nombreux récepteurs à l'orexine, à la fois sur les neurones NPY/AgRP et POMC/CART (Suzuki *et al.*, 2002). Les neurones NPY/AgRP sont activés par les orexines (van den Top *et al.*, 2004), alors que les neurones POMC/CART sont inhibés par ces dernières (Ma *et al.*, 2007), peut-être indirectement par l'intermédiaire de neurones GABAergiques (comme les neurones NPY/AgRP)
- le VMH (projections très denses) dont les neurones gluco-sensibles sont inhibés par les orexines (Shiraishi *et al.*, 2000).
- le PVH, dont les neurones CRH sont activés par les orexines (Samson *et al.*, 2002) (ce qui semble aller à l'encontre du caractère orexigène des orexines).

En dehors de l'hypothalamus, les neurones orexines projettent fortement vers le noyau du tractus solitaire, ainsi que vers le noyau parabrachial (Peyron *et al.*, 1998), et finalement vers la corde spinale (Jobst *et al.*, 2004), toutes ces régions étant fortement impliquées dans la régulation du comportement alimentaire. La connexion vers la corde spinale confère aux neurones orexines, comme aux neurones POMC (voir ci dessus), la capacité de moduler le flux sympathique. Ainsi, l'action orexigène des neurones orexines du LH est le fruit d'action

conjointe sur de nombreuses régions du CNS, ce qui explique son pouvoir très important, qui comme nous le verrons (cf I.3), peut surpasser les messages anorexigènes homéostatiques.

I.2.3 Les noyaux ventro- et dorso-médian de l'hypothalamus (VMH et DMH)

L'hypothalamus ventro-médian (VMH) a été l'un des premiers centres de l'hypothalamus identifié comme acteur majeur de la régulation du comportement alimentaire. Des lésions électrolytiques de cette région (Brobeck *et al.*, 1943) entraînent en effet une hyperphagie prononcée qui se traduit par une forte obésité. Cette hyperphagie est caractérisée par une voracité peu commune dès la formation de la lésion, des repas non seulement plus importants mais également plus fréquents (Becker & Kissileff, 1974).

Cependant, cette hypothèse a été battue en brèche dans les années 70. En effet, les lésions électrolytiques menées dans les années 40 et 50 n'étaient à priori pas très précises et avaient détruit, outre les corps cellulaires des neurones du VMH, les nombreuses fibres passant dans cette région. Une lésion spécifiquement localisée au niveau du VMH ne produit en effet ni hyperphagie, ni obésité (Gold, 1973), contrairement à une lésion du PVH (Gold *et al.*, 1977), qui était vraisemblablement partiellement détruit, tout comme l'ARC, dans les lésions initiales.

L'implication du VMH dans la régulation du comportement alimentaire a donc été presque abandonnée face à l'émergence de centres comme le PVH ou l'ARC. Néanmoins, le VMH est aujourd'hui connu comme étant impliqué dans le contrôle d'un certain nombre de paramètres métaboliques, dont l'insuline [pour revue, voir (King, 2006)], et s'il ne régule pas directement la prise alimentaire, il semble néanmoins avoir une action sur la prise de poids, en tout cas sur la formation des adipocytes. De plus, le VMH comporte de nombreux neurones glucorécepteurs, et apparaît comme primordial dans la détection centrale du glucose et sa régulation (Routh, 2003).

Un autre noyau de l'hypothalamus, le noyau dorso-médian de l'hypothalamus (DMH), très proche du VMH, assure des fonctions sensiblement similaires à ce dernier, en particulier vis-à-vis de la leptine (Elmquist *et al.*, 1998). Comme le VMH, il est sensible à la leptine, et semble directement impliqué dans la régulation de la thermogénèse (Dimicco & Zaretsky, 2007).

I.3 Facteurs modulant ces régulations : exemple de l'hédonisme

La régulation homéostatique du comportement alimentaire fonctionne plutôt bien dans le cadre d'une alimentation peu ou pas soumise à une offre alimentaire très large. Dans la civilisation actuelle, en particulier dans les pays occidentaux, où l'obésité progresse constamment depuis ces 50 dernières années, l'offre alimentaire dépasse largement ce qu'elle a pu être dans toute l'histoire de l'humanité. Dans un environnement restrictif (qui était la norme jusqu'à très récemment), la faculté d'ingérer des aliments en grande quantité, de savoir les stocker et de pouvoir mettre à disposition l'énergie de manière constante pour l'organisme présente un avantage considérable, en permettant la survie lors de longues périodes de faibles approvisionnement énergétique ou de famine. Cela a fortement contribué à la sélection de ces traits (Berthoud, 2004a). L'ingestion des aliments riches en lipides, donc à très forte valeur énergétique, est à ce titre clairement favorisée par l'organisme, dans le but d'assurer cette pérennité énergétique (Kelley *et al.*, 2002).

Les mécanismes d'homéostasie énergétique, très efficaces en période de faible apport énergétique, le sont beaucoup moins en période d'apport excédentaire prolongé, car l'organisme est naturellement poussé à surconsommer dans l'hypothèse d'une future « disette » énergétique. Une partie du système pousse donc à ne pas prendre en compte le passif de consommation mais uniquement le futur le moins favorable. A ce titre, la résistance à la leptine est un bon exemple de la manière dont l'organisme n'arrive pas à gérer des apports excessifs répétés d'énergie.

Derrière ce comportement et cette attraction pour les aliments riches en énergie se trouve un réseau de régions du système nerveux central organisé de manière complexe qui prend le pas, si nécessaire, sur le système de régulation dit homéostatique de la prise alimentaire (Berthoud, 2004a, Berthoud, 2004b). Dans la société actuelle, cette sur-régulation est principalement conduite par l'hédonisme, qu'on pourrait définir comme l'ensemble des comportements incitant à la réalisation d'une action en vue d'une récompense, généralement génératrice de plaisir (d'où son appellation de « reward » en anglais). L'hédonisme alimentaire est donc un cas particulier de renforcement positif qui facilite tout comportement exposant le sujet à des stimulations ou des situations qui sont favorables à sa survie ou celle de son groupe et/ou ont un caractère agréable (Richelle, 1968). Dans l'hédonisme, chacun des aspects présente des facettes volontaires et inconscientes, gérées par des réseaux de neurones spécifiques (Berridge, 1996, Berridge & Robinson, 2003).

I.3.1 Définitions des différents aspects de l'hédonisme : « learning », « liking » et « wanting »^v

L'hédonisme se définit traditionnellement comme l'association de trois phénomènes comportementaux.

La première phase, qui est indispensable à la reconnaissance ultérieure de l'aliment et notamment à l'activation des autres circuits neuronaux impliqués dans l'hédonisme, est **la phase d'apprentissage, dite « learning »**. Cette phase implique principalement l'amygdale, en particulier le noyau central (CeA). Au sein de l'hédonisme, le learning est un processus associatif qui va prédisposer l'individu à une récompense. C'est donc la composante prédictive de l'hédonisme, qui requiert une connaissance (ou un apprentissage) permettant l'association stimulus-réponse. Cette connaissance prend deux formes : une forme consciente dite cognitive, et une forme inconsciente, dite associative, comme lors des réflexes de type Pavlovien (Berridge & Robinson, 2003).

Les deux autres aspects de l'hédonisme ont longtemps été considérés comme indissociables. Les études récentes ont cependant montré qu'elles reposaient sur des mécanismes d'actions séparés. **L'aspect motivation de l'hédonisme, ou « wanting »**, comprend la part incitative de l'hédonisme, l'élaboration de stratégie visant à atteindre la valeur hédonique associée avec le stimulus. Derrière cette notion apparaît donc la motivation de l'individu à aller chercher de la nourriture et à diminuer l'importance de son coût. Même si cette démarche semble largement volontaire et donc consciente, il existe également une part inconsciente, dite « incentive salience » (Berridge & Robinson, 1998), mise en jeu par exemple dans le cas de « rechute » suite à une privation volontaire (pour cause de dépendance, etc...), et est à l'origine des phénomènes d'excès de consommation durant cette rechute. Cet aspect de l'hédonisme met en jeu les connexions dopaminergiques entre l'aire tegmentale ventrale (VTA) et la coque du noyau accumbens.

L'aspect véritablement hédonique (dans le sens commun) **de l'hédonisme est le « liking »**, dont le sens est très proche de celui de palatabilité. Le liking illustre le plaisir conscient ou inconscient associé à un stimulus. L'aspect conscient est subjectif alors que l'aspect inconscient est objectif, et dans le cas de l'alimentation, est beaucoup plus important en terme de comportement alimentaire, puisqu'il prédéfinit un certain nombre de préférences

^v L'utilisation des termes anglais pour désigner les différents aspects de l'hédonisme a été préférée pour rester conforme aux définitions et aux différentes notions associées à ces termes dans la littérature.

alimentaires (attirait pour les aliments riche en lipides et en sucres). Cet aspect implique les neurones GABA et le système opioïde de la coque noyau accumbens.

I.3.2 Le noyau accumbens, pivot de la modulation hédonique de la régulation du comportement alimentaire

Ces trois aspects de l'hédonisme sont gérés par des régions du cerveau et des réseaux de neurones différents. Cependant, les recherches dans ce domaine ont montré l'importance d'une région particulière, le noyau accumbens, dans l'élaboration du wanting et du liking.

Le noyau accumbens est une structure du striatum ventral situé à l'avant du télencéphale. Il est divisé en deux parties, le noyau central (AccCo) et la coque (AccSh). (**Figure 18**). Il a été très tôt identifié comme la principale interface entre motivation et action dans le cerveau, de part ses nombreuses afférences (majoritairement glutamatergiques) depuis des régions impliqués dans les processus cognitifs et d'apprentissage, et ses efférences vers les régions de contrôles moteurs, pour la plupart GABAergiques (Mogenson *et al.*, 1980). L'AccCo est impliqué dans les processus d'apprentissage et d'exécution d'actions mécaniques adaptatives, alors que l'AccSh est plutôt impliqué en tant que relais entre les régions corticales et d'autres régions du cerveau dans des aspects comportementaux, en particulier alimentaires (Kelley, 2004).

I.3.2.1 Liking et systèmes GABA/glutamate et opioïdes

Le système opioïde dans l'AccSh joue un rôle prépondérant sur la modulation hédonique de la prise alimentaire (Kelley *et al.*, 2002). En effet, l'injection d'opiacés, comme la morphine, dans l'AccSh augmente fortement la prise alimentaire (Mucha & Iversen, 1986), en agissant sur des récepteur spécifiques présents sur les neurones de l'AccSh. Il existe trois récepteurs aux opiacés, μ , δ et γ . Seul le récepteur μ est impliqué dans cet effet orexigène (Bakshi & Kelley, 1993). L'activation de ces récepteurs μ -opioïdes stimule non seulement la prise alimentaire, mais préférentiellement l'ingestion de régimes riches en lipides (Zhang *et al.*, 1998, Zhang & Kelley, 2000) et dans une moindre mesure, de glucides simples (Zhang & Kelley, 1997), deux macronutriments à forte palatabilité, montrant l'implication de ce récepteur dans le liking. Cette implication est confirmée par le comportement des animaux dont l'AccSh a été activé. Ces derniers présentent une augmentation sélective de la réponse hédonique aux aliments sucrés, correspondant à l'activation d'une région spécifique de l'AccSh (Pecina & Berridge, 2000, Pecina & Berridge, 2005).

Ces récepteurs μ sont placés sur des neurones GABAergiques recevant des projections glutamatergiques en provenance des régions corticales et de l'aire tegmental ventrale (VTA). Ces neurones GABAergiques contrôlent plus ou moins directement la prise alimentaire en modulant l'activation des neurones du LH (**Figure 19**). En effet, l'activation des neurones GABA par l'injection d'agoniste des récepteurs au GABA entraîne une très forte augmentation de la prise alimentaire, même chez le rat à satiété (Stratford, 2005) semblable à ce qui est observé lors d'une stimulation électrique du LH (Stratford & Kelley, 1997). Les projections GABAergiques en provenance de l'AccSh activent en effet les neurones orexines du LH (Stratford & Kelley, 1999, Zheng *et al.*, 2003). Paradoxalement, malgré des projections directes entre l'AccSh et le LH (Kirouac & Ganguly, 1995), une activation des récepteurs GABA dans le LH ne produit pas comme attendu une hausse de la prise alimentaire, contrairement à une inhibition des récepteurs NMDA. Il y aurait donc vraisemblablement des interneurones glutamatergiques entre l'AccSh et les neurones orexines du LH. Ces projections sont en tout cas unilatérale, et mettent en jeu, toujours unilatéralement, les neurones du PVH et de l'ARC, via des neurones orexines (Stratford, 2005).

La réponse au liking issue de l'AccSh dépend de l'interaction de nombreuses zones centrales et ces relations sont encore mal connues. Elles impliqueraient, outre le LH de nombreuses zones hypothalamiques, comme le VMH et le DMH (Will *et al.*, 2003) et surtout le noyau central de l'amygdale (Kim *et al.*, 2004, Levine *et al.*, 2004b, Baldo *et al.*, 2005) ainsi que le VTA (Will *et al.*, 2003, MacDonald *et al.*, 2004). Ces connections sont indispensables à l'élaboration du liking. Au sein du système limbique, le palladium ventral est fortement interconnecté avec l'AccSh. Ces deux structures forment un couple indissociable dans la réponse aux opiacés (Smith & Berridge, 2005, Smith & Berridge, 2007).

Les neurones de l'AccSh permettent donc des changements comportementaux très rapides, selon que l'environnement est ou non favorable à l'ingestion, et le système opioïde favorisant les régimes à très haute densité énergétique, procure un avantage évolutif indéniable. L'AccSh apparaît donc comme une région "sentinelle" (Kelley, 2004), en éteignant ou en allumant le LH selon les conditions environnementales (danger vs abondance ponctuelle de nourriture).

Dans ce cadre, les protéines, dont la faible palatabilité est connue (cf II.2.1), seraient susceptibles de moins activer les réseaux du liking de l'AccSh par rapport aux autres macronutriments, contribuant ainsi à l'effet anorexigène des protéines.

I.3.2.2 Wanting et système dopaminergique

I.3.2.2.1 Action de la dopamine dans l'AccSh

Le système dopaminergique est à la base du wanting. Les corps cellulaires des neurones dopaminergiques sont majoritairement situés dans le VTA ainsi que dans la substance noire. Ces neurones projettent vers de nombreuses régions dont l'AccSh. La libération de dopamine dans l'AccSh active les récepteurs D1 et D2 à la dopamine. Cependant, l'effet de cette sécrétion de dopamine dans les synapses de l'AccSh demeure controversé. En effet, la lésion des neurones dopaminergiques entraîne une profonde dépression de la prise alimentaire, tout comme l'injection d'inhibiteur des récepteurs D1 ou D2. De même, les souris sur exprimant la dopamine augmentent leur prise alimentaire (Pecina *et al.*, 2003). Cet effet orexigène de la dopamine est totalement séparé du liking comme l'ont montré les tests comportementaux (Berridge & Robinson, 1998, Wyvell & Berridge, 2000, Pecina *et al.*, 2003) et est bien relatif au wanting. Dans ce cadre, le système dopaminergique servirait de signal déterminant une prise de décision consciente ou inconsciente vis-à-vis d'un stimulus, et serait impliqué dans les phénomènes de renforcements comportementaux, en étant d'autant plus activé que la récompense suivant le stimulus est forte par rapport à celle espérée (Schultz, 2002). Le rôle exact de la dopamine reste cependant complexe. Il semble en effet que la sécrétion de dopamine pourrait jouer sur les comportements moteurs liés à la faculté de s'alimenter plus que sur le contenu de l'alimentation en lui-même (Baldo *et al.*, 2002, Bassareo *et al.*, 2002, Kelley, 2004). En outre, leur action pourrait passer par une coopération avec les afférences glutamatergiques arrivant dans l'AccSh en modulant la sécrétion de glutamate sur les neurones GABA (Kiyatkin, 2002, Hara & Pickel, 2005).

Les neurones contenant des opioïdes seraient également impliqués en tant que modulateur de l'activité des neurones dopaminergiques au sein du VTA, et moduleraient la sécrétion de dopamine dans les synapses de l'AccSh (MacDonald *et al.*, 2004). Le système opioïde aurait donc un rôle dans la hausse de la motivation à manger chez l'animal rassasié.

I.3.2.2.2 Manger : une addiction ?

La mise en jeu d'une forme d'hédonisme involontaire amène aujourd'hui certains auteurs à rapprocher le comportement alimentaire dérégulé des personnes en surpoids ou obèses à celui de personnes dépendantes d'une drogue. L'implication du système

opioïdergique dans la surconsommation d'aliments palatables (généralement gras et sucrés) et l'interaction avec l'activation conjointe du système dopaminergique dans l'AccSh, qui joue un rôle prépondérant dans le wanting vis-à-vis des dépendances aux drogues, replace l'aliment dans un contexte hédonique où il agirait au niveau de l'AccSh comme le ferait une drogue. Tout comme la consommation de narcotiques, celle d'aliments se ferait alors en dépit des conséquences connues et délétères de leur ingestion

Dans ce cadre, une sur exposition répétée à des stimuli de renforcements, comme les aliments très palatables, entraîne une addiction à ces aliments. A ce niveau, la part inconsciente du wanting (incentive salience) serait à l'origine des comportements compulsifs (Kelley & Berridge, 2002), également observés lors de consommation de drogues en libre accès (Johanson *et al.*, 1976). Les similarités d'action entre les deux phénomènes sont d'ailleurs soulignées par deux exemples. La disponibilité des récepteurs à la dopamine (et donc la capacité d'activation) est diminuée chez les obèses dans les mêmes proportions que chez les consommateurs de drogues (Wang *et al.*, 2001). En outre la leptine, qui comme nous l'avons vu est un puissant régulateur de la balance énergétique, module le système de récompense (Fulton *et al.*, 2000) et réduit également les probabilités de rechutes chez les animaux en sevrage (Shalev *et al.*, 2001).

Les thérapies visant à réduire la prévalence de l'obésité doivent donc s'inspirer de ce qui a déjà été réalisé dans le cas de traitement contre les addictions (comme l'alcool ou la cigarette) (Volkow & Wise, 2005), et doivent nécessairement prendre en compte l'impact des traitements sur le système de récompense afin de pérenniser les pertes de poids et d'éviter les très nombreuses rechutes qui sont actuellement observées chez ces patients.

II. Satiété induite par les protéines : observations et hypothèses

Parmi les trois macronutriments, les protéines apparaissent généralement comme possédant le pouvoir satiétogène le plus élevé chez le rat et l'homme (Booth *et al.*, 1970, Teff *et al.*, 1989, French *et al.*, 1992, Hill *et al.*, 1993, Porrini *et al.*, 1997, Reid & Hetherington, 1997, Long *et al.*, 2000, Bensaid *et al.*, 2002) (**Figure 20 et tableau 1**). Ces différences quant aux effets des macronutriments ont été observées chez des sujets dans différents états physiologiques ou physiopathologiques ainsi que dans différents cadres méthodologiques, faisant varier la durée de la charge ou sa voie d'administration, intragastrique, intraduodénale ou intraveineuse (Geliebter, 1979, Rolls *et al.*, 1988, Barkeling *et al.*, 1990, Burton-Freeman *et al.*, 1997, Reid & Hetherington, 1997, Trigazis *et al.*, 1997).

II.1 Protéines et satiété

II.1.1 Effet satiétogène des régimes HP

Un régime est dit hyperprotéique dès que son apport en acides aminés est largement supérieur aux recommandations nutritionnelles. Au-delà d'un certain seuil protéique dépendant de l'animal (par exemple 45% P/E chez le rat Wistar adulte), l'adaptation à court terme est insuffisante et se traduit immédiatement par une diminution de la prise alimentaire. ***Un régime dont la teneur protéique dépasse ce seuil sera qualifié d'hyperprotéique (HP)*** (Harper & Peters, 1989).

Chez le rat adapté à un régime normoprotéique (NP), la transition de ce régime vers un régime HP induit une dépression de la prise alimentaire après le début de l'ingestion suivie d'un retour progressif mais incomplet à la prise énergétique correspondant au régime NP, au cours des jours suivants (Anderson *et al.*, 1968, Peret *et al.*, 1984, Peters & Harper, 1985, Semon *et al.*, 1987, Tews *et al.*, 1992, Jean *et al.*, 2001, Morens *et al.*, 2001, Bensaid *et al.*, 2003) (**Figure 21**). Plus précisément, le passage vers le régime HP contenant 55% de protéines (P/E), se traduit par une diminution de la taille des repas, qui retourne progressivement par la suite à la taille correspondant au régime NP (Bensaid *et al.*, 2002). En d'autres termes, le régime HP est plus rassasiant, mais cet effet disparaît lorsque le rat est adapté à ce régime, alors que l'effet satiétogène persiste (Bensaid *et al.*, 2003). Une étude a montré que l'ingestion d'un régime HP contenant 50% de protéines (P/E) se traduisait également chez le singe par une

dépression de la prise alimentaire (Hannah *et al.*, 1990). Par contre, il n'y a pas eu d'adaptation à ce régime pendant la période expérimentale (3 à 6 semaines).

II.1.2 Satiété des charges HP

II.1.2.1 Pertinence du modèle

L'étude de la transition d'un régime NP vers un régime HP chez le rat, même si elle est très utile pour étudier la satiété induite par les protéines, présente certains inconvénients lorsqu'on essaie de transposer ce modèle à l'être humain. Ainsi, les quantités nécessaires pour alimenter un être humain à 55% P/E excèdent très largement les consommations usuelles relevées par les études épidémiologiques (FAO/WHO, 1990) et même les consommations de certains milieux sportifs (comme la musculation). Outre le coût économique d'un tel régime (les protéines alimentaires étant le macronutriment le plus onéreux), les conséquences physiologiques à long terme d'un tel régime doivent être prises en considération et elles restent encore actuellement controversées, en particulier concernant l'action sur la physiologie rénale (Rudman, 1988) ou la déminéralisation osseuse (Pannemans *et al.*, 1997, Heaney, 1998, Massey, 1998).

De ce fait, il peut sembler plus judicieux dans une optique de modification de comportement alimentaire chez l'être humain, d'étudier l'introduction de « repas » ou d'« en-cas » hyperprotéiques.

II.2.2.2 Effet des charges HP

De nombreuses études ont ainsi démontré que l'enrichissement d'un repas en protéines (à un niveau hyperprotéique) entraîne une augmentation du rassasiement induit par ce repas, et réduit la prise alimentaire lors du repas suivant (Porrini *et al.*, 1997, Stubbs *et al.*, 1999, Araya *et al.*, 2000). De plus, l'introduction, avant un repas, d'un « en-cas » hyperprotéique réduit la prise alimentaire lors du repas suivant (Rolls *et al.*, 1988, Poppitt *et al.*, 1998). Chez l'homme (Marmonier *et al.*, 2000) comme chez le rat (Burton-Freeman *et al.*, 1997), les charges HP augmentent la période interprandiale suivant l'ingestion de la charge, comparativement aux autres macronutriments.

Certains paramètres peuvent cependant faire varier le pouvoir satiétogène des charges HP. La quantité de protéines ingérées et l'énergie des en-cas doivent excéder une valeur minimum d'environ 150 kcal (Booth, 1988, Porrini *et al.*, 1997) ou 25g de protéines (Anderson

et al., 2004) pour avoir un effet significatif sur la satiété. Une assimilation trop rapide d'un en-cas trop peu énergétique diminuerait en effet ses capacités de régulation sur le repas suivant (Porrini *et al.*, 1997).

De plus, le délai entre l'en-cas protéique et le repas influence largement la capacité de régulation du premier sur le second. L'en-cas possède un effet maximal s'il est placé juste avant le repas (Porrini *et al.*, 1997), son effet reste important dans un délai d'une heure (Anderson *et al.*, 2004), et perdure pendant les trois heures suivant l'ingestion de l'en-cas (Booth *et al.*, 1970, Bowen *et al.*, 2006a).

D'autre part, l'introduction de charges HP a certes un effet sur la prise alimentaire lors du repas suivant, mais les études précédemment citées n'ont généralement pas mesuré d'effets sur la prise alimentaire à l'échelle de la journée et la quasi-totalité des études ne portent que sur quelques jours. Il n'y a donc pas vraiment de données disponibles sur l'impact de l'introduction d'un en-cas ou d'un repas hyperprotéique sur la consommation énergétique globale des individus et donc sur un éventuel effet sur une perte de poids. En outre, les phénomènes de compensation observés après habitude avec un régime HP n'ont pas encore été étudiés avec des charges HP.

II.1.3 Effet de la nature des protéines

Si l'effet satiétogène des protéines est maintenant bien connu et communément accepté, l'impact de la nature de la protéine sur cet effet reste très controversé.

La comparaison de l'effet satiétogène entre des protéines de nature différente requiert comme condition préalable des protéines bien équilibrées en acides aminés indispensables^{vi} (AAI), puisqu'une carence ou déficience en AAI induit une dépression de prise alimentaire dont l'origine n'est pas satiétogène mais liée à une aversion gustative conditionnée (partie C I.1).

De nombreuses protéines présentant des compositions en AAI variées mais cependant bien équilibrées possèdent des pouvoirs satiétogènes similaires, comme les protéines totales de lait, de soja, de gluten et de pois (Lang *et al.*, 1998, L'Heureux-Bouron *et al.*, 2004b, Bowen *et al.*, 2006a). Les protéines animales et végétales n'ont pas, a priori, de pouvoirs satiétogènes différents. Il est intéressant de noter que ces pouvoirs satiétogènes sont similaires malgré des

^{vi} Les organismes vivants utilisent les acides aminés comme précurseurs pour la synthèse protéique. Chez un organisme donné, un acide aminé est dit indispensable lorsque le gène permettant sa synthèse est absent. La survie de l'organisme nécessite alors l'apport de cet acide aminé par l'alimentation. Une protéine est dite bien équilibrée si elle apporte suffisamment d'AAI par rapport aux besoins de l'animal.

variations post ingestives en acides aminés plasmatiques ainsi qu'en sécrétion de peptides gastro-intestinaux différents (Bowen *et al.*, 2006a, Bowen *et al.*, 2006b).

A l'inverse, au sein des protéines animales, certaines disparités existent, comme dans le cas des protéines de poissons qui semblent être plus satiétogènes que les protéines de viande (Uhe *et al.*, 1992, Borzoei *et al.*, 2006). A l'inverse, les protéines d'albumine de l'œuf seraient moins satiétogènes (Anderson *et al.*, 2004), même si ce résultat est contesté (Lang *et al.*, 1998).

La satiété des protéines peut aussi différer selon la fraction protéique utilisée. Dans le cas des protéines de lait, les protéines de lactosérum induiraient une satiété plus forte que les caséines (Hall *et al.*, 2003), sans doute en raison d'une vidange gastrique et d'une absorption intestinale plus rapide dans le cas des protéines de lactosérum (Boirie *et al.*, 1997). La satiété des protéines peut également être modulée par l'association avec d'autres nutriments, en particulier les fibres, qui peuvent potentialiser le pouvoir satiétogène de certaines protéines comme dans le cas des mycoprotéines (Turnbull *et al.*, 1993, Williamson *et al.*, 2006).

II.2 Les différentes hypothèses expliquant la réduction de la prise alimentaire induite par les protéines

La dépression de la prise alimentaire induite par les protéines est due à un pouvoir satiétogène plus important de ce macronutriment. Cependant, l'origine précise de ce phénomène reste mal comprise. Comme nous l'avons vu, les nutriments et en particulier les protéines sont susceptibles d'activer le nerveux central soit directement par voie humorale (par l'intermédiaire de l'ARC et de l'area postrema) soit par voies nerveuses, par l'intermédiaire du nerf vague. L'activation du NTS par un régime hyperprotéique est différente avant ou après habitude (Darcel *et al.*, 2005a), en raison de l'adaptation métabolique à ce régime qui s'accompagne d'une diminution de la satiété induite par ce régime. Les différentes formes protéiques issues de la digestion (AA, peptides, protéines intactes) mobilisent des systèmes différents. En particulier, les peptides sont susceptibles de se lier avec des récepteurs spécifiques (Pupovac & Anderson, 2002), ce qui peut expliquer les différences d'activation obtenues au niveau du NTS entre les acides aminés et les peptides (Zittel *et al.*, 1994, Phifer & Berthoud, 1998, Reidelberger *et al.*, 2003) (**Figure 22**).

II.2.1 Aversion gustative conditionnée et palatabilité

Deux hypothèses qui ont émergées ces dernières décennies ont concerné l'installation d'une éventuelle aversion gustative conditionnée ainsi que la faible palatabilité des protéines.

II.2.1.1 Aversion gustative conditionnée

II.2.1.1.1 Qu'est ce qu'une aversion gustative conditionnée ?

Face à un aliment aux propriétés organoleptiques inconnues, les êtres vivants manifestent un comportement alimentaire spécifique, appelé néophobie, qui consiste à tester les conséquences ingestives de cet aliment. De ce fait, la première ingestion est généralement faible, et si elle est suivie d'effets neutres pour l'organisme, sa consommation sera réitérée, si elle est bénéfique, elle sera favorisée et si elle est néfaste (induction de malaise, ...), elle sera évitée dans le futur, parfois de manière définitive. Dans ce dernier cas se met en place une aversion gustative dite conditionnée car elle n'existait pas avant et n'est donc pas innée, contrairement à celle développée vis-à-vis des aliments amers, par exemple. Une aversion gustative conditionnée est donc un mécanisme acquis qui permet à l'animal d'éviter d'ingérer un aliment lorsque les conséquences post-ingestives liées à cette ingestion ont été expérimentées comme néfastes. Lors de l'installation d'un tel mécanisme, l'animal relie une ou plusieurs caractéristiques orosensorielles saillante(s) de l'aliment aux conséquences post-ingestives négatives. Lors de présentations ultérieures de cet aliment, l'animal évitera d'en consommer s'il en a la possibilité ou régulera sa consommation en fonction du caractère délétère de l'aliment. Cela ne signifie pas que l'aliment en lui-même est toxique, mais qu'il a été associé à une expérience de malaise. Il est alors possible de générer ce comportement en associant l'ingestion d'un aliment (par ailleurs tout à fait sain) avec l'injection d'un produit chimique provoquant un malaise (comme par exemple le chlorure de lithium) et donc de conditionner le sujet.

Ce mécanisme comprend une phase d'apprentissage (durant laquelle l'animal associe la caractéristique orosensorielle de l'aliment aux conséquences néfastes de son ingestion) qui implique, au niveau central, le noyau du tractus solitaire ainsi que le noyau parabrachial (Grigson *et al.*, 1998, Sclafani *et al.*, 2001), situé dans le tronc cérébral, ainsi que l'amygdale (Aja *et al.*, 2000), situé dans la région hypothalamique. Une fois l'aversion installée, la

présence des noyaux du tronc cérébral n'est plus nécessaire à la reproduction du comportement aversif (Grigson *et al.*, 1997), contrairement à celle de l'amygdale (Aja *et al.*, 2000).

II.2.1.1.2 Aversion gustative conditionnée et régime HP

Mis en présence d'un choix entre des régimes HP et NP, les rats choisissent naturellement le régime NP, a fortiori si le régime HP a été présenté précédemment (Harper & Peters, 1989, Tews *et al.*, 1992). Ce comportement d'évitement du régime HP a amené de nombreux auteurs à soupçonner la présence d'une aversion gustative conditionnée (Semon *et al.*, 1987, Harper & Peters, 1989, Tews *et al.*, 1992).

En effet, un régime hyperprotéique pourrait engendrer une aversion alimentaire conditionnée notamment par l'augmentation d'ammoniémie plasmatique et cérébrale (Semon *et al.*, 1988, Semon *et al.*, 1989). L'oxydation du surplus d'acides aminés exogènes serait responsable d'une augmentation immédiate de la production d'ammoniaque débordant temporairement le double système de détoxification hépatique (Herrero *et al.*, 1994). Ces effets seraient plus ou moins marqués en fonction de la nature et de la quantité de l'acide aminé en excès, du type de régime (notamment sa teneur protéique), de l'âge de l'animal et de la disponibilité de l'acide aminé au niveau tissulaire (Harper *et al.*, 1970, Tews *et al.*, 1984).

Une manière d'étudier si les animaux développent une aversion gustative conditionnée suite à l'ingestion d'un régime HP est d'enregistrer la séquence comportementale de satiété (BSS) de ces animaux. Cette méthodologie, élaborée dans les années 60, consiste à filmer ou à observer directement le comportement des animaux durant le début (généralement la première heure) d'un repas couplé ou non avec l'injection d'une molécule active, à classer ces comportements en différentes catégories plus ou moins subdivisées, puis à regarder la part de chaque comportement dans une tranche de temps donné (1 ou 5 minutes la plupart du temps). Les différents stimuli sont alors capables de faire varier la part relative des comportements, voire l'ordre de prépondérance de ces comportements. Une BSS classique voit s'enchaîner selon une séquence bien définie repas : activité/nettoyage puis repos. Un point important de la BSS correspond au moment où la courbe du temps consacrée à la prise alimentaire croise celle correspondant au repos. Ce point définit la vitesse de la BSS.

Un stimulus anorexigène va accélérer la BSS (le point de transition repas/repos apparaît plus tôt), là où un stimulus orexigène va la ralentir (Rodgers *et al.*, 2000, Ishii *et al.*, 2004) (**Figure 23**). Une molécule notoirement aversive comme le chlorure de lithium va désorganiser cette BSS en diminuant l'activité (Ishii *et al.*, 2004). Dans ce cas, les animaux

augmentent la durée de leur repas tout en diminuant leur prise alimentaire, ce qui diminue leur vitesse d'ingestion (Ishii *et al.*, 2004), là où un stimulus satiétogène ne joue que sur la taille des repas et non la vitesse d'ingestion. En outre, un stimulus moins palatable va également modifier la BSS en la ralentissant voire en abolissant l'apparition du repos dans le cas de stimulus très amers (Ishii *et al.*, 2003). Dans ce cas, les animaux réessaient périodiquement et « creusent » dans leur gamelle dans l'espoir d'obtenir un goût plus agréable.

L'étude de la BSS a montré que, après adaptation, les rats nourris avec des régimes HP ne modifiaient pas l'ordre normal de cette séquence (repas/nettoyage/activité/repos) ni leur importance relative (Bensaid *et al.*, 2003) (**Figure 24**). En outre, ces régimes ne font pas varier la vitesse d'ingestion mais jouent essentiellement sur la taille du repas (Bensaid *et al.*, 2003). Ces divers éléments confirment que l'anorexie induite par les régimes hyperprotéiques n'est pas de type aversif et est bien de nature satiétogène.

II.2.1.2 Palatabilité

La palatabilité désigne la composante affective alimentaire chez l'homme comme chez l'animal. La palatabilité dépend pour une large part des propriétés intrinsèques des aliments notamment de leurs propriétés organoleptiques (qui déterminent les composantes discriminatives qualitatives et quantitatives des sensations olfactives et gustatives alimentaires). Cependant, la palatabilité ne doit pas être confondue avec les propriétés organoleptiques. En effet, la palatabilité d'un même aliment (donc sa perception affective) peut être très variable d'un moment à l'autre selon l'état énergétique interne du sujet, son histoire alimentaire (qui détermine des conditionnements), et aussi en fonction de facteurs environnementaux comme la température ambiante la présence ou l'absence d'autres sources alimentaires. Il ne faut cependant pas confondre la palatabilité d'un aliment avec le fait que l'individu ait envie ou non de le manger (appétit) (Berridge, 1996).

Il est connu depuis longtemps que la palatabilité des régimes hyperprotéiques est faible (McArthur *et al.*, 1993) et variable selon la nature des protéines utilisées (Scott & Quint, 1946), sans pour autant que cette variation influence la dépression de la prise alimentaire induite par les régimes HP (Semon *et al.*, 1987). Ce phénomène se produit avant même les premiers effets métaboliques liés à l'ingestion du régime HP et, bien que la néophobie puisse jouer un rôle, la faible palatabilité initiale du régime serait un facteur significatif de la dépression immédiate de la prise alimentaire (McArthur *et al.*, 1993).

D'une façon plus générale, d'autres équipes ont tenté d'aborder ce problème modifiant les propriétés orosensorielles de régimes expérimentaux en ajoutant des arômes ou des substances désagréables (citral, eucalyptol, quinine ou sucro octa acétate) (Le Magnen, 1999) dans des régimes témoins. Leurs expérimentations montrent que, lorsque les animaux n'ont que le régime peu palatable à manger, cela ne provoque qu'une baisse transitoire de la prise alimentaire et que la quantité d'énergie ingérée redevient rapidement similaire à celle des groupes témoins. La palatabilité n'influencerait alors la prise alimentaire qu'à très court terme, et n'aurait donc qu'une faible part dans les phénomènes induits par les régimes hyperprotéiques.

II.2.2 Facteurs pré-absorptifs influençant l'action des protéines

II.2.2.1 Régulation du volume gastrique

Une fois passée la sphère oro-pharyngée, les nutriments arrivent dans l'estomac et commencent à le remplir. Cette partie de la digestion est primordiale dans l'apparition des sensations de rassasiement/satiété, et de ce fait, de nombreuses hypothèses expliquant la réduction de la prise alimentaire induite par les protéines prennent corps par l'action de ces dernières au niveau gastrique. Deux paramètres sont très importants dans ce processus : la vidange gastrique (en particulier sa vitesse) et les différentes réactions chimiques qui se déroulent dans l'estomac.

II.2.2.1.1 Principes et dynamique de la vidange gastrique

La vidange gastrique est un phénomène destiné à contrôler la quantité de nutriments libérée dans le duodénum, qui suit immédiatement le pylore. L'estomac peut être considéré comme un ballon, se gonflant progressivement au début du repas. Cependant, cet organe ne pouvant s'étendre indéfiniment, sa vidange est également un mécanisme de préservation destiné à lui faire garder une certaine élasticité mise en péril à force d'être trop distendue (ce qui est d'ailleurs souvent observé dans le cas des personnes obèses). La dynamique de vidange gastrique va donc comprendre différentes phases, durant lesquelles le volume de l'estomac, la pression en son sein et la tension dans ses parois vont varier.

La vidange gastrique n'est pas « nutriment dépendante » mais largement « énergie dépendante ». La quantité d'énergie transitant par le pylore suite à l'ingestion d'un repas est constante pour des macronutriments de densités énergétiques comparables (Hunt & Stubbs,

1975, Kalogeris *et al.*, 1983, Maerz *et al.*, 1994). Cependant, dans le cas d'aliments à forte densité énergétique, la régulation est moins fiable, et la quantité d'énergie qui transite est plus importante. Il existe alors une relation linéaire entre la densité énergétique et la vitesse de transit énergétique vers le duodénum (Hunt & Stubbs, 1975, Calbet & MacLean, 1997).

Ce modèle n'est cependant valide qu'après les premières minutes d'un repas (phase de remplissage de l'estomac). En effet, les premiers instants du repas se traduisent par une forte augmentation du volume gastrique. A ce moment là, le pylore reste ouvert, ce qui entraîne une fuite rapide des nutriments vers le duodénum sans réelle régulation (van der Velde *et al.*, 1999). Le remplissage du duodénum et celui de l'estomac sont donc concomitants. Ce phénomène se poursuit jusqu'à ce que le volume gastrique se stabilise, « entraînant » la fermeture du pylore (Kaplan *et al.*, 1992). Ce mécanisme vise à préserver l'estomac d'une distension trop importante, mais signifie également que si certains aliments provoquent une hausse de volume plus longue que d'autres (sans pour autant entraîner un volume gastrique plus important), la phase non régulée, durant laquelle la vidange est beaucoup plus rapide qu'après la fermeture du pylore (que nous appellerons phase régulée), sera plus longue, et donc l'apport intestinal initial plus important.

La vidange gastrique est un phénomène indissociable du duodénum. En effet, le duodénum, par un système de rétrocontrôle, régule l'ouverture ou la fermeture du pylore et donc le flux de nutriments transitant de l'estomac vers le duodénum (Schwartz & Moran, 1998). C'est donc le duodénum qui régule le volume gastrique, afin d'assurer un approvisionnement approprié pour permettre une absorption optimale à son niveau.

II.2.2.1.2 Rassasiement induit par l'estomac

L'estomac peut à lui seul induire la fin d'un repas, en cas de volume gastrique important, qui peut être favorisé, dans un cadre expérimental, par une occlusion du pylore (Phillips & Powley, 1996, Eisen *et al.*, 2001). Le signal est alors de nature purement mécanique et non pas nutriment dépendant (Powley & Phillips, 2004), et la stimulation indépendante de la nature du contenu de l'estomac. Les résultats sont notamment similaires dans le cas d'une solution saline ou contenant des macronutriments (Phillips & Powley, 1996, Eisen *et al.*, 2001), contrairement au rassasiement induit au niveau du duodénum qui est nutriment dépendant (Schwartz & Moran, 1998). Même si la stimulation de l'estomac *per se* est suffisante à l'obtention de l'arrêt du repas, les volumes requis (pylore fermé) sont plus

importants que ceux observés dans le cas d'une digestion libre (pylore ouvert) ce qui suggère un effet synergique de la connexion estomac-pylore (Powley & Phillips, 2004, Ritter, 2004).

L'estomac détecte les variations de volume grâce à des récepteurs mécano-sensibles situés dans sa paroi, en particulier des récepteurs de tension (Berthoud & Powley, 1992). Il envoie des signaux de rassasiement grâce à l'innervation vagale de cette paroi (Berthoud *et al.*, 1991). Ces signaux sont volume dépendants et non nutriment dépendants (Mathis *et al.*, 1998). Ainsi, une section des branches du nerf vague innervant l'estomac entraîne une augmentation de la prise alimentaire lors du repas ou à court terme (Schwartz *et al.*, 1999) et élimine la diminution de la prise alimentaire induite par la distension gastrique (Phillips *et al.*, 1997, Phillips & Powley, 1998). La régulation de la vidange gastrique, nutriment et énergie dépendante, issue du rétrocontrôle de l'intestin vers l'estomac, est elle aussi abolie par vagotomie (Schwartz *et al.*, 1993), ainsi que la détection intestinale des nutriments (Yox *et al.*, 1991, Sclafani *et al.*, 2003). Ces informations sont transmises vers le cerveau dans des régions qui régulent le comportement alimentaire à court terme (cf I) et suivent une boucle vago-vagale (Raybould, 1991, Raybould & Holzer, 1992, Schwartz & Moran, 1998, Travagli *et al.*, 2003) qui permet la régulation de la vidange gastrique.

II.2.2.1.3 Régulation de la vidange gastrique par les protéines

Les protéines possèdent des propriétés qui rendent leur vidange assez particulière. Une concentration élevée en protéines pourrait en effet ralentir la vidange gastrique en raison d'une précipitation de certaines protéines au pH gastrique (en particulier les caséines) qui empêchent une action normale de dégradation par la pepsine (Peraino *et al.*, 1959). De plus, les protéines contribuent à la sécrétion de cholecystokinine (CCK) au niveau des cellules endothéliales du duodénum (Raybould, 1991), qui entraîne un ralentissement de la vidange gastrique (Zhao *et al.*, 1997). Ce phénomène serait susceptible de produire un volume gastrique plus important suite à l'ingestion de protéines ou du moins un volume restant plus longtemps important. Il existe une forte variabilité entre les différentes protéines quant à la vitesse de vidange gastrique, selon les propriétés physico-chimiques de chacune, leur quantité et leur structure (Rogers *et al.*, 1960, Rolls *et al.*, 1972) ainsi que par la présence d'autres macronutriments (Rosenthal & Nasset, 1958, Peraino *et al.*, 1959, Buraczewski *et al.*, 1971).

II.2.2.2 Digestion stomacale et intestinale : détection des nutriments dans le duodénum

Les phénomènes de digestion qui se produisent dans l'estomac sont à l'origine de variations potentielles du pouvoir satiétogène des nutriments ingérés. De ce fait, les études introduisant directement des nutriments dans le duodénum présentent une limite méthodologique, en particulier pour les protéines.

Les protéines présentent en effet l'intérêt d'être fonctionnelles sous différentes formes issues de la digestion. Les protéines sont généralement administrées sous forme de protéines entières. Dans l'estomac, des enzymes clivent ces protéines en peptides ou en polypeptides, qui sont ensuite à nouveau séparés en acides aminés et di-tri peptides dans le duodénum avant absorption. Cependant, selon la nature de la protéine et le type d'enzymes présentes dans l'estomac, ainsi qu'en fonction du temps de présence de ces protéines dans l'estomac, les peptides formés sont différents. Or ces peptides peuvent être en eux-mêmes actifs, soit en temps que ligands de récepteurs situés sur les cellules endothéliales de l'intestin (Pupovac & Anderson, 2002) soit suite à une absorption sans dégradation par ces mêmes cellules et un passage dans la circulation générale. Dans le cas de protéines plus « digestibles » et/ou au transit gastrique plus rapide, le flux d'acides aminés absorbés est plus important, ce qui entraîne une hausse plus rapide et plus importante d'acides aminés sanguins, et donc potentiellement une augmentation de la satiété (théorie aminostatique cf II.2.3.1).

Au niveau intestinal, les protéines activent le nerf vague de façon paracrine par l'intermédiaire de peptides intestinaux et en particulier la CCK, produite par les cellules entéroendocrines (Berthoud & Patterson, 1996). La stimulation de la sécrétion de ces neuropeptides pourrait intervenir par le biais de récepteurs spécifiques aux acides aminés au niveau de la muqueuse de l'intestin grêle (Jeanningros, 1982). Les protéines ou plus vraisemblablement les peptides issus de la digestion intestinale activeraient aussi la sécrétion de CCK par le biais du récepteur aux oligopeptides Pept1 (Darcel *et al.*, 2005b). La CCK sécrétée sous l'effet des aliments ou des nutriments absorbés possède différentes actions : elle inhibe la prise alimentaire (Gibbs *et al.*, 1973b), et elle ralentit la vidange gastrique (Lal *et al.*, 2004). Son action passe par une activation des terminaisons vagues (Schwartz *et al.*, 1991) dans le duodénum et elle est aussi susceptible d'agir directement au niveau central en tant qu'agent anorexigène (Reidelberger *et al.*, 2004).

Cependant, si la chémosensibilité duodénale contribue à certains aspects du rassasiement, elle ne peut rendre compte seule de cette fonction. Ainsi une vagotomie sous-

diaphragmatique totale chez le rat ne supprime pas mais au contraire intensifie la dépression de la prise énergétique induite par le passage à un régime HP (L'Heureux-Bouron *et al.*, 2003). Cette intensification de la dépression alimentaire apparaît dès le premier jour et se maintient même après adaptation au régime HP. Ces observations indiquent d'une part que des signaux non vagues sont impliqués dans la détection du régime HP, du moins chez les rats vagotomisés, et d'autre part confirment le fait que les rats vagotomisés diminuent leur ingestion de protéines. Les détections vagues des protéines/AA dans l'intestin et les variations de concentration en acides aminés dans la circulation hépato-portale (également détectées par le nerf vague) ne constituent donc pas les seules informations menant à la dépression de la prise énergétique induite par les régimes HP. Ces résultats n'excluent pas une participation du système sympathique (splanchnique) dans les informations originaires du foie et du tube digestif. En effet, on présume que les rats ayant subi une vagotomie sub-diaphragmatique ont rencontré quelques difficultés dans l'ingestion du régime HP, parce que durant la phase de transition et même après adaptation, ils ont mangé significativement moins que les rats témoins nourris avec le même régime. Une anomalie dans le contrôle vagal de l'estomac (ralentissement de la vidange gastrique) pourrait être une raison pour laquelle les rats vagotomisés consommant le régime HP ont des difficultés à réguler le taux d'acides aminés libérés et absorbés, renforçant ainsi les signaux métaboliques périphériques et causant une dépression de la prise alimentaire.

II.2.3 Facteurs post-absorptifs

II.2.3.1 La théorie aminostatique

Chez des rats nourris avec un régime hyperprotéique, on observe dès le premier jour une diminution de la prise alimentaire et une élévation du taux sanguin et dans une moindre mesure cérébral, d'acides aminés indispensables, notamment les acides aminés ramifiés (Peters & Harper, 1987). Après adaptation, le retour à la norme de ces taux circulants, par stimulation du catabolisme de ces acides aminés, s'accompagne d'une normalisation de la prise alimentaire (Peters & Harper, 1985). Ainsi, les variations des taux plasmatiques et intra cérébraux d'acides aminés sembleraient conditionner la prise alimentaire à court terme (repas suivant).

La relation entre le taux d'acides aminés circulants et l'appétit, dite théorie aminostatique, a été élaborée par Mellinkoff (Mellinkoff *et al.*, 1956). Il a déterminé sur des sujets humains qu'il existe une relation inverse entre le taux d'acides aminés circulant et

l'appétit, ainsi qu'entre glycémie et appétit, quelque soit le mode d'administration. Cependant cette étude seule ne suffit pas, d'après l'auteur lui-même, à trouver l'explication causale du phénomène observé, en raison de l'existence de contre exemples (diabétiques hyperphagiques à forts taux d'acides aminés circulants, anorexiques avec faibles taux d'acides aminés).

Cette hypothèse a été battue en brèche par Anderson (Anderson *et al.*, 1994) dont les travaux ont montré que l'hypothèse aminostatique n'est pas applicable à court terme. L'administration de protéines (ou de l'équivalent en acides aminés) entraîne bien une dépression de la prise alimentaire, mais sans liens corrélatifs avec les taux circulants d'AA plasmatiques et cérébraux dans l'intervalle de temps précédant la dépression de la prise alimentaire. Les modifications induites des profils plasmatiques et cérébraux d'AA sont alors inconsistantes ou inexistantes.

Certaines catégories d'AA peuvent cependant subir des variations quant à leurs taux plasmatiques et cérébraux suite à l'ingestion d'un régime HP. Aucune différence n'est observable entre les AA indispensables ou non quant à une différence de pouvoir satiétogène (Anderson *et al.*, 1994), en revanche, les AA branchés plasmatiques et cérébraux augmentent après une ingestion aiguë ou chronique d'un régime protéique (Harper & Peters, 1989, Morens *et al.*, 2000, Morens *et al.*, 2001). Il a en outre été montré grâce à l'utilisation de la technique de microdialyse que certaines régions cérébrales spécifiques (noyau paraventriculaire, aire médiale pré-optique, mais pas l'hypothalamus latéral) montraient des variations de profils de certains AA (AA branchés, méthionine ...) suite à l'ingestion d'un repas hyperprotéique (Currie *et al.*, 1995, Choi *et al.*, 1999, Choi *et al.*, 2000, Choi *et al.*, 2001).

Dans le cas de la leucine, il semblerait effectivement que ces variations centrales pourraient jouer sur la régulation du comportement alimentaire. Les acides aminés, et en particulier les acides aminés branchés, comme la leucine, pourraient également jouer un rôle dans la régulation centrale de l'appétit sans passer par l'intermédiaire de la synthèse d'un neurotransmetteur. Les travaux récents de Cota *et al.* (Cota *et al.*, 2006) montrent en effet qu'une injection centrale de leucine induit une activation de la voie de signalisation du mTOR elle-même à l'origine d'une réduction de la prise alimentaire (**Figure 25**). Le mTOR (mammalian target of rapamycin) est une sérine-thréonine kinase connue pour son rôle dans l'intégration des flux énergétiques au sein de la cellule (Sabatini *et al.*, 1994, Schmelzle & Hall, 2000). Ces travaux semblent montrer que si la voie de signalisation du mTOR était décrite jusqu'ici comme un carrefour des grandes orientations métaboliques cellulaires, elle aurait également un rôle à jouer en tant que régulateur central de la prise alimentaire. Ces deux

aspects du mTOR en feraient un acteur clé du maintien de l'homéostasie énergétique. Le mTOR colocalise surtout dans les neurones NPY que les neurones POMC (Cota *et al.*, 2006). Cette hypothèse est cependant aujourd'hui controversée en raison de résultats différents obtenus par supplémentation en leucine chez l'Homme (Laviano *et al.*, 2006).

Enfin, certains AA indispensables sont également des précurseurs de neurotransmetteurs, comme le tryptophane, précurseur de la sérotonine, médiateur connu pour inhiber l'appétit (Latham & Blundell, 1979). Mais, la relation entre la teneur en sérotonine cérébrale et la teneur en protéines du régime n'a pas été confirmée, hormis paradoxalement dans le cas du régime sans protéine, qui s'accompagne d'une teneur en sérotonine élevée (Harper & Peters, 1989). Une forte charge d'histidine (précurseur de l'histamine) induit une forte dépression de la prise alimentaire du fait d'une augmentation de la concentration d'histamine cérébrale (Mercer *et al.*, 1990), qui active certaines régions de l'hypothalamus (Yoshimatsu *et al.*, 2002). Cependant, les quantités d'histidine nécessaires pour observer cet effet sont très supérieures à celles pouvant être apportées dans le cadre d'une alimentation normale (Anderson & Li, 1987).

II.2.3.2 La théorie glucostatique

Le glucose est le substrat énergétique préférentiel de l'organisme, principalement pour les organes gluco-dépendants comme le cerveau. En fonction des conditions nutritionnelles, l'organisme ajuste en permanence les niveaux de glucose sanguin de manière à assurer l'homéostasie glucidique. En l'absence de source exogène de glucose (en particulier durant les périodes post-prandiales ou de jeun), différents substrats peuvent être utilisés comme précurseurs de glucose : le glycérol, les acides aminés et le lactate. Leur utilisation préférentielle dépend de l'état nutritionnel de l'individu. Durant la période post prandiale, suite à l'ingestion d'un repas hyperprotéique chez des rats adaptés à ce régime, il y aurait néoglucogenèse (production de glucose au niveau hépatique à partir des acides aminés) mais aussi de façon concomitante utilisation du glucose produit dans la cellule hépatique à des fins de glycogénogenèse (Azzout-Marniche *et al.*, 2007). L'ingestion d'un régime HP entraîne en effet l'activation de la glycogénogenèse chez le rat via l'élévation de la glucagonémie (Krebs *et al.*, 2003).

Ainsi pour les tenants de la théorie glucostatique, le pouvoir satiétogène des protéines serait lié à un apport lent et prolongé du glucose issu de la néoglucogenèse et ou du glucose d'origine alimentaire. Ainsi, grâce aux squelettes carbonés fournis par les AA glucoformateurs,

comme l'alanine, la glutamine, la sérine ou encore la glycine, les régimes HP contribuent au maintien de l'homéostasie du glucose et donc à l'absence du signal de faim. Les AA glucoformateurs ne sont pas les seuls à participer à ce mécanisme. Les acides aminés branchés jouent également un rôle majeur dans le maintien de cette homéostasie (Layman, 2003), expliquant donc en partie le caractère satiétogène des régimes HP.

II.2.4 Intégration centrale de l'action des protéines

Comme nous l'avons vu, les protéines induisent une dépression de la prise alimentaire qui met en jeu des mécanismes à court terme (facteurs pré ou post-absorptifs). Ces événements viennent s'ajouter à des régulations métaboliques plus larges (moyen terme) qui dépassent le simple cadre du repas, et qui sont induites par les aliments au cours des heures suivant leur ingestion (à l'échelle de la journée). Enfin, certaines composantes de la régulation de la prise énergétique impliqueraient une modulation du comportement alimentaire à plus long terme en fonction de l'état des réserves énergétiques, en particulier des réserves adipeuses.

Ces différentes informations sont intégrées au niveau du système nerveux central (CNS) afin de générer les réponses comportementales appropriées. Les protéines, dont l'ingestion induit une réponse comportementale spécifique, sont donc susceptibles de modifier directement ou indirectement l'activité de certaines régions du CNS impliquées dans les différents niveaux de régulation du comportement alimentaire.

II.3 Un cas particulier : le rôle du cortex pyriforme antérieur (CPA) dans la détection des carences en acides aminés indispensables

La consommation de régimes déficients ou carencés en un acide aminé indispensable (AAI) entraîne des modifications profondes du comportement alimentaire, qui réduisent de manière très importante la prise alimentaire chez le rat (jusqu'à 30% de leur consommation usuelle, (Harper *et al.*, 1970, Gietzen, 2000). Ce phénomène se manifeste non seulement chez le rat, mais se retrouve plus globalement chez tous les organismes eukaryotes [voir (Gietzen & Rogers, 2006) pour revue]. Le CPA a été dans ce cas incriminé comme centre de détection des acides aminés indispensables.

II.3.1 Rôle du CPA chez le rat

II.3.1.1 Influence des régimes déficients ou carencés en acides aminés indispensables sur la prise alimentaire et sur les teneurs en acides aminés centraux

En situation de choix, les rats sont capables de choisir le régime le moins carencé, même si les différences de teneurs sont très faibles (Hrupka *et al.*, 1997). Cette baisse de prise alimentaire s'accompagne d'une aversion gustative conditionnée (Booth & Simson, 1971, Simson & Booth, 1974) qui implique le noyau central de l'amygdale ainsi que le noyau parabrachial (Gietzen, 1993, Fromentin *et al.*, 1997, Feurte *et al.*, 2000, Fromentin *et al.*, 2000, Feurte *et al.*, 2002) mais n'implique ni le goût ni l'olfaction (Leung *et al.*, 1972, Gietzen, 1993, Fromentin *et al.*, 1998, Koehnle *et al.*, 2003). Dans un contexte de choix, la présence d'un aliment déficient s'accompagne d'une capacité de l'animal à mélanger dans son alimentation différentes sources permettant d'apporter la totalité des AAI en quantités suffisantes (Gibson *et al.*, 1995, Fromentin & Nicolaidis, 1996) et donc de compenser l'aliment déficient avec un plus riche pour l'AAI concerné.

L'ingestion d'un régime carencé ou déficient en AAI se traduit par une diminution de la teneur plasmatique de cet AAI (Leung *et al.*, 1968), qui induit une diminution des concentrations cérébrales en AAI dès la première demie heure suivant le repas (Gietzen *et al.*, 1986, Koehnle *et al.*, 2004). Cette diminution apparaît en premier lieu dans le CPA (Gietzen *et al.*, 1998), puis dans d'autres zones comme l'hypothalamus latéral, dorso-médian ou le noyau parabrachial (Gietzen, 1993), alors que la prise alimentaire commence à diminuer dans un délai

très court, variant selon l'AAI déficient mais qui est le plus souvent inférieur à une demie heure suivant le repas, indépendamment de la néophobie (Koehnle *et al.*, 2003). Cette transmission de l'information à partir du CPA vers les autres zones du cerveau est confirmée par la séquence d'activation c-fos de ces régions : durant la phase de reconnaissance, le CPA est allumé en premier, puis suivent les régions hypothalamiques (Wang *et al.*, 1996a, Monda *et al.*, 1997). En phase d'apprentissage, le noyau central de l'amygdale est ensuite activé (Wang *et al.*, 1996b). En outre, la lésion de régions hypothalamiques altère la réponse anorexigène aux régimes carencés ou déficients en AAI (Bellinger *et al.*, 1998, Bellinger *et al.*, 1999).

II.3.1.2 Implication du CPA dans cette réponse anorexigène

Le rôle du CPA dans la détection des acides aminés indispensables (AAI) a pour la première fois été décrit par Leung et Rodgers (Leung & Rogers, 1971) qui à l'aide de lésions électrolytiques bilatérales réalisées dans différentes parties du CPA, ont réussi à annihiler la capacité des rats à détecter les régimes carencés en AAI et donc à réduire leur prise alimentaire (**Figure 26**). Dans cette expérience, la prise alimentaire des rats lésés était environ de 80% de celle ingérée avec le régime témoin. Ces lésions étaient effectives à un certain niveau du CPA, dans sa partie la plus antérieure (entre 2.4mm et 3.00mm par rapport au bregma) (**Figures 18 et 27**). Cependant, l'étendue rostro-caudale exacte des lésions n'est pas spécifiée de manière évidente.

Ce rôle a été confirmé dans le cas d'animaux nourris avec un régime déficient en un AAI, mais chez qui cet AAI est injecté directement dans le CPA. Les rats rétablissent alors leur consommation malgré l'absence de l'AAI dans le régime (Beverly *et al.*, 1990). La présence de l'AAI dans le CPA trompe donc le reste de l'organisme. Cependant, le CPA n'est pas la seule zone du cerveau présentant cette caractéristique. En effet, l'injection de l'acide aminé limitant dans l'hypothalamus latéral ou dans le noyau dorso-médian de l'hypothalamus (Blevins *et al.*, 2000), produit les mêmes effets que dans le CPA.

Dans la même expérience ayant montré l'implication du CPA dans la détection des régimes déficients en AAI, Leung et Rogers ont également montré qu'un régime hyperprotéique contenant de la caséine n'était pas détecté par ces rats lésés (Leung & Rogers, 1971) (**Figure 28**).

II.3.1.3 Mécanismes de détection des AAI dans le CPA

De nombreuses études menées par l'équipe de Gietzen ont permis de mettre en évidence les mécanismes intracellulaires à l'origine de cet effet. En effet, la détection des déficiences d'un régime en AAI n'est pas issue, selon les études réalisées à ce jour, d'une activation de récepteurs aux acides aminés sur la membrane des neurones « chémosenseurs », mais le résultat des variations des teneurs intracellulaires des AAI. Ainsi, l'activation des neurones du CPA est la résultante d'une cascade de réactions intracellulaires qui est identique chez tous les eukaryotes (pour revue voir (Gietzen *et al.*, 2007) (**Figure 29**). La diminution des teneurs d'AAI provoque une accumulation d'ARN de transfert (ARNt) non chargé. L'injection d'inhibiteur d'ARNt synthétase, sous forme de dérivés alcooliques des acides aminés concernés, mime l'effet anorexigène de l'ingestion d'un régime déficient en AAI (Hao *et al.*, 2005). L'accumulation d'ARNt entraîne la phosphorylation de GCN2 (general amino acid nondepressing kinase 2). Les souris k-o pour GCN2 ne répondent pas au régime déficient en AAI (Hao *et al.*, 2005), et cette kinase phosphoryle le facteur d'initiation eukaryote α (eIF2 α), qui est augmenté dans les cellules du CPA suite à un régime déficient en AAI (Gietzen *et al.*, 2004, Sharp *et al.*, 2006). Ce marquage a permis d'identifier une zone très restreinte comprenant un nombre assez faible de neurones qui seraient les véritables chémosenseurs des AAI. Le faible nombre de neurones serait compensé par la très forte capacité d'activation du CPA (Gietzen *et al.*, 2007) qui permettrait d'obtenir une réponse importante. Les étapes suivantes menant à l'activation même des neurones sont encore peu claires, mais elles mettraient en jeu le récepteur au glutamate AMPA de type GluR1, dont certaines sous unités seraient phosphorylées par pEIF2 α (Sharp *et al.*, 2004), ainsi que des variations de calcium intracellulaires. Le rôle des récepteurs AMPA est également souligné par le fait que l'injection d'inhibiteur de GluR1 empêche la détection des régimes déficients en AAI (Gietzen *et al.*, 2007).

II.3.2 Le cortex pyriforme antérieur chez l'Homme ?

Le rôle et même l'existence du CPA chez l'Homme sont plus controversés. En effet, aucune étude à ce jour n'a étudié le rôle spécifique de cette région dans la régulation du comportement alimentaire humain, et si l'histoire des pratiques culturelles dans la plupart des civilisations nous montrent qu'il y a compensation des carences en AAI des aliments de base d'une société par la culture d'un aliment contenant justement cet AAI en plus grande quantité,

aucun mécanisme central n'a été à ce jour mis en évidence pour expliquer ce phénomène. Cependant, les nombreuses études, menées chez le rat comme chez l'Homme, sur la représentation cérébrale de l'olfaction, permettent d'apporter certains éléments de comparaison.

Ainsi, anatomiquement, le cortex pyriforme (PC), chez l'Homme comme chez le rat, appartient au cortex olfactif, et reçoit les informations en provenance du bulbe olfactif, directement chez l'Homme (où le PC est également appelé cortex olfactif primaire, POC (Rolls, 2005)), et par le biais du cortex olfactif antérieur chez le rat. Le PC effectue donc le lien entre des informations olfactives déjà codées et une réponse comportementale et/ou physiologique à cette stimulation. Le PC représente dans les deux cas la plus grande partie du cortex olfactif, mesurant chez le rat plus de 5 mm de long. Chez le rat, la division, communément admise, entre cortex pyriforme antérieur et postérieur (CPA et CPP), n'a longtemps été fondée que sur la disparition du tractus olfactif latéral qui marque le début de la partie postérieure (Haberly & Price, 1978). Cette délimitation se base aujourd'hui sur des considérations plus fonctionnelles bien que les structures des deux parties soient globalement identiques : la morphologie des neurones est similaire et les couches cellulaires sont constituées des 3 couches de cellules pyramidales largement glutamatergiques (Illig & Haberly, 2003) et certaines GABAergiques (Loscher *et al.*, 1998). Cependant, le CPA et le CPP présentent des connectivités très différentes avec les autres zones cérébrales les entourant, le CPA présentant des connections multidirectionnelles et le CPP presque exclusivement caudales (Johnson *et al.*, 2000), indiquant que le CPA est mis en jeu lors de processus récurrent, et que le CPP est impliqué dans le processus de rétrocontrôle (Haberly, 2001).

Chez l'Homme, le cortex olfactif primaire est subdivisé en différentes zones selon les auteurs, cortex pyriforme frontal et temporal (PirF et PirT (Zelano *et al.*, 2005)) ou même cortex pyriforme antérieur et postérieur (Gottfried *et al.*, 2002). Ces subdivisions s'appuient sur des représentations différentes des odeurs dans cette zone, tout comme cela l'a été observé chez le rat. Ainsi, chez le rat, les odeurs ont une représentation spatialement distribuée dans le PC (Illig & Haberly, 2003): dans la partie la plus antérieure, une odeur produit l'activation d'un groupe de neurones assez compact et bien défini, chaque odeur correspondant à un groupe de neurones différent, alors que dans la partie postérieure, l'activation des neurones est plus diffuse et moins différenciable selon l'odeur. Chez l'Homme, on retrouve ce type d'activation différentielle, puisque la partie frontale (PirF) répond spécifiquement à une odeur, contrairement à la partie temporale (PirT) (Zelano *et al.*, 2005). De plus, la partie postérieure répond à toute forme de stimulation odorante, alors que la partie antérieure répond

différemment selon le caractère plaisant de cette odeur (Gottfried *et al.*, 2002), en relation avec le cortex orbitofrontal (Rolls *et al.*, 2003, Rolls, 2005).

Les analogies entre les cortex pyriformes des deux espèces ainsi que les distributions fonctionnelles similaires entre une partie antérieure, plus spécifique, et une autre postérieure, plus généralement activée, pour ce qui concerne les fonctions olfactives, nous incitent à penser que ces mêmes neurones, ou des neurones immédiatement proches, s'ils sont capables chez le rat de détecter une carence en acides aminés, pourraient donc également assurer cette fonction chez l'Homme.

B TRAVAUX PERSONNELS

OBJECTIFS DES TRAVAUX PERSONNELS

Avant le début de ce travail, des extraits protéiques de levure ont été identifiés par l'entreprise Bio-Springer comme étant potentiellement anorexigènes. La première partie de mon travail a donc consisté à caractériser cet effet et à déterminer si la dépression de la prise alimentaire était réellement d'origine satiétogène. Différentes fractions de ces protéines ayant été isolées sous forme de peptides afin d'en faciliter la formulation dans des produits destinés à l'alimentation humaine, le pouvoir satiétogène de ces fractions a dû être testé de manière à retenir le produit le plus satiétogène.

A la suite de ces études préliminaires qui ont permis de quantifier l'effet satiétogène produit chez le rat à court terme, deux études, l'une chez le rat, l'autre chez l'Homme, ont été réalisées afin de caractériser l'effet des peptides de levure sur la prise alimentaire après habitude. Cette étape est en effet indispensable dans l'optique d'une commercialisation du produit.

Parallèlement à ces études comportementales, la question des mécanismes mis en jeu a été étudiée, à la fois dans le cas général des protéines, et dans le cas particulier des peptides de levure. Pour cela, certaines régions du cerveau connues pour être impliquées dans la régulation du comportement alimentaire ont été étudiées. Les résultats ayant mis en évidence dans le cas des protéines l'activation d'un certain nombre de réseaux neuronaux impliqués dans la réduction de la prise alimentaire, ces mêmes réseaux ont été étudiés dans le cas des peptides de levure afin de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans l'effet satiétogène induit par l'ingestion de ces peptides.

Nous présenterons tout d'abord les études relatives à la signalisation centrale des protéines avant de nous intéresser aux études comportementales et centrales concernant les protéines et peptides de levure.

I. ETUDE DE LA SIGNALISATION CENTRALE DES PROTEINES

I.1 Introduction et objectifs

Les protéines possèdent le pouvoir satiétogène le plus important des trois macronutriments (Reid & Hetherington, 1997, Jean *et al.*, 2001, Bensaid *et al.*, 2002). Cependant, même si les conséquences comportementales de l'ingestion des protéines commencent à être bien connues chez le rat, en particulier dans le cas d'alimentation exclusive sous forme de régime hyperprotéique, les mécanismes sous jacents à cet effet sont encore mal connus. Une première étude menée au sein de notre laboratoire a montré qu'un régime hyperprotéique était susceptible d'activer certaines régions du cerveau connues pour être impliquées dans la régulation du comportement alimentaire comme le noyau du tractus solitaire (NTS) ou la région hypothalamique (Darcel *et al.*, 2005a). Au sein du NTS, deux réseaux de neurones (au moins) sont susceptibles d'induire une réduction de la prise alimentaire : les neurones noradrénergiques/adrénergiques dont une lésion supprime l'effet anorexigène produit par la CCK lors de la digestion (Rinaman, 2003), et dont l'activation est associée à des phénomènes de satiété/rassasiement (Rinaman *et al.*, 1998), et les neurones GLP-1, qui sont modérément activés lors de la digestion mais fortement activés suite à des stimuli aversifs (Thiele *et al.*, 1997, Rinaman, 1999b, Seeley *et al.*, 2000). Dans la mesure où les études comportementales ont montré que l'ingestion de protéines n'est pas associée à une aversion gustative conditionnée (Bensaid *et al.*, 2002, L'Heureux-Bouron *et al.*, 2004a), un repas hyperprotéique devrait plutôt activer les circuits noradrénergiques que GLP-1 dans le NTS par rapport à un repas normoprotéique. Au sein de l'hypothalamus, le noyau arqué (ARC) est une région primordiale dans la détection des teneurs plasmatiques en nutriments et en peptides ou hormones sécrétés durant la digestion (Elmquist *et al.*, 2005). A ce titre, cette zone joue un rôle très important dans la régulation de l'homéostasie énergétique, par le biais de deux populations neuronales aux effets totalement opposés : les neurones POMC/CART dont l'activation produit une forte réduction de la prise alimentaire, et les neurones NPY/AgRP, qui possèdent les propriétés inverses (Schwartz *et al.*, 2000). Enfin, si le NTS et la région hypothalamique sont impliqués dans la régulation de l'homéostasie énergétique, une autre région, le noyau accumbens, est quant à elle mise en jeu dans la régulation hédonique de la prise alimentaire et est susceptible de moduler l'activité des régions précédemment citées (Berthoud, 2004b). Au sein de cette région un noyau, la coque du noyau accumbens intègre en

effet les stimulations liées à l'aspect hédonique de l'alimentation. En particulier, les neurones GABA et opioïdes de l'AccSh sont impliqués dans la modulation de la prise alimentaire associée au « liking », c'est-à-dire la partie de l'hédonisme la plus liée à la palatabilité de l'alimentaire et aux préférences gustatives (Berridge, 2003).

Par ailleurs, si les conséquences comportementales de l'ingestion des protéines sont décrites, les mécanismes centraux impliqués dans la détection de ces régimes sont encore mal résolus. En raison de son rôle fortement suspecté dans la détection des régimes carencés ou déficients en acides aminés indispensables (AAI), le cortex piriforme antérieur (CPA) est un candidat potentiel pour détecter les augmentations d'acides aminés circulants induites par les repas ou les régimes riches en protéines (Leung & Rogers, 1971; Gietzen & Rogers, 2006). L'objectif de cette étude est donc de caractériser le rôle éventuel du CPA dans la détection des régimes hyperprotéiques en effectuant des lésions spécifiques de certaines parties de cette région afin de déterminer le caractère indispensable de cette région dans la réponse anorexigène induite par les protéines. Afin d'épargner les fibres de passage et donc les connections entre d'autres zones, l'utilisation de lésions chimiques, ne lésant que les corps cellulaires de certains neurones spécifiques (Winn, 1991), a été préférée, puis des lésions électrolytiques ont été menées afin de comparer les résultats avec ceux déjà obtenus avec cette méthode. Enfin, l'étude de l'activation des neurones du CPA à la suite de repas déficients en thréonine ou hyperprotéique a été réalisée, afin de regarder si ces stimuli activent ou non cette région. En outre, l'une des hypothèses permettant d'expliquer la détection des régimes déficients ou carencés en acides aminés indispensables implique le cycle glutamine glutamate entre les cellules gliales et les neurones. Afin d'étudier cette hypothèse, nous avons observé l'activation des neurones comprenant un des principaux transporteurs au glutamate dans cette région, l'EAAC1.

I.2 Matériels et méthodes

I.2.1 Activation de zones du système nerveux central en réponse à des repas protéiques chez le rat

24 rats Wistar mâles sont habitués à un protocole alimentaire séparé en deux parties : un repas calibré de 3g (1:2 poudre pour eau) pendant 30' suivi d'une période *ad libitum* de P14 (1:1) 90' après le début de l'ingestion de la charge. Les rats sont divisés en 4 groupes et

alimentés pendant 2 (groupes aigus P14A et P55A) ou 21 jours (groupes chroniques P14C et P55C). Chaque jour, les rats reçoivent la charge qui correspond à leur groupe, et la consommation de la première heure de consommation *ad libitum* de P14 est mesurée. Les groupes P14A et P55A sont sacrifiés 90' après le début de l'ingestion de la charge à J2, et les groupes P14C et P55C dans les mêmes conditions à J21. Les rats sont alors perfusés avec du paraformaldéhyde 4% avec de l'acide picrique et les cerveaux sont prélevés (pour détails voir article 1). Les cerveaux sont ensuite congelés et découpés dans un cryostat à 20µm et les coupes montées sur lames. Les régions prélevées couvrent la partie du NTS commune avec l'area postrema ainsi qu'une partie du NTS caudal (de -14.5mm à -13.3mm), la région hypothalamique au niveau de l'ARC (de -4.5mm à -2.1mm), et l'AccSh (de +1.2 mm à + 3.0 mm par rapport au Bregma). Un double marquage est alors effectué pour chaque coupe pour révéler la protéine Fos (marqueur de l'activité neuronale) et le phénotype étudié (noradrénergique ou GLP-1 dans le NTS, POMC dans l'ARC, GABA et récepteur μ -opioïdes dans l'AccSh). Ces marquages sont effectués par immunohistochimie avec une révélation enzymatique (pour détails voir article 1). Concernant les marquages dans l'AccSh, les anticorps primaires utilisés sont un anti-GABA, fait chez la chèvre, dilué au 1:1000 et un anti μ -MOR1 (AB1774, Chemicon), fait chez le cobaye, dilué au 1:2000.

I.2.2 Hypothèse du cortex pyriforme antérieur comme chimio-senseur des acides aminés indispensables chez le rat

Des lésions bilatérales de trois types ont été réalisées sur des groupes de rats séparés, à des coordonnées stéréotaxiques identiques (AP +3.0mm par rapport au Bregma, L $\pm$ 3.1mm, D - 6.3mm sous cortex), identifiées grâce à l'atlas de Paxinos et Watson, et qui couvrent la région connue pour être impliquée dans la détection des régimes déficients en AAI. Une première expérience a été menée en pratiquant des lésions à l'acide iboténique, analogue du glutamate, qui surexcite et entraîne ainsi la mort cellulaire des neurones glutamatergiques (spécifiquement ceux portant des récepteurs NMDA) (Jarrard, 1991, Inglis & Semba, 1997). Une deuxième série a été lésée à l'acide kainique, un autre analogue du glutamate (qui lèse spécifiquement les neurones portant les récepteurs AMPA et kainate). Enfin, dans une troisième expérience, des lésions électrolytiques ont été réalisées. Dans chaque expérience, les rats lésés sont comparés à un groupe témoin (aucune opération) et à un groupe sham (la solution injectée ne contient que

le véhicule utilisé dans le cas des lésions chimiques et l'électrode est descendue et laissée en place durant la même durée que les rats lésés dans le cas des électrolytiques).

Dans les trois expériences, les rats suivent un protocole alimentaire strictement identique : 5 jours de Thr-Dev (régime déficient en thréonine), suivi de 5 jours de P14, puis 2 jours de Thr-Cor (régime Thr-Dev supplémenté en thréonine), suivis de 3 jours de P14, et enfin 3 jours de P55. Les journées de P14 servent à calculer une consommation basale qui permet d'exprimer les résultats en consommation relative par rat. A la suite des trois expériences, les rats sont perfusés au formol 10% (PAF 4% dans le cas des lésions à l'acide kainique), les cerveaux sont prélevés, découpés et colorés au violet de crésyl afin de révéler les structures cellulaires. Cette coloration permet de constater l'étendue des lésions et d'exclure les animaux qui n'auraient pas été correctement et bilatéralement lésés. Pour le groupe lésé à l'acide kainique, un marquage supplémentaire sur un autre jeu de coupes est réalisé, visant à révéler le récepteur Glu-R1 par immunofluorescence (voir article pour détails).

Pour l'étude de l'activation Fos des neurones du CPA^{vii}, les rats (n=24) ont été soumis au même protocole alimentaire que celui décrit pour les études similaires dans les articles 1 et 3. Les rats ont été divisés en 4 groupes selon la nature de la charge reçue durant le repas calibré (3g) : Thr-Dev, Thr-Cor, P14 et P55. Les comparaisons concernent deux à deux les groupes Thr-Dev et Thr-Cor puis les groupes P14 et P55. Les rats des groupes Thr-Dev et Thr-Cor sont sacrifiés le premier jour suivant la période d'habituation, alors que les rats P14 et P55 sont sacrifiés le deuxième jour, selon le protocole déjà présenté dans les études précédentes. Les cerveaux des rats sont prélevés au niveau du CPA (+ 3.6mm jusqu'à - 0.2 mm).

Les coupes sont ensuite techniquées pour révéler la protéine Fos (sur la totalité de la structure) et le transporteur au glutamate EAAC1 (de +3.6mm jusqu'à +1.8mm). Une fois la révélation de la protéine Fos achevée, les coupes sont incubées pendant 72h (à +4°C) dans l'anticorps anti-EAAC1. Après l'incubation dans l'anticorps secondaire et dans le complexe PAP (1/400^{ème}), les peroxydases sont révélées par le complexe DAB-nickel, qui colore les cytoplasmes des neurones en gris foncé. Ainsi, les neurones doublement marqués présentent un noyau brun et un cytoplasme gris.

^{vii} Cette étude a été réalisée en collaboration avec Mme Sylvette Gougis.

I.3 Résultats et interprétations

I.3.1 Activation de zones du système nerveux central suite à l'ingestion de repas protéiques chez le rat

Les rats qui ont consommé un repas hyperprotéique mangent statistiquement moins pendant la première heure de période d'alimentation *ad libitum* que les rats ayant consommé un repas normoprotéique, à J2 comme à J21.

Concernant les activations, un repas hyperprotéique augmente le nombre de neurones activés en c-fos pour l'ensemble du NTS intermédiaire, en particulier pour les parties les plus rostrales étudiées (voir article 1, figure 4), en aigu comme en chronique.

En outre, un repas HP induit une activation plus importante des neurones noradrénergiques/adrénergiques pour l'ensemble du NTS intermédiaire (article 1, figure 5), également concentrée dans la partie la plus rostrale du NTS intermédiaire. Le nombre total de neurones noradrénergiques n'est pas statistiquement différent entre les groupes normo- et hyperprotéiques.

En revanche, un repas HP n'entraîne aucune différence d'activation des neurones GLP-1 (article 1, figure 5) que ce soit au niveau de l'activation globale du NTS intermédiaire ou dans ses différentes parties.

Le profil d'activation observé suite à l'ingestion d'un repas hyperprotéique, en aigu comme en chronique, suggère donc que les protéines entraînent une activation plus importante du NTS, et spécifiquement de réseaux impliqués dans la satiété comme les neurones noradrénergiques. L'activation de ces neurones peut résulter de deux propriétés des protéines : elles ralentissent la vidange gastrique comparativement aux autres macronutriments (Blom *et al.*, 2006), et sont donc susceptibles d'entraîner un volume gastrique plus élevé plus longtemps, alors que les neurones noradrénergiques du NTS sont sensibles aux stimulations gastriques (Willing & Berthoud, 1997). En outre, les protéines entraînent, durant la digestion, la libération de CCK par les cellules entéroendocrines de l'intestin (Raybould, 1991). Or les neurones noradrénergiques du NTS sont indispensables à la réponse anorexigène induite par la CCK (Rinaman, 2003). Une augmentation de sécrétion de CCK au niveau des terminaisons vagales pourrait donc expliquer l'augmentation d'activation de neurones noradrénergiques que nous avons observée dans le NTS à la suite d'un repas hyperprotéique.

Au sein de l'hypothalamus, un repas hyperprotéique n'augmente pas l'activation Fos globale du noyau arqué (ARC). En revanche, l'activation des neurones mélanocortiques est fortement augmentée, en aigu comme en chronique, en particulier dans la région caudale de l'ARC (article 1, figure 6). Le nombre total de neurones POMC reste quant à lui inchangé entre les différents régimes. Cette activation des neurones POMC va de pair avec une inhibition des neurones non-POMC (article 1, suppl figure 1), pour l'essentiel NPY/AgRP, puisque ces deux populations sont extrêmement majoritaires dans l'ARC (Bagnol *et al.*, 1999). Cette inhibition des neurones NPY/AgRP semble indispensable pour que les neurones POMC puissent être activés, en raison du tonus inhibiteur des neurones NPY sur ces derniers (Cowley *et al.*, 2001). Cette activation des neurones POMC peut être due à des variations de teneurs d'hormones ou de peptides gastro-intestinaux telles que la leptine, l'insuline ou la ghréline, et l'action d'un repas hyperprotéique sur la sécrétion de ces facteurs est encore mal connue. En outre, l'activation de ces neurones pourrait résulter de l'augmentation des teneurs sanguines en acides aminés à la suite du repas hyperprotéique, qui serait détectée au niveau central par l'ARC, dont la barrière hémato-encéphalique est plus perméable qu'ailleurs (Peruzzo *et al.*, 2000). Cette hausse des acides aminés plasmatiques provoquerait, en outre, une augmentation des teneurs en leucine, qui serait détectée, dans l'ARC, par le mTOR (mammalian target of rapamycin), entraînant l'activation des neurones POMC (Cota *et al.*, 2006). Cette activation des neurones POMC de l'ARC pourrait en retour, activer le NTS par les projections POMC reliant les deux régions (Zheng *et al.*, 2005). Ce phénomène expliquerait la différence d'activation Fos observée suite à un repas hyperprotéique qui ne peut uniquement être imputée à l'augmentation mesurée dans les neurones noradrénergiques. En raison de difficultés techniques, le marquage des neurones POMC dans le NTS n'a pu être réalisé, car il nécessite vraisemblablement l'utilisation de souris POMC-GFP.

Au sein du noyau accumbens, les marquages observés ont été très inégaux, ce qui nous a conduit à réaliser une comparaison qualitative des marquages. Les résultats obtenus montrent qualitativement des différences entre les différents régimes testés (**Tableau 2**). Ainsi, les repas normoprotéiques induisent une activation plus importante de l'AccSh, qui se traduit non seulement par une augmentation du nombre de neurones Fos-positifs, mais également du nombre de neurones doublement marqués, à la fois pour le neuromédiateur GABA, mais également pour le récepteur μ aux opiacés.

Dans le cas des repas hyperprotéiques, à court terme comme à long terme, l'activation est très faible et marginale, voire pratiquement inexistante à court terme. Ces repas n'entraînent

donc qu'un recrutement très réduit des neurones de l'AccSh, contrairement au repas normoprotéique. Ces résultats concordent avec ceux observés dans la région hypothalamique, puisque l'activation des neurones GABA et/ou des neurones opioïdes de l'AccSh entraîne une réponse orexigène dont l'action passe partiellement par une activation des neurones NPY du noyau arqué et une inhibition des neurones POMC (Zheng *et al.*, 2003). Dans le cas des repas hyperprotéiques, l'activation des neurones POMC irait donc de pair avec une inhibition des neurones GABA et opioïdes de l'AccSh (et vraisemblablement avec une inhibition des neurones NPY, comme discuté dans l'article 1). Ces résultats, uniquement observés de manière qualitative, demande néanmoins confirmation par une étude qualitative.

Les voies centrales de signalisation des protéines sont donc multiples. Les protéines activent en effet des voies de contrôle direct de la prise alimentaire comme le NTS, ainsi que des voies de contrôle indirect, comme l'aire hypothalamique, qui régule l'homéostasie énergétique, mais jouerait également sur des système modulateur de ces voies, en modifiant la réponse hédonique à l'alimentation. Ces différents actions expliquent par exemple pourquoi il est difficile d'annihiler l'effet satiétogène des protéines en bloquant ou en supprimant telle ou telle voie, puisqu'une autre est alors susceptible de prendre le relais.

I.3.2 Les lésions du CPA ne modifient pas le comportement des rats vis-à-vis des régimes hyperprotéiques ou des régimes déficitaires en AAI chez le rat

Les vérifications histologiques nous ont permis de déterminer quels rats avaient été correctement lésés, c'est-à-dire de manière bilatérale et sur une étendue d'au minimum 500 μm de part et d'autre du centre de la lésion (soit +3.0mm par rapport au Bregma).

Concernant les rats lésés avec l'acide iboténique ou de manière électrolytique, les colorations au crésyl violet nous ont permis de visualiser très clairement les lésions et de déterminer leur étendue. En revanche, aucune lésion n'était visible avec cette coloration pour aucun des rats traités avec l'acide kainique. Nous avons donc réalisé un marquage du récepteur AMPA GluR1 et nous avons considéré un rat comme correctement lésé si aucun neurone exprimant le récepteur GluR1 n'était présent dans le CPA.

Les rats présentant une lésion significative, que ce soit chimique ou électrolytique n'ont pas modifié leur comportement en présence d'un régime hyperprotéique, impliquant que ces régimes ne nécessitent vraisemblablement pas la présence du CPA pour exprimer leur propriété anorexigène. De manière plus surprenante, aucune des lésions que nous avons

effectuées, et pour aucun des rats testés, n'a entraîné de modifications significatives du comportement des rats sous régime déficient en thréonine (Thr-Dev).

La mesure de l'activation des neurones du CPA confirme les résultats obtenus pour les lésions concernant les régimes hyperprotéiques. En effet, aucune différence n'est observée entre les rats nourris avec un repas normo- ou hyperprotéique, que ce soit pour l'activation Fos seule (16.2 ± 1.9 vs. 13.3 ± 1.6 neurones activés par coupe pour les régimes P55 et P14, respectivement) ou pour les doubles marquages Fos + EAAC1 (3.9 ± 1.8 vs. 3.5 ± 0.6 neurones doublement marqués par coupe pour les régimes P55 et P14, respectivement).

En revanche, le régime Thr-Dev active fortement le CPA dans trois parties distinctes : dans la partie la plus antérieure du CPA (de +3.6mm à +3.0mm) puis de +2.2mm à +1.8mm et dans une partie plus caudale de +0.8mm à +0.4mm. Si les deux premières régions ont été couvertes par l'étendue des lésions, ce n'est pas le cas de la dernière. Cette répartition de l'activation des neurones montre que le régime Thr-Dev induit une réponse qui n'est pas spécifique de la partie la plus antérieure du CPA qui a jusqu'à présent constituée la zone d'intérêt des recherches menées sur ce sujet. En outre, la répartition du marquage dans un plan coronal montre que l'augmentation d'activation dans la partie la plus antérieure est due à une augmentation des différents segments du CPA, à la fois des parties externes, médianes et internes (pour détails voir article 4). Concernant le double marquage Fos + EAAC1, nous observons, comme dans le cas de l'activation Fos, une augmentation de l'activation des neurones doublement marqués suite à l'ingestion d'un repas Thr-Dev par rapport à un repas Thr-Cor, cependant moins marquée que dans le cas du marquage Fos (**Figure 30**). Ces différences sont une fois de plus présentes dans les parties les plus antérieures du CPA, au niveau extérieur entre +3.2 et +3.0 mm et au niveau intérieur +3.2 +2.8 mm. Ces résultats donnent une première indication permettant d'étayer l'hypothèse selon laquelle le cycle glutamine-glutamate serait impliqué dans les mécanismes permettant aux neurones de détecter les carences, ou plus vraisemblablement dans la réponse suite à leur détection (Gietzen & Rogers, 2006).

I.4 Discussion

Nos principaux résultats concernant l'ingestion de régimes ou de repas hyperprotéiques sont une augmentation conjointe de l'activité de différentes régions du système nerveux central

(CNS). Parmi les régions étudiées, nous avons montré que le NTS ainsi que plusieurs noyaux de la région hypothalamique voient, à court terme comme après habituation, leur activité accrue par l'ingestion de protéines, et en particulier certains réseaux de neurones comme les neurones noradrénergiques du NTS et les neurones mélanocortiques de l'ARC. En outre, les protéines inhibent l'activation de neurones GABAergiques et opioïdiques dans le noyau accumbens, et inhibent ainsi la prise alimentaire en diminuant la réponse hédonique à l'alimentation. Enfin, nous avons montré que les protéines ne semblent pas utiliser le cortex pyriforme antérieur, région pourtant connue pour détecter les carences en acides aminés indispensables (AAI), comme point d'entrée dans le CNS puisque la lésion de cette région ne modifie pas le comportement des animaux sous régime hyperprotéique, qui par ailleurs ne provoque aucune activation particulière de cette région, selon les marqueurs que nous avons choisis (c-fos, transporteur au glutamate EAAC1), contrairement à un régime carencé en AAI.

Les protéines activent des réseaux spécifiques du NTS et de l'hypothalamus impliqués dans la régulation du comportement alimentaire.

L'ingestion d'un repas hyperprotéique augmente l'activation d'un certain nombre de régions du cerveau par rapport à un régime normoprotéique, en particulier deux régions, le noyau du tractus solitaire (NTS) et la région hypothalamique. Il est intéressant de noter que l'hypothalamus ventro-médian (VMH), qui est le centre historique de la satiété est activé par un repas hyperprotéique, tout comme le noyau dorso-médian, contrairement au noyau arqué (ARC) (**Figure 31**). Un autre point marquant est l'absence de différence d'activation au niveau du noyau arqué. Cette apparente stabilité masque en réalité des situations très contrastées. En effet, au sein de l'ARC, deux populations neuronales ont des effets totalement antagonistes (Bagnol *et al.*, 1999). Ainsi, l'activation d'une des populations se déroule de concert avec l'inhibition de l'autre (Cowley *et al.*, 2001). Cette structure singulière du noyau arqué explique qu'un repas ou un régime hyperprotéique, tout en ayant effectivement une action sur l'activation de certains neurones de l'ARC, ne modifie pas notablement l'activation générale de la zone. C'est pourquoi il est nécessaire d'entreprendre un phénotypage des neurones impliqués dans la réponse à un repas hyperprotéique. Nous avons alors montré à l'aide de ce double marquage qu'il existait une réelle différence d'activation entre un repas hyper- ou normoprotéique concernant les neurones mélanocortiques, dont l'activation est connue pour entraîner une réponse anorexigène. Dans le même temps, l'activation générale de l'ARC reste

la même, alors que les neurones de l'ARC se repartissent presque exclusivement entre les populations mélanocortiques et NPY (Bagnol *et al.*, 1999). Ces derniers, dont l'activation provoque une réponse fortement orexigène (Levine *et al.*, 2004a; Williams *et al.*, 2004), sont donc inhibés par un repas hyperprotéique, phénomène qui est non seulement cohérent avec l'activation des neurones mélanocortiques, mais est en outre indispensable en raison du tonus inhibiteur des neurones NPY sur ces neurones (Cowley *et al.*, 2001).

L'activation des neurones mélanocortiques de l'ARC se déroule simultanément à celle des neurones du NTS, et plus particulièrement les neurones noradrénergiques/ adrénergiques de cette région. Ces neurones, qui sont indispensables à la réponse anorexigène induite par la CCK (Rinaman, 2003), sont également activés par une augmentation du volume gastrique (Willing & Berthoud, 1997; Rinaman *et al.*, 1998). Au-delà de la constatation que les protéines activent ces neurones, les mécanismes sont encore mal connus. En effet, les protéines entraînent la sécrétion par les cellules entéroendocrines de la CCK qui vient à son tour activer le nerf vague (Raybould, 1991) et mobilise vraisemblablement ces neurones noradrénergiques au niveau du NTS. Certaines protéines ou fractions protéiques augmentent également le volume gastrique en ralentissant la vidange gastrique (Peraino *et al.*, 1959; Morens *et al.*, 2001; Blom *et al.*, 2006), ce qui serait susceptible d'activer ces mêmes neurones. Enfin, ces neurones reçoivent des projections à partir de l'area postrema (Cunningham *et al.*, 1994), région située contre le NTS et dont la barrière hémato-encéphalique plus fenestrée permet une détection plus aisée des variations des teneurs en acides aminés (McKinley *et al.*, 2003). Enfin, les neurones mélanocortiques de l'ARC projettent vers le NTS et forment des boutons synaptiques avec les neurones noradrénergiques (Zheng *et al.*, 2005). L'activation de ces neurones dans l'ARC pourrait donc induire celle des neurones noradrénergiques du NTS. Les projections de ces neurones noradrénergiques sont cependant mal connues. Il semblerait que contrairement à d'autres neurones noradrénergiques de cette région, ils ne projettent pas vers le noyau paraventriculaire de l'hypothalamus (Rinaman, 2003), mais peut-être vers d'autres noyaux hypothalamiques et d'autres régions du bulbe rachidien comme la moelle ventro-latérale qui a son tour projettent vers la région hypothalamique (Sawchenko & Swanson, 1981). L'activation de ces neurones est cependant strictement associée à une réponse anorexigène, puisque leur lésion entraîne une hausse de la prise alimentaire (Rinaman, 2003). On peut noter que les résultats d'activation de toutes les régions étudiées sont similaires en aigu comme après l'habituation, ce qui corrobore les comportements alimentaires observés dans ces deux conditions. Ces activations sont cependant notablement différentes de ce qui se

produit dans le cas d'une alimentation exclusivement hyperprotéique (Darcel *et al.*, 2005a) (**Figure 32**), pour laquelle l'activation de ces zones relève de l'intégration de nombreux signaux métaboliques et non plus seulement de la signalisation suivant l'ingestion d'un repas, et qui se traduit après habitude, par une diminution de l'effet satiétogène des protéines.

Le profil d'activation du NTS confirme l'absence d'aversion gustative conditionnée associée à l'ingestion des régimes hyperprotéiques.

L'exploration des réseaux neuronaux impliqués dans la signalisation des protéines a également permis de conforter l'absence d'aversion gustative conditionnée. En effet, les neurones GLP-1 du NTS, qui en situation normale de repas, s'activent modérément sous l'effet de stimuli anorexigènes modérés liés à l'apparition de la satiété, sont en revanche fortement recrutés dans le cas de stimuli aversifs (Rinaman, 2004), comme une distension gastrique très importante (Vrang *et al.*, 2003), une injection de chlorure de lithium (Rinaman, 1999a) ou l'ingestion de lipopolysaccharide (Grill *et al.*, 2004). Ce rôle est confirmé par les projections de ces neurones vers le noyau parabrachial et le noyau central de l'amygdale (Herbert *et al.*, 1990; Jia *et al.*, 1994), régions bien connues pour leur rôle indispensable dans les aversions gustatives conditionnées (Fromentin *et al.*, 2000; Kinzig *et al.*, 2002). Or un repas hyperprotéique, en aigu comme à l'habitude ne modifie en aucun cas le profil d'activation des neurones GLP-1 de l'ARC, confirmant l'absence d'aversion gustative conditionnée qui avait déjà été montré à l'aide de l'analyse de la séquence comportementale de satiété (Bensaid *et al.*, 2003). Cette réponse confirme donc la nature purement satiétogène de la réponse anorexigène induite par les protéines.

Les protéines diminueraient l'activation des circuits centraux de l'hédonisme.

Un aspect intéressant de la modulation nerveuse induite par un repas hyperprotéique est son influence sur le système de régulation hédonique de la prise alimentaire. En effet, ce système, comme nous l'avons vu, est susceptible de modifier la régulation homéostatique de la prise alimentaire et en particulier de promouvoir la prise alimentaire chez un animal déjà rassasié (Berthoud, 2004a). Il semble donc primordial de pouvoir contrer ce système de l'hédonisme pour véritablement instaurer une réponse anorexigène. Or un repas hyperprotéique, outre l'activation de régions du CNS impliquées dans la détection de signaux

anorexigènes et l'élaboration d'une réponse comportementale adaptée, semble inhiber l'activité de neurones du noyau accumbens exprimant le « liking », soit l'aspect le plus sensoriel de l'hédonisme (Berridge, 2003). Ce phénomène est cohérent avec la faible palatabilité des protéines, puisque la palatabilité a un impact important sur l'expression du liking, même si, comme nous l'avons vu, la palatabilité seule ne peut expliquer l'effet anorexigène des protéines. Cette potentielle inhibition des neurones du liking est cependant très intéressante car les projections de ces neurones du noyau accumbens innervent indirectement le noyau arcué (ARC) (Zheng *et al.*, 2003) et serait donc susceptible d'être à l'origine des augmentations d'activation que nous avons observés avec un repas hyperprotéique dans cette région. En effet, une baisse de l'activité des neurones GABA du noyau accumbens (qui dans notre cas est corrélé avec une diminution de l'activation des neurones portant le récepteur aux opiacés) inhibent les neurones orexines de l'hypothalamus latéral (LH) (Stratford & Kelley, 1999) et ce faisant, inhibent les neurones NPY/AgRP et activent les neurones POMC (directement et en levant l'inhibition des neurones NPY sur ces derniers) (Jobst *et al.*, 2004). L'inhibition des circuits du liking pourrait donc indirectement être responsable de l'activation du système mélanocortique que nous avons observée suite à l'ingestion d'un repas hyperprotéique. L'activation des neurones POMC de l'ARC peut donc résulter de deux mécanismes totalement dissociés : une détection de variations périphériques de nutriments et/ou de facteurs hormonaux et une régulation nerveuse de la région, par exemple de la part du LH. Il serait donc intéressant de regarder l'activation des neurones orexines du LH suite à l'ingestion d'un repas hyperprotéique et de regarder si elle est diminuée ou non. Il est également possible que ces deux mécanismes jouent de manière conjointe dans le cas des protéines.

Un autre volet de l'hédonisme que nous n'avons pas étudié concerne le rôle de l'ingestion des protéines dans une modulation des circuits impliqués dans le « wanting ». L'impact des protéines sur cette facette de l'hédonisme n'a pas vraiment été étudié, et même si le wanting est largement indépendant de la composition en macronutriments (Baldo *et al.*, 2002; Bassareo *et al.*, 2002; Kelley, 2004), il est tentant de spéculer qu'en raison de son caractère indispensable au bon fonctionnement de l'organisme, l'ingestion des protéines doit être favorisée par la part inconsciente du wanting, dite « incentive salience » (Berridge & Robinson, 1998). Il serait donc intéressant de regarder l'activation du système dopaminergique dans l'accumbens, comme dans l'aire tegmentale ventrale suivant l'ingestion d'un repas hyperprotéique, ou par exemple dans le cas de transition ou d'habituation à ce régime, afin de connaître l'implication exacte de ce système dans la régulation de la prise alimentaire par les

protéines. Il serait ainsi intéressant de vérifier si par exemple dans le cas d'un statut nutritionnel fortement déprimé en protéines, l'ingestion d'un repas hyperprotéique active ou non le système dopaminergique dans ces régions.

Le cortex pyriforme antérieur n'intervient pas dans la signalisation des protéines.

Un autre point d'entrée potentiel des protéines dans le CNS est le cortex pyriforme antérieur (CPA). En effet, l'hypothèse selon laquelle une région capable de détecter une carence en acide aminé indispensable (AAI) serait également capable de détecter un excès méritait plus amples investigations. Les résultats obtenus n'ont cependant pas du tout corroboré cette hypothèse. En effet, non seulement les différentes lésions du CPA n'ont entraîné en aucun cas de modifications du comportement alimentaire chez le rat, prouvant que cette région n'est pas indispensable à la réponse anorexigène induite par les régimes hyperprotéiques, mais les études d'activation n'ont montré aucune différence entre une charge hyper- ou normoprotéique, comme cela avait déjà été montré dans le cas d'un régime hyperprotéique. Ces résultats laisseraient donc penser que le CPA n'est même pas impliqué dans la détection des excès en AAI. L'une des hypothèses qui aurait pu expliquer une implication du CPA dans la réponse anorexigène aux protéines était une variation du cycle glutamine/glutamate entre les neurones et les cellules gliales du CPA, mais notre étude n'a montré aucune différence dans l'activation des neurones comprenant le transporteur au glutamate EEAC1.

Les expériences décrivant le rôle du CPA dans la détection des carences en acides aminés indispensables et les mécanismes intracellulaires à l'origine de cette détection sont nombreuses et généralement très probantes et ont été presque exclusivement réalisées par l'équipe de DW Gietzen et ses prédécesseurs. Les résultats que nous avons trouvés contredisent partiellement ces découvertes, ou en tout cas contestent le caractère unique du CPA dans cette fonction. Ainsi, l'expérience marquante démontrant le caractère indispensable du CPA dans la détection des carences en AAI a été celle de Leung et Rogers (Leung & Rogers, 1971), lesquels faisant une lésion électrolytique dans les mêmes conditions que celles que nous avons réalisées trouvent, contrairement à nos résultats, une augmentation de la prise alimentaire chez les rats lésés par rapport aux témoins. La seconde expérience déterminante a été celle de Beverly (Beverly *et al.*, 1990) où injectant l'AAI carencé dans le régime dans le CPA, les rats mangeaient comme s'il était présent. L'expérience de Leung et Rogers ne précise

pas l'étendue des lésions ni au niveau du plan de coupe, ni selon l'axe antéro-postérieur, et il est possible, même si nos lésions sont déjà assez étendues, qu'elles ne couvrent pas totalement celles pratiquées dans leur expérience, ce qui pourrait expliquer des différences d'effets, même si cela est peu probable. L'expérience de Beverly, quant à elle, est très probante, mais a été reproduite avec succès dans d'autres régions du CNS, en particulier dans l'aire hypothalamique latérale, ce qui montre le caractère non-unique du CPA dans ce domaine (Blevins *et al.*, 2000). Nos expériences ne remettent pas du tout en cause l'explication des mécanismes intracellulaires de détection des AAI par les neurones du CPA, même si le rôle des récepteurs AMPA, qui était postulé comme voie de sortie du signal vers les autres régions ou les autres neurones du CPA (Sharp *et al.*, 2004), ne semble pas indispensable puisque son absence n'entraîne pas de modifications notables de comportements. Si nos résultats tendent à contester le caractère indispensable du CPA dans la réponse aux carences en AAI, ils montrent en revanche une implication claire de cette région dans ce phénomène, puisque le CPA est fortement activé (en c-fos) par un repas carencé en AAI, confirmant des résultats précédemment obtenus (Wang *et al.*, 1996a), non seulement dans la région la plus antérieure du CPA (région traditionnellement étudiée), mais également dans plusieurs autres parties plus postérieures du CPA, ce qui confirme que la taille des lésions ont vraisemblablement une influence (même s'il s'agit alors de lésions de plusieurs mm de long) et qu'en outre, les neurones contenant le transporteur au glutamate EAAC1 sont également plus activés à la suite d'un repas carencé en AAI.

Le manque d'implication des neurones du CPA dans la régulation de la prise alimentaire induite par un apport « excessif » de protéines semble cependant logique aux vues des résultats de Leung et des récentes expériences décrivant les mécanismes intracellulaires à l'origine de la détection des carences en AAI (Hao *et al.*, 2005). Ainsi, le signal déclenchant cette réponse est la baisse des ARN de transfert dit chargé (soit lié à un acide aminé). Cette baisse est logique dans le cas d'une carence en AAI, elle est par contre improbable dans le cas des repas ou régime hyperprotéiques. En revanche, l'implication de GCN2 dans la cascade de réaction suivante peut laisser place à de nouvelles hypothèses sur la signalisation centrale des protéines. GCN2 est en effet un facteur ubiquitaire dans le CNS, et son action semble être modulé par les régimes hyperprotéiques.

**Article 1 - Proteins activate satiety related neuronal pathways in the brainstem
and hypothalamus of rats.**

The Journal of Nutrition, soumis.

**Rodolphe Faipoux, Daniel Tomé, Sylvette Gougis, Nicolas Darcel et Gilles
Fromentin.**

**Proteins activate satiety related neuronal pathways in the brainstem
and hypothalamus of rats**

R. Faipoux, D. Tomé, S. Gougis, N. Darcel, and G. Fromentin[§]

UMR914 Nutrition Physiology and Ingestive Behavior, INRA, AgroParisTech,
CRNH-IdF, 16 rue Claude Bernard, F-75005 Paris, France.

Key words: satiety, conditioned taste aversion, noradrenergic pathway, GLP-1 pathway,
melanocortin pathway

**Word count: 7005. Number of figures: 6; Number of Supplementary Files : 1 ;
Number of tables: 2**

[§] To whom correspondence should be addressed. E-mail: fromenti@inapg.fr.

Abstract

The objective of this work was to study the relationship between the satiety induced by high protein meals and the activation of brain areas involved in the onset of satiety. We monitored neuronal pathways known to be activated by a meal in brain centers receiving information from the gastrointestinal tract or via humoral pathways. In the nucleus of the solitary tract (NTS), the acute or chronic intake of high protein meals led to an increased activation of the noradrenergic/adrenergic pathway known to be involved in cholecystokinin (CCK) induced satiety. In the arcuate nucleus of the hypothalamus (ARC), the melanocortin pathway was also more strongly activated after the acute or chronic intake of high protein meals. Moreover, the Glucagon Like Peptide 1 (GLP-1) pathway arising from the NTS, which is triggered, among others behaviors, during non-physiological anorexia, was not activated by high protein meals, supporting the lack of aversive behavior associated with this diet. Taken together, these results show that the ability of high protein meals to inhibit food intake occurs alongside the activation, in nutrient-sensitive brain areas, of several specific neural pathways involved in satiety.

INTRODUCTION

Dietary proteins are potent inducers of satiety¹ and inhibitors of food intake in both rats and humans (1-6), but the brain areas and neuronal pathways responsible for these effects are still not fully understood.

The involvement of vagal afferent pathways in protein sensing and signaling to the brain is supported by results showing that intraduodenal protein activates vagal afferent fibers and that high protein feeding induces c-Fos expression in neurons within the nucleus of the solitary tract (NTS²), the first central relay for afferent vagal fibers (7).

Within the NTS, activation of at least two neuronal pathways could indistinctly lead to anorexia. First, the noradrenergic/adrenergic (NA/A) pathway, lesion of which attenuates the CCK-induced anorexia, is related to satiety (8). Second, neurons expressing Glucagon Like Peptide 1 (GLP-1) constitute a neuronal network known to be involved in satiety but also in aversion-induced anorexia (9-12). Since previous behavioral studies have shown that high protein diet-induced anorexia is not related to a conditioned taste aversion (CTA) (13-15), we would expect the NA/A but not the GLP1 pathway to be activated after the ingestion of high protein meals.

¹ In this paper, we did not discriminate between satiation and satiety, even if central activation of NTS pathways are rather related to satiation and hypothalamic to satiety. However, projections between these two areas tend to blur this distinction. We therefore preferred to use satiety throughout this paper for clarity and to avoid confusion between two phenomena that are not so easily distinguishable.

² Abbreviations used: α -MSH: α -Melanocortin Stimulating Hormone; ARC: Arcuate Nucleus of the Hypothalamus; CCK: cholecystokinin; CTA: conditioned taste aversion; d β H: dopamine- β -Hydroxylase; GLP-1: glucagon-like-peptide 1; INAP-G: Paris National Institute of Agronomy; LHA: Lateral Hypothalamic Area; NA/A: noradrenalin/adrenalin; NTS: Nucleus of the Solitary Tract; P/E, G/E, L/E: percentage of diet energy brought by protein, carbohydrates and lipids, respectively; P14, P55A and P55C: 14% P/E and 55% P/E acute and chronic total milk protein diets, respectively; PBS: phosphate buffer saline; POMC: pro-opiomelanocortin.

Furthermore, previous studies have shown that vagal afferents alone are not solely responsible for high protein-induced anorexia (16). Indeed, high protein meals are likely to activate other neural pathways involved in nutrient detection, especially the arcuate nucleus of the hypothalamus (ARC). In this area, the activation of proopiomelanocortin (POMC) neurons (resulting in release of the α -melanocortin-stimulating-hormone (α -MSH) gene transcript) induces a reduction in food intake (see (17) for review). These neurons are responsible for the anorectic response induced by circulating leptin (18,19) through the activation of neurons in the paraventricular nucleus of the hypothalamus that project to the spinal cord (20,21) and other sites involved in regulation of energy intake. Activation of these neurons is inseparable from the behavior of another neuronal population in the ARC, NPY/AgRP neurons, whose activation is potent in increasing food intake (see (22,23) for review) and which directly inhibit POMC neurons (18). Therefore the objective of this study was to determine the extent to which nutrient sensitive brain centers in the NTS and the hypothalamus were activated by the ingestion of a daily high protein meal, and which neural pathway was recruited within these specific areas. The response to the high protein meal was determined in animals after two days (acute condition) or 21days (chronic condition) of consumption of the daily high protein meal.

MATERIALS AND METHODS

Animals and diets

Adult male Wistar rats (n=32) from Harlan (Gannat, France) were housed in individual cages at $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$, under a 12-h reverse light/dark cycle (09:00, 21:00; lights on at

21:00). All experimental procedures used during the study complied with the guidelines issued by the French National Animal Care Committee and was approved by the Regional (Ile de France Sud) Animal Care and Ethical Committee. As for the composition of the diets used (**Table 1**), standard protein diets were modified versions of the AIN-93M diet (13). Instead of casein and cystine, the P14 diet contained 140 g total milk protein per kg of diet. The high protein diet (P55) was based on the AIN-93M P14 diet, and contained total milk protein as the protein source. Protein was added at the expense of sucrose and starch. All diets were moistened (1:2 ratio of powder to water for P55 and P14 diets when used as a meal, 1:1 for P14 diet when used during the *ad libitum* feeding period) to minimize spillage. Food intake was determined by the difference in food cup weight before and after each experimental period, corrected for spillage, the amount of water added and evaporation. All rats had free access to water throughout the experimental period. For the first 10d of the experiments (pre-feeding period), rats were adapted to laboratory conditions and conditioned to a two-meal pattern (as described below) with the P14 diet (baseline food). The last day of the pre-feeding period is referred to as d0.

Experimental design

The rats were divided into four groups (N=8/group). During the pre-feeding period, rats received daily at 9:00 am a first meal consisting in a 30 min access to 3g of P14 diet (43.8 kJ), followed, 90 min after the beginning of the first meal, by *ad libitum* P14 diet for the remainder of the dark period (**Fig 1**). At d1, two groups (P14) were on the same feeding pattern as during the pre-feeding period, whereas two P55 groups (P55A and

P55C) received daily at 9:00 am a first meal consisting in a 30 min access to 3g of P55 (43.8 kJ) followed, 90 min after the beginning of the first meal, by *ad libitum* P14 diet for the remainder of the dark period. Therefore, instead of consuming a 14% P/E (protein on energy) and 76% C/E (carbohydrates on energy) diet throughout the day, these rats consumed an equivalent diet of 19% P/E and 71% C/E. P55A (acute effect) and rats in one of the P14 groups were killed after the second day of this treatment (d2). P55C rats (chronic effect) and the other P14 group were killed after 21 days of treatment (d21). Results concerning food intake are expressed as the ratio between the actual consumption during the measured period of time and the average consumption over the same period of time for the four consecutive days before d1 (considered as basal daily consumption). Complete 3g-meal consumption was checked each day of the experimental period and food intake was measured after one hour of *ad libitum* access the P14. Moreover, water intake during the 3g-meal period was measured by weighting water bottle before and after this meal each day.

Tissue collection

In order to study the dynamics of Fos protein expression in the CNS (24), rats were killed with a lethal injection of pentobarbital sodium (90 mg/kg, ip) 90 min after the beginning of their first meal. The 90 min fasting period allowed us to visualize brain activations which were only dependent on the 3g-calibrated meal. The thoracic cage was opened and rats were perfused transcardially via a 16 gauge needle placed in the left ventricle with 500 ml of saline followed by 1000 ml 4% phosphate-buffered (PB, pH=7.4) paraformaldehyde and 0.2% picric acid (Sigma, St-Louis, MO) to improve

neurotransmitter retention (25). The brains were removed and left overnight in 15% sucrose in PB for cryoprotection then stored in 30% sucrose in PB with sodium azide (to prevent bacterial contamination).

Immunohistochemical staining

Brains were frozen (-40°C), sectioned in 20 µm thick sections in a cryostat at -24°C (Leica, Germany), and floating sections were collected in PB in serially ordered sets. For each rat, four series were collected in each brain area (identified using the Paxinos and Watson stereotaxic atlas). Sections of the brainstem were collected from -14.5 to -13.3 mm relative to Bregma (12 sections), corresponding to the part of the NTS which is common with the area postrema (AP) and a part of caudal NTS where most of GLP-1 cell bodies are present (26). In the hypothalamic area, sections were collected from -4.5 to -2.1 mm relative to Bregma (24 sections), covering the entire arcuate nucleus (ARC). Each complete set of sections was processed for double labeling immunohistochemistry using the ABC complex/DAB method for c-Fos staining and the ABC complex/SG method for neuronal phenotype staining. Briefly, sections were mounted on slides, dried overnight and frozen (-20°C). After moisturizing in PBS, slices were incubated for 60 minutes at room temperature in 2% bovine serum albumin (BSA), 0.5% Triton X-100 in PBS (PBS-BSA). After appropriate washing in PBS (as for after each incubation), sections were incubated for 24 hours with goat anti c-Fos antibody at room temperature (for antibody specifications and dilutions see Table 2). Sections were placed for 3 hours at room temperature with a biotinylated secondary antibody (Vector laboratories, Burlingame, CA), diluted 1:200 in PBS-BSA. In order to quench

endogenous peroxidase, slides were treated with 1% H₂O₂ for 30 min and then with Elite Vectastain ABC reagent (1h at room temperature) in order to enhance bound secondary antibody. Antibody complexes were then revealed by a reaction for 5 to 10 min with diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB, Sigma) (with 0.01% H₂O₂) until a Fos-like brown-black staining appeared. Fos staining was followed by neuronal phenotype staining (dβH³ or GLP-1 for brainstem sections and α-MSH for hypothalamic sections). Briefly, sections were washed and incubated in PBS-BSA for 60 min before incubation for 72h at 4°C in proper primary antibody serum at an appropriate dilution in PBS-BSA (see Table 2). After incubation with biotinylated secondary antibody, staining was amplified with the ABC reagent as described above, and complexes were revealed by reaction for 10 to 15 mins with the Elite Vectastain SG kit (Vector Laboratories) until blue-grey cytoplasmic staining appeared. After washing and drying overnight, sections were cleared in a 100% ethanol bath (2 min) followed by 2 baths of xylene (5 and 10 min respectively), and cover-slipped with Depex (BDH). In order to check for staining variability between days, the series contained matched sections from all experimental groups.

Quantitative analysis of staining

The sections for analysis were magnified under a Zeiss computer-assisted microscope (Zeiss, Germany). Pictures were obtained and analyzed using imaging software (Axiovision v4.5, Zeiss, Germany). The total number of Fos-positive neurons in each section was determined, as was the total number of specific phenotype-positive neurons.

³ Dopamine-β-Hydroxylase (dβH) is an enzyme responsible for the conversion of dopamine into noradrenaline and therefore allowed us to identify noradrenaline/adrenaline neurons.

Finally, double-labeled neurons were counted. Fos-positive neurons were counted when exhibiting dark-brown nuclei, and phenotype-positive neurons were counted when dark-blue/grey ring cytoplasm were clearly identified. The results of neuronal activation are presented as averaged results for each 200- μ m segment of the studied area (averaging two counted sections per rat per segment), except for GLP-1 staining where 400- μ m segments were used because of the limited number of neurons exhibiting GLP-1 expression.

Statistics

Results are expressed as means $\pm$ S.E.M (n=6-8 per group for all data). Differences between groups were determined by one-way ANOVA (Proc GLM, SAS version 6.11, Cary, NC, USA), testing a diet effect on global activation of the areas studied. If statistical differences were found, post hoc test (Dunnet) were carried out to identify specific parts of the areas that expressed different activation in response to the diets.

A difference was considered significant when $P < 0.05$. Because of the impact of environmental conditions on Fos expression in the brain, P55 groups were only compared with a P14 group that were fed during the same period of time, and not between each other (acute vs chronic).

RESULTS

Food intake after a high protein load

Rats entirely ate their 3g-load each days of the experimental period. Water intake was measured during the meal, and groups did not exhibit any difference in water

consumption during this period ($1.5 \pm 0.4\text{ml}$ and $1.1 \pm 0.5\text{ml}$ for P14 and P55 groups respectively). When compared to those getting P14, rats receiving a P55 load exhibited a significantly lower food intake during the first hour of *ad libitum* P14 consumption, in acute condition as well as after habituation. After 2 days or 3 weeks of P55 meals, rats decreased their 1h-P14 intake (**Fig 2**, at d2: 3g meal + 1h P14 intake: $132.6 \pm 7.3\text{ kJ}$ vs. $108.1 \pm 5.8\text{ kJ}$ for P14 and P55A groups respectively, diet effect, $P < 0.05$; at d21: $173.2 \pm 12.1\text{ kJ}$ vs. $131.8 \pm 11.7\text{ kJ}$ for P14 and P55A groups respectively, diet effect, $P < 0.05$). Moreover, paired comparison with the last days of the pre-feeding period showed that P55 meals decreased 1h-P14 intake by 19.9% ($111.0 \pm 4.0\%$ vs. $88.9 \pm 3.7\%$ for P14 groups and P55 groups respectively, diet effect, $P < 0.01$).

Brainstem response to the high protein meal at day 2 and day 21

Ingestion of the high protein meal at day 2 induced an increase in Fos protein expression in the NTS (46.7 ± 4.5 vs. 32.0 ± 3.2 for P55A and P14 groups respectively, $F[1,57]=7.75$; $P < 0.01$). Indeed, the number of Fos positive neurons was increased in the most rostral part of the NTS studied (**Fig 3A and 4A**) in P55A rats when compared with P14 rats (67.5 ± 10.6 vs. 37.8 ± 14.4 at around -13.6 mm from Bregma and 78.3 ± 17.3 vs. 41.8 ± 10.0 at around -13.4 mm from Bregma; $P < 0.05$ for both segments). Moreover, P55A meals increased the number of double-labeled Fos and $\text{d}\beta\text{H}$ positive neurons (15.1 ± 1.6 vs. 10.5 ± 1.1 for P55A and P14 groups respectively, $F[1,51]=5.70$; $P < 0.05$) in the same area (**Fig 3A and 5A**; 18.8 ± 3.9 vs. 9.3 ± 3.2 at around -13.6 mm from Bregma for the P55A and P14 diets respectively, $P < 0.05$), whereas total number of $\text{d}\beta\text{H}$ containing neurons was not increased (77.1 ± 5.6 vs. 64.7 ± 6.0 for P55A and P14 groups

respectively). Moreover, no differences were observed between P55A and P14 rats regarding the number of double-labeled Fos and GLP-1 positive neurons (5.9 ± 0.7 vs. 5.9 ± 1.4 for P55A and P14 groups respectively) in any area studied (**Fig 3B and 5C**).

Ingestion of the high protein meal at day 21 led to results similar to those obtained in the acute conditions. Indeed, rats in the P55C group also showed an increase in Fos protein expression (87.6 ± 5.0 vs. 62.4 ± 4.8 for P55C and P14 groups respectively, $F[1,77]=13.23$; $P<0.001$) in the most rostral part of the NTS studied (**Fig 4B**; 125.1 ± 15.1 vs. 78.0 ± 11.7 at around -13.6 mm from Bregma and 111.9 ± 8.1 vs. 72.3 ± 13.4 at around -13.4 mm from Bregma in the P55C and P14 groups respectively, $P<0.05$ for both segments). P55C meals also increased the number of double-labeled Fos and $\delta\beta\text{H}$ positive neurons (25.7 ± 1.4 vs. 21.2 ± 1.1 for P55C and P14 groups respectively, $F[1,74]=3.6$; $P<0.05$) in the same area (**Fig 5B**; 31.9 ± 2.9 vs. 22.4 ± 3.7 at around -13.4 mm from Bregma for the P55A and P14 diets respectively, $P<0.05$), while not increasing total number of $\delta\beta\text{H}$ containing neurons (55.3 ± 2.9 vs. 58.4 ± 4.0 for P55L and P14 groups respectively). As for P55A rats, no differences were observed between P55C and P14 rats regarding the number of double-labeled Fos and GLP-1 positive neurons (18.5 ± 2.7 vs. 20 ± 3.6 for P55L and P14 groups respectively) in any area studied (**Fig 3B and 5D**).

Hypothalamic response to the high protein meal at day 2 and day 21

In the arcuate nucleus (ARC), ingestion of the high protein meal at day 2 did not increase the number of Fos positive neurons (44.6 ± 2.7 vs. 49.1 ± 3.0 for P55A and P14 groups respectively, data not shown). However, P55A rats showed an increased number

of double-labeled Fos and α -MSH positive neurons (28.2 ± 2.4 vs. 16.2 ± 1.2 for P55A and P14 groups respectively, $F[1,157]=23.21$; $P<0.001$), especially in the caudal part of the ARC (**Fig 6 and 3C**; for the P55A and P14 diets respectively: 35.3 ± 7.3 vs. 9.8 ± 2.5 at around -4.2 mm from Bregma, diet effect: $P<0.01$; 37.0 ± 5.4 vs. 22.5 ± 5.8 at around -4.0 mm from Bregma, $P<0.05$; 41.3 ± 4.7 vs. 19.1 ± 2.9 at around -3.8 mm from Bregma, $P<0.01$). Moreover, P55A rats showed a important decrease in non-POMC activated neurons (15.2 ± 2.0 vs. 33.9 ± 2.7 for P55A and P14 groups respectively, $F[1,155]=16.87$; $P<0.001$) in many of the segments studied (**Suppl. Fig 1**; for P55A and P14 groups respectively: 5 ± 5.7 vs. 45.3 ± 15.2 at around -2.4 mm from Bregma, $P<0.05$; 6.0 ± 4.2 vs. 27.5 ± 8.7 at around -2.6 mm from Bregma, $P<0.05$; 9.0 ± 4.0 vs. 31.7 ± 7.5 at around -3.8 mm from Bregma, $P<0.01$; 6.7 ± 5.0 vs. 35.6 ± 8.2 at around -4.0 mm from Bregma, $P<0.01$; 12.3 ± 6.8 vs. 34.8 ± 8.9 at around -4.4 mm from Bregma, $P<0.01$).

Ingestion of the high protein meal at day 21 produced results similar to (but less marked than) those obtained under acute consumption. No differences between the P55C and P14 groups were noted concerning the total number of Fos positive neurons in any of the segments studied. And like the in the P55A group, P55C animals exhibited a higher number of double-labeled Fos and α -MSH positive neurons in the caudal part of the ARC, but only in one segment (**Fig 6 and 3C**; 19.6 ± 4.7 vs. 9.7 ± 4.4 at around -4.2 mm from Bregma with the P55A and P14 diets respectively, $P<0.05$).

DISCUSSION

A reduction in energy intake induced by dietary protein may result from two distinct mechanisms, i.e. satiety and non physiological anorexia. The present results show that a high protein meal induced a reduction in food intake during a subsequent meal in parallel to an activation of neuronal pathways involved in the induction of satiety in both the nucleus of the solitary tract (NTS) and the arcuate nucleus of the hypothalamus (ARC). By contrast, the NTS neuronal pathway related to non physiological anorexia was not significantly recruited by the high protein meal, which is consistent with a lack of aversive response related to a high protein diet.

The present findings regarding satiety-related brain neuronal pathways are in line with previous behavioral observations which showed that a high protein diet induced satiety but did not induce conditioned taste aversion (CTA) (13,15). These results are also generally in agreement with those of a previous c-Fos study on the effects of a high protein diet on NTS activation (7). In addition, this study has broadened previous observations by identifying precise groups of neurons (and more particularly noradrenergic neurons) associated with the satiety induced by a high protein meal (27). These neurons (usually described as A2 neurons) are known to send projection to the paraventricular nucleus of the hypothalamus (28-31). However, retrograde lesions of specific NA/A neurons from the PVH have no effect on CCK-induced anorexia (32), and damaged half of A2 neurons (32,33). Nevertheless complete lesions of the A2 group dampens the CCK-induced anorexia in a neuron number dependant manner (8). Therefore, half of A2 neurons which happen not to be triggered by orexigenic stimulus like glucoprivation (34), and that send projections to other hypothalamic area (8) or to

the ventrolateral medulla (30) are responsible for CCK-induced anorexia. We did not discriminate in our study which part of the A2 neurons were activated by high protein meals, but triggering a potent anorectic pathway as CCK's could explain part of the effect of high protein meals in reducing energy intake.

These results are in line with the increased activation of the melanocortins pathway within the arcuate nucleus of the hypothalamus induced by high protein meals. Neurons in this area are principally regulated by two types of signals: (i) circulating nutrients and/or hormones and (ii) other brain areas involved in the regulation of food intake, especially NPY/AgRP neurons in the ARC. Variations in the levels of post-prandial circulating hormones induced by a high protein meal are still a matter of debate, and post-ingestive satiety could be mediated by modulation of the release of hormones such as ghrelin, GLP-1, CCK, or peptide YY (35), as well as by insulin and leptin. The role of hormones thus cannot be ruled out and this hypothesis needs to be verified, especially for leptin which can act directly on POMC neurons in the ARC (19,36) and could therefore explain the increased activation of these neurons. An alternative explanation for this increased POMC neurons activation is a decrease in NPY neurons activity. Indeed, our results showed that non-POMC neurons were significantly less activated with high protein meals. Since arcuate neurons are mainly POMC or NPY (37), it could be hypothesized that NPY neurons are less activated after high protein meals. Considering the tonic inhibitory action of NPY neurons on POMC neurons, a reduction in the activity of NPY neurons would lead to an increased activation of POMC neurons (18,38).

The activation of neuronal pathways involved in satiety within the NTS and ARC after the acute and chronic consumption of high protein meals highlighted the fact that dietary protein-induced satiety is related to the activation of different anorexigenic pathways. This may explain the failure to suppress protein induced hypophagia through vagotomy (16,39,40). Activation of the noradrenergic/adrenergic pathway within the NTS suggests that the vagus nerve is indeed activated by high protein meal and conveys anorexigenic signals. In addition, even without the activation of brainstem or vagal inputs, high protein diets promote satiety through an enhancement of melanocortin neurons activity within the ARC. High protein meals are thus able to mobilize different pathways to promote satiety. These multiple targets of dietary proteins can be explained by the different pre- and post- absorptive specificities of protein. A higher protein content increases gastric volume (without any additional water intake in our study) and delays gastric emptying (41) via CCK pathways (42). Since gastric distension induces Fos in the NTS (43), and activates noradrenergic neurons in this area (44,45), with a volume consistent with what was used in our study (i.e 9 ml for the 3g-meal), a longer lasting increase in gastric volume would induce activation of the brainstem noradrenergic pathway.

Furthermore, the delivery of peptone or dietary peptides requires peripheral and central CCK receptors to induce satiety (46,47). It has previously been demonstrated that luminal peptides induce CCK release from endocrine cells through activation of the peptide transport system Pept1 (48). If the protein effect on brainstem is mediated by peptides arising from digestion and the release of CCK that binds to peripheral CCK-A

receptors via the vagus nerve, this would explain why c-fos studies using free amino acid solutions failed to induce brainstem activation (49,50). If free amino acid solutions do not trigger NTS activation, they are nonetheless able to induce satiety (50) in the same way as intact protein. Following the intestinal absorption of free amino acids the rise in blood amino acid levels would therefore directly activate a central areas sensitive to circulating nutrients, like the ARC, enable to detect blood nutrients thanks to its proximity to the 3rd ventricle and its weaker blood-brain barrier (51). High protein meal increased plasma concentration of amino acids like leucine, sensed by the mammalian target of rapamycin (mTOR) and activate POMC neurons (52). An alternative is the direct amino acid nutrient activation of VMH and then POMC neurons in the ARC (53,54).

Another objective of this study was to determine if high protein meals failed to activate neuronal pathways usually involved in CTA by studying the activation of brainstem GLP-1 pathway, and therefore our results support previous studies showing that high protein-induced anorexia was not CTA-related (13,15). The brainstem GLP-1 pathway is involved in satiety, especially in conveying signals regarding moderate gastric distension (55) but these neurons are also known to be activated during CTA. Indeed, the central administration of GLP-1 induces CTA in rats (56) and the brainstem GLP-1 pathway is essential for or activated by many aversive stimuli like LiCl (9,57), lipopolysaccharide (58) aversive doses of CCK (10), or nociceptive gastric distension (55). These neurons send direct projections into the parabrachial nucleus (59) involved in taste aversion learning (14) and direct/indirect projections into the central nucleus of the amygdalia (60), also involved in CTA formation (61). The lack of difference in

activation of GLP-1 neural pathway within the NTS between high and standard protein meals therefore provided further evidence that the high protein meal did not induce CTA in rats. High protein-induced anorexia would therefore result from greater satiety and the activation of related neural pathways.

In this study, we show that high protein meals induce an increase activation of two major brain areas involved in the control of food intake. Whether other areas are involved in detecting high protein meals, including the area postrema or the anterior piriform cortex (which is able to detect indispensable amino acid deficiency) remains to be further determined. Moreover, variations in other hypothalamic circuits, such as orexin-containing neurons in the lateral hypothalamic area or neural pathways within the paraventricular nucleus of the hypothalamus, still need to be studied, as well as the relationship between the hypothalamic area and the brainstem (especially via melanocortinergeric connections (62,63). A question generally raised regarding reductions in food intake with dietary nutrients is whether this behavior will slowly fade over several days and repeated intakes. The present results show that with respect to the neuronal pathways involved in satiety, repeated intakes did not suppress an increase in the activation of these pathways, especially in the brainstem.

GRANTS

This study was supported by Institut National de la Recherche Agronomique (Paris, France) and Institut National Agronomique Paris-Grignon (Paris, France).

Bibliography

1. Bensaid, A., Tome, 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.
2. Faipoux, R., Tome, D., Bensaid, A., Morens, C., Oriol, E., Bonnanno, L. M. & Fromentin, G. (2006) Yeast proteins enhance satiety in rats. *J Nutr* 136: 2350-2356.
3. French, J., Wainwright, C., Booth, D. & Hamilton, J. (1992) Effects of meat species and particle size on postprandial satiety. *Proc Nutr Soc.* 51: 51-57.
4. Jean, C., Rome, S., Mathe, V., Huneau, J. F., Aattouri, N., Fromentin, G., Achagiotis, C. L. & Tome, D. (2001) Metabolic evidence for adaptation to a high protein diet in rats. *J Nutr* 131: 91-98.
5. Lacroix, M., Gaudichon, C., Martin, A., Morens, C., Mathe, V., Tome, D. & Huneau, J. F. (2004) A long-term high-protein diet markedly reduces adipose tissue without major side effects in Wistar male rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 287: R934-942.
6. Reid, M. & Hetherington, M. (1997) Relative effects of carbohydrates and protein on satiety -- a review of methodology. *Neurosci Biobehav Rev* 21: 295-308.
7. Darcel, N., Fromentin, G., Raybould, H. E., Gougis, S., Gietzen, D. W. & Tome, D. (2005) 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.
8. Rinaman, L. (2003) Hindbrain noradrenergic lesions attenuate anorexia and alter central cFos expression in rats after gastric viscerosensory stimulation. *J Neurosci* 23: 10084-10092.
9. Anonymous (1999) A functional role for central glucagon-like peptide-1 receptors in lithium chloride-induced anorexia. *Am J Physiol* 277: R1537-1540.
10. Anonymous (1999) Interoceptive stress activates glucagon-like peptide-1 neurons that project to the hypothalamus. *Am J Physiol* 277: R582-590.
11. Anonymous (2004) Hindbrain contributions to anorexia. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 287: R1035-1036.
12. Seeley, R. J., Blake, K., Rushing, P. A., Benoit, S., Eng, J., Woods, S. C. & D'Alessio, D. (2000) The role of CNS glucagon-like peptide-1 (7-36) amide receptors in mediating the visceral illness effects of lithium chloride. *J Neurosci* 20: 1616-1621.

13. Bensaid, A., Tome, D., L'Heureux-Bourdon, 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.
14. Fromentin, G., Feurte, S., Nicolaidis, S. & Norgren, R. (2000) Parabrachial lesions disrupt responses of rats to amino acid devoid diets, to protein-free diets, but not to high-protein diets. *Physiol Behav* 70: 381-389.
15. L'Heureux-Bourdon, D., Tome, D., Bensaid, A., Morens, C., Gaudichon, C. & Fromentin, G. (2004) A very high 70%-protein diet does not induce conditioned taste aversion in rats. *J Nutr* 134: 1512-1515.
16. L'Heureux-Bourdon, D., Tome, D., Rampin, O., Even, P. C., Larue-Achagiotis, C. & Fromentin, G. (2003) Total subdiaphragmatic vagotomy does not suppress high protein diet-induced food intake depression in rats. *J Nutr* 133: 2639-2642.
17. Cowley, M. A. (2003) Hypothalamic melanocortin neurons integrate signals of energy state. *Eur J Pharmacol* 480: 3-11.
18. Cowley, M. A., Smart, J. L., Rubinstein, M., Cerdan, M. G., Diano, S., Horvath, T. L., Cone, R. D. & Low, M. J. (2001) Leptin activates anorexigenic POMC neurons through a neural network in the arcuate nucleus. *Nature* 411: 480-484.
19. Elias, C. F., Aschkenasi, C., Lee, C., Kelly, J., Ahima, R. S., Bjorbaek, C., Flier, J. S., Saper, C. B. & Elmquist, J. K. (1999) Leptin differentially regulates NPY and POMC neurons projecting to the lateral hypothalamic area. *Neuron* 23: 775-786.
20. Balthasar, N., Dalgaard, L. T., Lee, C. E., Yu, J., Funahashi, H., Williams, T., Ferreira, M., Tang, V., McGovern, R. A. et al. (2005) Divergence of melanocortin pathways in the control of food intake and energy expenditure. *Cell* 123: 493-505.
21. Elias, C. F., Lee, C., Kelly, J., Aschkenasi, C., Ahima, R. S., Couceyro, P. R., Kuhar, M. J., Saper, C. B. & Elmquist, J. K. (1998) Leptin activates hypothalamic CART neurons projecting to the spinal cord. *Neuron* 21: 1375-1385.
22. Levine, A. S., Jewett, D. C., Cleary, J. P., Kotz, C. M. & Billington, C. J. (2004) Our journey with neuropeptide Y: effects on ingestive behaviors and energy expenditure. *Peptides* 25: 505-510.
23. Williams, G., Cai, X. J., Elliott, J. C. & Harrold, J. A. (2004) Anabolic neuropeptides. *Physiol Behav* 81: 211-222.
24. 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.
25. Magoul, R., Onteniente, B., Benjelloun, W. & Tramu, G. (1993) Tachykinergic afferents to the rat arcuate nucleus. A combined immunohistochemical and retrograde tracing study. *Peptides* 14: 275-286.
26. Larsen, P. J., Tang-Christensen, M., Holst, J. J. & Orskov, C. (1997) Distribution of glucagon-like peptide-1 and other preproglucagon-derived peptides in the rat hypothalamus and brainstem. *Neuroscience* 77: 257-270.
27. Emond, M., Schwartz, G. J. & Moran, T. H. (2001) Meal-related stimuli differentially induce c-Fos activation in the nucleus of the solitary tract. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 280: R1315-1321.
28. Cunningham, E. T., Jr., Bohn, M. C. & Sawchenko, P. E. (1990) Organization of adrenergic inputs to the paraventricular and supraoptic nuclei of the hypothalamus in the rat. *J Comp Neurol* 292: 651-667.
29. Cunningham, E. T., Jr. & Sawchenko, P. E. (1988) Anatomical specificity of noradrenergic inputs to the paraventricular and supraoptic nuclei of the rat hypothalamus. *J Comp Neurol* 274: 60-76.
30. Sawchenko, P. E. & Swanson, L. W. (1982) The organization of noradrenergic pathways from the brainstem to the paraventricular and supraoptic nuclei in the rat. *Brain Res* 257: 275-325.
31. Anonymous (1982) Immunohistochemical identification of neurons in the paraventricular nucleus of the hypothalamus that project to the medulla or to the spinal cord in the rat. *J Comp Neurol* 205: 260-272.
32. Ritter, S., Bugarith, K. & Dinh, T. T. (2001) Immunotoxic destruction of distinct catecholamine subgroups produces selective impairment of glucoregulatory responses and neuronal activation. *J Comp Neurol* 432: 197-216.
33. Hudson, B. & Ritter, S. (2004) Hindbrain catecholamine neurons mediate consummatory responses to glucoprivation. *Physiol Behav* 82: 241-250.
34. Ritter, S., Llewellyn-Smith, I. & Dinh, T. T. (1998) Subgroups of hindbrain catecholamine neurons are selectively activated by 2-deoxy-D-glucose induced metabolic challenge. *Brain Res* 805: 41-54.
35. Lejeune, M. P., Westerterp, K. R., Adam, T. C., Luscombe-Marsh, N. D. & Westerterp-Plantenga, M. S. (2006) Ghrelin and glucagon-like peptide 1 concentrations, 24-h satiety, and energy and substrate metabolism during a high-protein diet and measured in a respiration chamber. *Am J Clin Nutr* 83: 89-94.

36. Elmquist, J. K., Elias, C. F. & Saper, C. B. (1999) From lesions to leptin: hypothalamic control of food intake and body weight. *Neuron* 22: 221-232.
37. Bagnol, D., Lu, X. Y., Kaelin, C. B., Day, H. E., Ollmann, M., Gantz, I., Akil, H., Barsh, G. S. & Watson, S. J. (1999) Anatomy of an endogenous antagonist: relationship between Agouti-related protein and proopiomelanocortin in brain. *J Neurosci* 19: RC26.
38. Jobst, E. E., Enriori, P. J. & Cowley, M. A. (2004) The electrophysiology of feeding circuits. *Trends Endocrinol Metab* 15: 488-499.
39. Reidelberger, R. D., Hernandez, J., Fritzsche, B. & Hulce, M. (2004) Abdominal vagal mediation of the satiety effects of CCK in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 286: R1005-1012.
40. Schwartz, G. J., Salorio, C. F., Skoglund, C. & Moran, T. H. (1999) Gut vagal afferent lesions increase meal size but do not block gastric preload-induced feeding suppression. *Am J Physiol* 276: R1623-1629.
41. Morens, C., Gaudichon, C., Fromentin, G., Marsset-Baglieri, A., Bensaid, A., Larue-Achagiotis, C., Luengo, C. & Tome, D. (2001) Daily delivery of dietary nitrogen to the periphery is stable in rats adapted to increased protein intake. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 281: E826-836.
42. Lal, S., McLaughlin, J., Barlow, J., D'Amato, M., Giacovelli, G., Varro, A., Dockray, G. J. & Thompson, D. G. (2004) Cholecystokinin pathways modulate sensations induced by gastric distension in humans. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 287: G72-79.
43. Rinaman, L., Baker, E. A., Hoffman, G. E., Stricker, E. M. & Verbalis, J. G. (1998) Medullary c-Fos activation in rats after ingestion of a satiating meal. *Am J Physiol* 275: R262-268.
44. Rogers, R. C., Travagli, R. A. & Hermann, G. E. (2003) Noradrenergic neurons in the rat solitary nucleus participate in the esophageal-gastric relaxation reflex. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 285: R479-489.
45. Willing, A. E. & Berthoud, H. R. (1997) Gastric distension-induced c-fos expression in catecholaminergic neurons of rat dorsal vagal complex. *Am J Physiol* 272: R59-67.
46. Pupovac, J. & Anderson, G. H. (2002) Dietary peptides induce satiety via cholecystokinin-A and peripheral opioid receptors in rats. *J Nutr* 132: 2775-2780.
47. Reidelberger, R. D., Heimann, D., Kelsey, L. & Hulce, M. (2003) Effects of peripheral CCK receptor blockade on feeding responses to duodenal nutrient infusions in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 284: R389-398.

48. Darcel, N. P., Liou, A. P., Tome, D. & Raybould, H. E. (2005) Activation of vagal afferents in the rat duodenum by protein digests requires PepT1. *J Nutr* 135: 1491-1495.
49. Phifer, C. B. & Berthoud, H. R. (1998) Duodenal nutrient infusions differentially affect sham feeding and Fos expression in rat brain stem. *Am J Physiol* 274: R1725-1733.
50. 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.
51. Peruzzo, B., Pastor, F. E., Blazquez, J. L., Schobitz, K., Pelaez, B., Amat, P. & Rodriguez, E. M. (2000) A second look at the barriers of the medial basal hypothalamus. *Exp Brain Res* 132: 10-26.
52. Cota, D., Proulx, K., Smith, K. A., Kozma, S. C., Thomas, G., Woods, S. C. & Seeley, R. J. (2006) Hypothalamic mTOR signaling regulates food intake. *Science* 312: 927-930.
53. King, B. M. (2006) The rise, fall, and resurrection of the ventromedial hypothalamus in the regulation of feeding behavior and body weight. *Physiol Behav* 87: 221-244.
54. Sternson, S. M., Shepherd, G. M. & Friedman, J. M. (2005) Topographic mapping of VMH --> arcuate nucleus microcircuits and their reorganization by fasting. *Nat Neurosci* 8: 1356-1363.
55. Vrang, N., Phifer, C. B., Corkern, M. M. & Berthoud, H. R. (2003) Gastric distension induces c-Fos in medullary GLP-1/2-containing neurons. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 285: R470-478.
56. Thiele, T. E., Van Dijk, G., Campfield, L. A., Smith, F. J., Burn, P., Woods, S. C., Bernstein, I. L. & Seeley, R. J. (1997) Central infusion of GLP-1, but not leptin, produces conditioned taste aversions in rats. *Am J Physiol* 272: R726-730.
57. Thiele, T. E., Seeley, R. J., D'Alessio, D., Eng, J., Bernstein, I. L., Woods, S. C. & van Dijk, G. (1998) Central infusion of glucagon-like peptide-1-(7-36) amide (GLP-1) receptor antagonist attenuates lithium chloride-induced c-Fos induction in rat brainstem. *Brain Res* 801: 164-170.
58. Grill, H. J., Carmody, J. S., Amanda Sadacca, L., Williams, D. L. & Kaplan, J. M. (2004) Attenuation of lipopolysaccharide anorexia by antagonism of caudal brain stem but not forebrain GLP-1-R. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 287: R1190-1193.

59. Herbert, H., Moga, M. M. & Saper, C. B. (1990) Connections of the parabrachial nucleus with the nucleus of the solitary tract and the medullary reticular formation in the rat. *J Comp Neurol* 293: 540-580.
60. Jia, H. G., Rao, Z. R. & Shi, J. W. (1994) An indirect projection from the nucleus of the solitary tract to the central nucleus of the amygdala via the parabrachial nucleus in the rat: a light and electron microscopic study. *Brain Res* 663: 181-190.
61. Kinzig, K. P., D'Alessio, D. A. & Seeley, R. J. (2002) The diverse roles of specific GLP-1 receptors in the control of food intake and the response to visceral illness. *J Neurosci* 22: 10470-10476.
62. Fan, W., Ellacott, K. L., Halatchev, I. G., Takahashi, K., Yu, P. & Cone, R. D. (2004) Cholecystokinin-mediated suppression of feeding involves the brainstem melanocortin system. *Nat Neurosci* 7: 335-336.
63. Zheng, H., Patterson, L. M., Phifer, C. B. & Berthoud, H. R. (2005) Brain stem melanocortinergic modulation of meal size and identification of hypothalamic POMC projections. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 289: R247-258.

Fig. 1. Feeding patterns for each diet tested.

Two P14 groups are used in order to match sacrifice days with P55 groups. During P14 days (grey), all groups were fed the P14 diet throughout the day (load + *ad libitum* period). During P55 days (black), rats were fed a P55 load then the P14 diet *ad libitum*.

Fig. 2. Effect of a high protein load on 1-h intake of the P14 diet.

After ingesting a 3g load (of the P14 or P55 diet, depending on the group), rats were fed the P14 diet. The 1-h intake was measured and P55 groups showed a decrease in food intake. Values are means $\pm$ SEM. *: $P < 0.05$.

Fig. 3. Effect of high protein meals on brainstem noradrenergic and GLP-1 and arcuate POMC neuronal activation.

A: Photomicrograph of the rostral part of the NTS. Fos-labeled neurons (brown nuclei, x10) and double-labeled Fos/d β H neurons (brown nuclei and blue/grey cytoplasm). Zoom (x40) shows one neuron.

B: GLP-1 staining in the NTS (blue/grey cytoplasm, x20). Zoom (x40) shows one double-labeled neuron.

C: Photomicrograph of the arcuate nucleus. Fos-labeled neurons (brown nuclei, x20) and double-labeled Fos/ α -MSH neurons (brown nuclei and blue/grey cytoplasm). Zoom (x40) shows one double-labeled neuron.

Arrows: examples of double-labeled neurons.

Fig. 4. Fos positive neurons in the NTS after acute (A) and chronic (B) high protein meals. Values are means $\pm$ SEM. *: $P < 0.05$.

Fig. 5. Activation of brainstem noradrenergic and GLP-1 neurons after acute (A and C) or chronic (B and D) high protein meals.

Values are means $\pm$ SEM. *: $P < 0.05$. Contrary to d β H staining (where 200- μ m segments were used), 400- μ m segments were used for GLP-1 staining because expression neurons were too sparse.

Fig. 6. Activation of arcuate POMC neurons after acute (A) or chronic (B) high protein meals.

Values are means $\pm$ SEM. *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$.

Table 1*Composition of experimental diets. **

	P14	P55
	<i>g/kg diet</i>	
Total milk protein ¹	140	530
Cornstarch	622.4	277
Sucrose	100.3	50
Soybean oil ⁴	40	40
AIN 93M mineral mix ⁵	35	35
AIN93V vitamin mix ⁵	10	10
Cellulose ⁶	50	50
Choline ⁵	2.3	2.3
Metabolizable energy <i>kJ/g</i>	14.6	14.6
P/E (%)	14	55
G/E (%)	76	35
L/E (%)	10	10

¹ Armor Protéines Saint Brioux, France; ² Cerestar, Haubourdin, France; ³ Eurosucre, Paris, France; ⁴ Bailly SA, Aulnay-sous-bois, France; ⁵ ICN Biochemicals, Ohio, USA (see Reeves et al. 1993 for composition); ⁶ Medias filtrants Durieux, Torcy, France. P/E, G/E, L/E: percentage of diet energy provided by protein, carbohydrates and lipids, respectively.

Table 2*Source and dilution of antibodies used **

Antibody	Dilution	Host	Source
c-fos (sc-52)	1:1000	Rabbit	Santa Cruz Biotechnology Inc, Santa Cruz CA
dβH (MAB308)	1:1000	Mouse	Chemicon Int, Temecula, CA
GLP-1 (T-4057)	1:1000	Rabbit	Peninsula Laboratories Inc, Belmont, CA
α-MSH (AB5087)	1:10000	Sheep	Chemicon Int, Temecula, CA

* α-MSH, α-Melanocortin Stimulating Hormone; GLP-1, Glucagon Like Peptide-1;
dβH, dopamine-β-Hydroxylase.

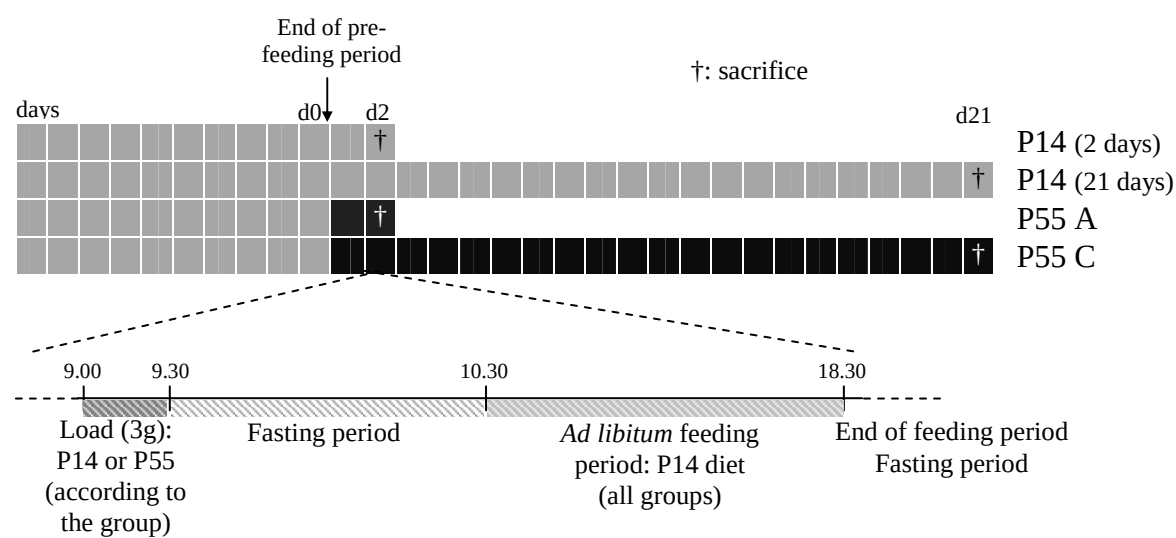


Figure 1

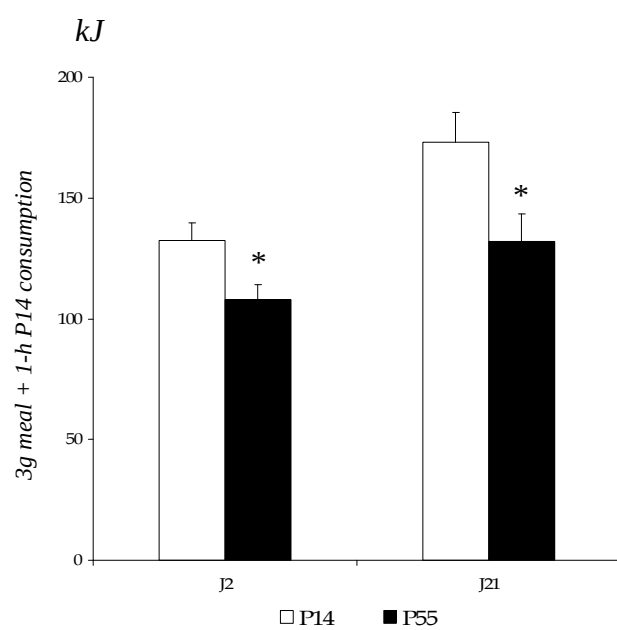


Figure 2

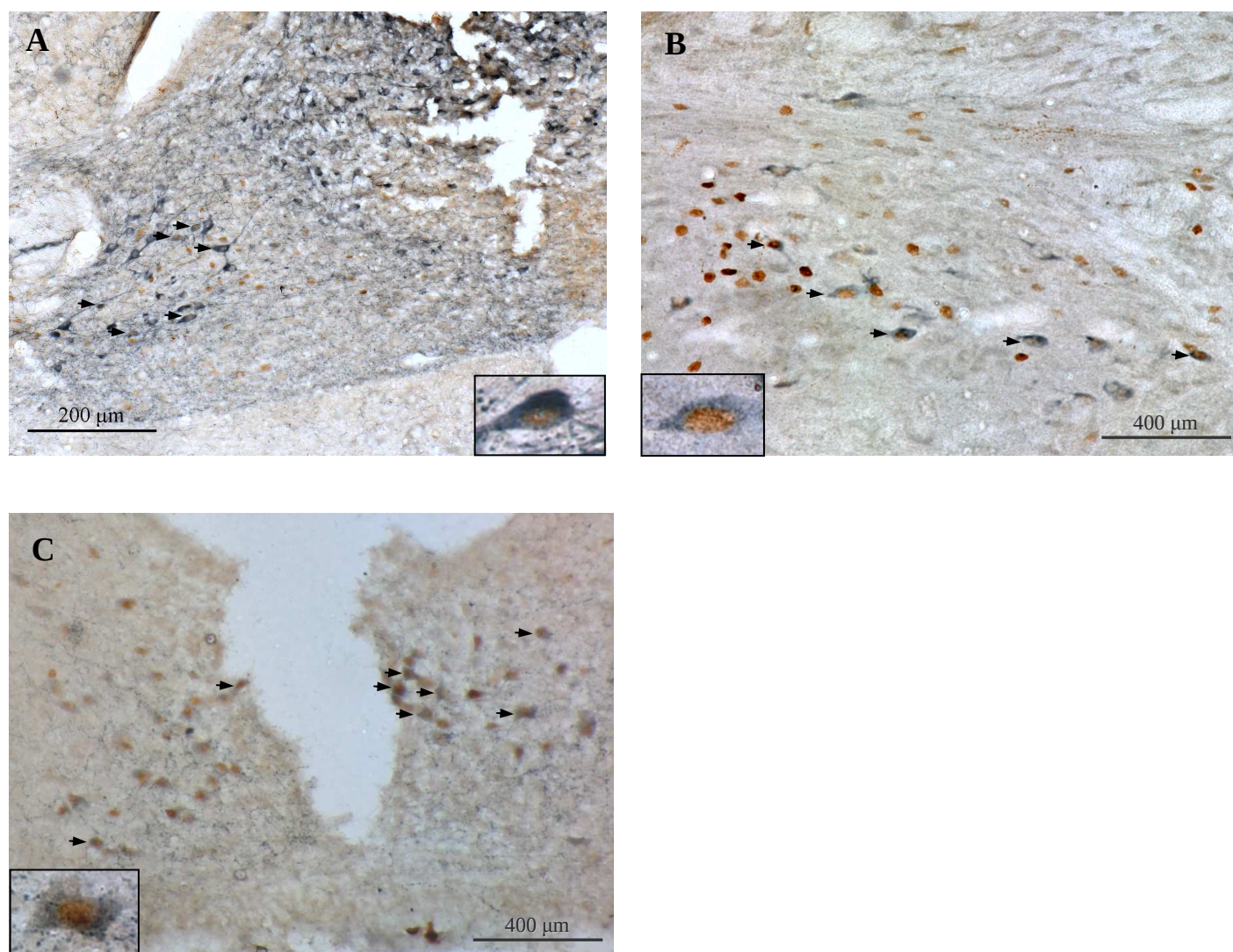


Figure 3

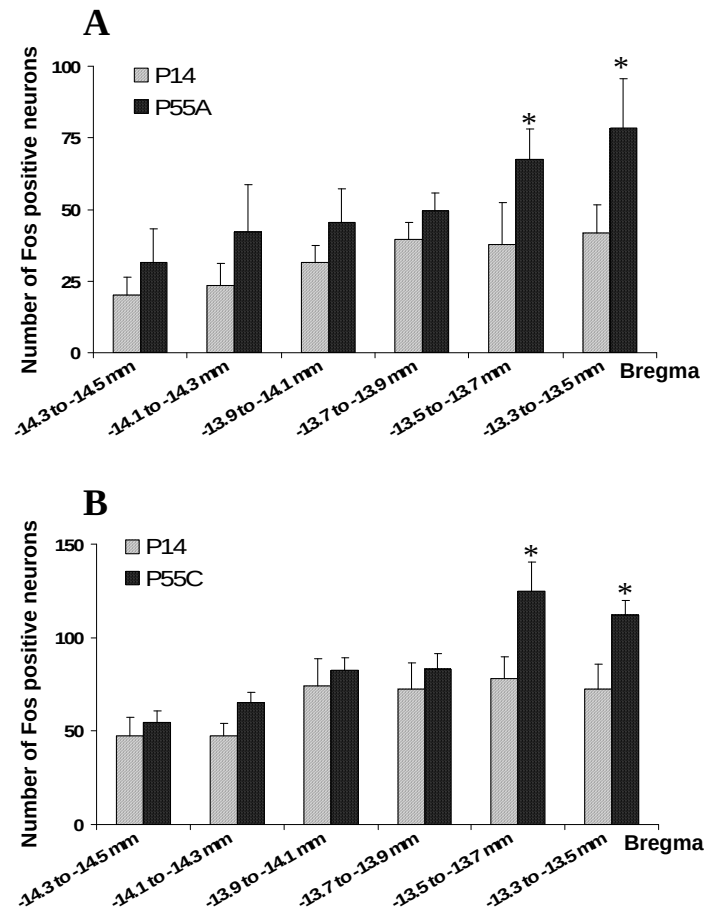


Figure 4

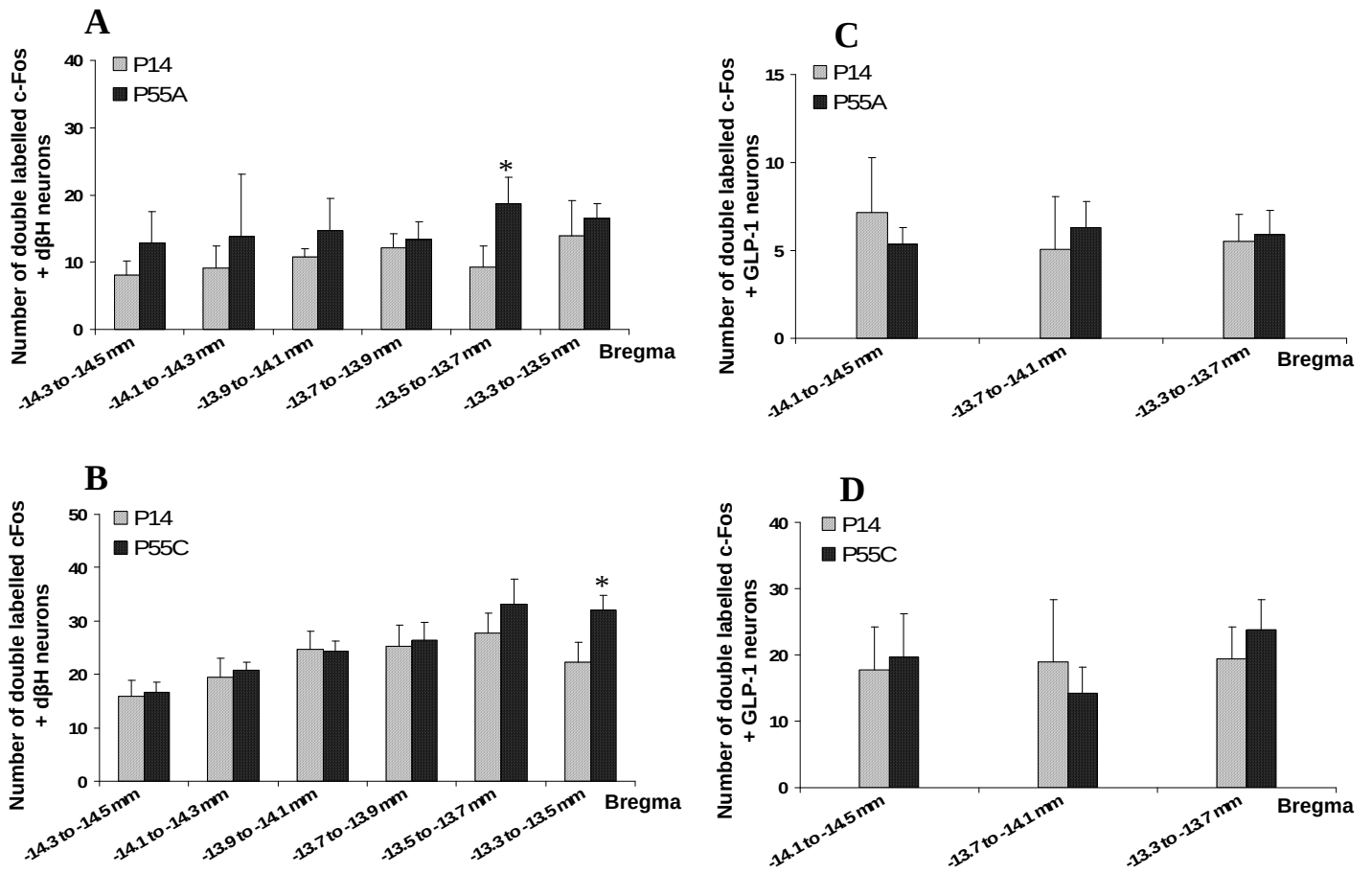


Figure 5

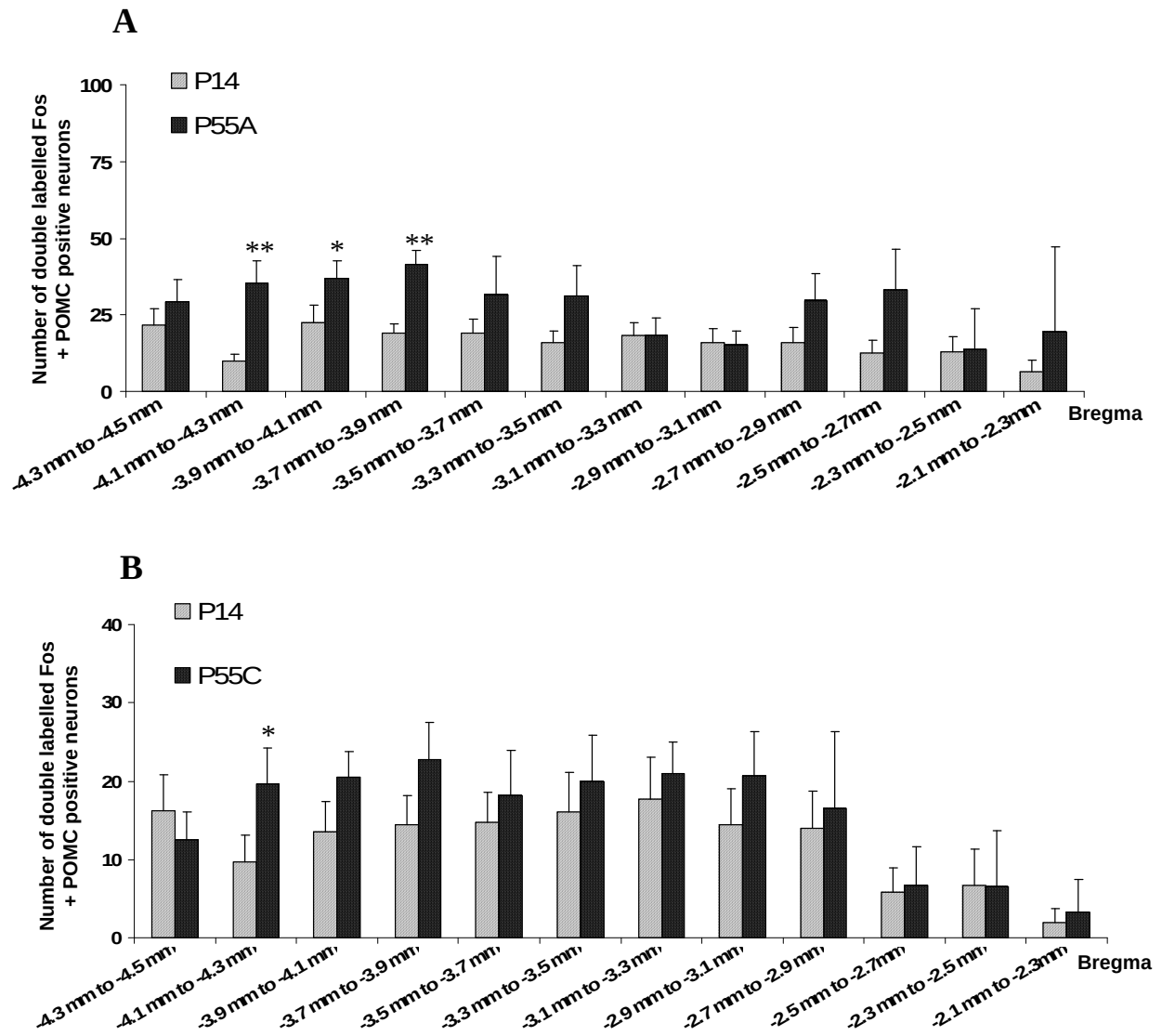
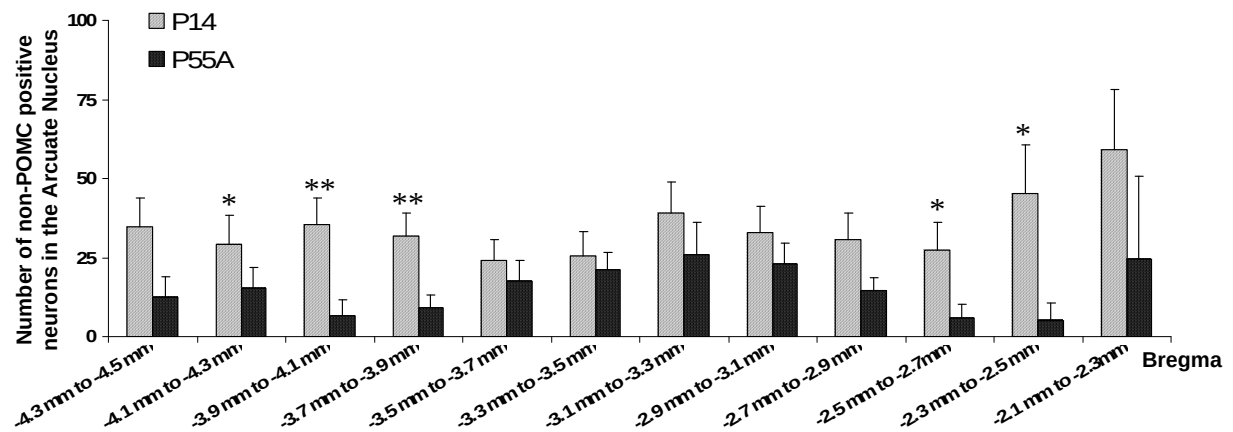


Figure 6



Suppl Fig. 1. Fos-non- α -MSH positive neurons in the ARC after acute high protein meals. Values are means $\pm$ SEM. *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$.

Article 4 - Electrolytic or exocytotoxic lesions of the CPA do not impair high protein and threonin-devoid diets in rats.

**Rodolphe Faipoux, Daniel Tomé, Olivier Rampin, Sylvette Gougis, Céline Morens
et Gilles Fromentin.**

Chemical or electrolytic lesions of the APC fail to disrupt detection of high protein or threonine-devoid diets in rats

R. Faipoux¹, D. Tomé¹, O.Rampin², S. Gougis¹, D.W. Gietzen³ and G. Fromentin^{1§}

¹ UMR914 Nutrition Physiology and Ingestive Behavior, INRA, AgroParisTech, CRNH-IdF, 16 rue Claude Bernard, F-75005 Paris, France.

² Analyse et Modelisation en Imagerie Biologique, NOPA-UR-Institut National de la Recherche Agronomique 1197, Jouy-en-Josas, France

³ Department of Anatomy, Physiology and Cell Biology, School of Veterinary Medicine, University of California, Davis, California 95616

Key words: high protein diet, anterior pyriform cortex, imbalanced amino acid diet.

Word count:. Number of figures: 6; Number of Supplementary Files: 1; Number of tables: 1.

[§] To whom correspondence should be addressed. E-mail: fromenti@inapg.fr.

Abstract

The anterior pyriform cortex (APC) is known to be able to detect amino acid deficiency. This study tested the effect of chemical or electrolytic lesions of the APC on detection of high protein meals in rats. Our results showed that none of the lesions performed impaired detection of high protein meals, and more surprisingly, of threonine devoid diets. Moreover, high protein meals did not increase activation of APC neurons, contrary to threonin-devoid diet, which activates not only the most anterior part of the APC, but also other parts, more caudally. Taken together, these results suggest that APC appeared to be activated but not mandatory to its detection of threonin-devoid diet and not involved in detection of high protein diets.

INTRODUCTION

Among the macro-nutrients, proteins are the more potent to inhibit food intake (1-3). In rats, the transition from a standard protein diet [14% protein energy (P/E)] to a high protein diet (>45% P/E) leads to a strong decrease in food intake, weight gain, and white adipose tissue (4,5). However, the mechanisms underlying this ability of reducing energy intake remain still unclear. Especially, brain areas involved in the detection of high protein diets remain unknown. Therefore, assuming the ability of the anterior pyriform cortex (APC) to detect indispensable amino acid deficiency, we hypothesized that the APC could also be a sensor of an excessive amino acid input and that a chemical lesion of APC's neurons would impair this capacity.

In rats, the APC is acknowledged to be a major central sensor of dietary indispensable amino acids (IAAs) deficiency, like threonin-devoid diet (Thr-Dev). Indeed, rats deeply modify their ingestive behavior after detection of IAAs deficient diets and develop a learned aversion (6-12) that does not depend on olfaction or taste (13,14). Many previous studies have led to believe this anorectic response is primarily induced by a chemical sensory of IAAs in the APC preserved in every mammalian species (15). Briefly, this mechanism involves the conserved general control (GC) where uncharged transfer RNA (15) induce phosphorylation of eukaryotic initiation factor 2 (16,17) via the GC non depressing 2 kinase (18), allowing amino acid deficiency recognition in the APC [for review, see (19)]. Historically, involvement of a specific area of the APC has been shown by electrolytic lesions which prevent rats from detecting deficient IAAs diets (20). Moreover, injection of a deficient IAA in this particular part of the APC in rats feeding the diet lacking this IAA increased their food intake to a normal level (21), indicating that the concentration of IAAs in the APC can mislead the rest of the brain detection of IAAs.

Previous studies that describe the effect of a lesion in the APC on food or IAAs intakes were performed using electrolytic lesions. However, electrolytic lesions happen to destroy not only the body cell of neurons but also all the fibers neighboring them. Therefore, it seems interesting to study the effect of a softer method, in order to describe more accurately the role of APC neurons on detecting amino acid. Chemical lesions, using ibotenic or kainic acid, appear to be adequate for this purpose, since these agonists of glutamate receptors destroy neurons by over-activation, but fails to destroy passing fibers in the area (22,23). Moreover, ibotenic and kainic acids respective specificity to N-methyl-D-aspartate [NMDA; (24)] and to alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionate (AMPA)/kainate receptors (25) would allow identifying what phenotype of receptor is involved in amino acid detection. Some previous studies tend to show that AMPA/kainate receptors may be involved in IAAs deficient diets (26,27).

The aim of our study is therefore to determine whether chemical lesions of the APC would disrupt the inhibition of food intake induced by high protein diet (experiment 1). Moreover, we performed an immunohistological study using the oncogene Fos protein in order to determine which part of the APC are activated by the diets used in this study (experiment 2).

MATERIALS AND METHODS

Animals and diets.

Adult male Wistar rats from Harlan (Gannat, France) were housed in individual cages at $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$, on under 12-h reverse light/dark cycle (9:00, 21:00; lights on at 21:00). All experimental procedures used during the study complied with the guidelines issued by the French National Animal Care Committee and was approved by the Regional (Ile de France Sud) Animal Care and Ethics Committee.

Concerning composition of diets used (**Table 1**), standard protein diets were modified versions of the AIN-93M diet (28). Instead of casein and cystine, the P14 diet contained 140 g total milk protein per kg of diet. High protein diet (P55) was also based on the AIN-93M and contained total milk protein as well. Threonin-devoid (Thr-Dev) was a threonin-free diet, otherwise well balanced for the other amino acids (10) and threonin corrected (Thr-Cor) diet was identical to Thr-Dev except with threonin added (6g/kg) (see **Table 1** for amino acid composition of these diets). All diets were moistened (ratios powder to water P14, 1:1, Thr-Dev and Thr-Cor diets, 2:1 and P55 diet, 1:2) to minimize spillage. Food intake was determined by the difference in the weights of food cups before and after each experimental period, corrected for spillage, the amount of water added and evaporation. Food containers were refilled daily at 9:00 with fresh food. All rats had free access to water during the entire experimental period. For the first week of the experiments (pre-feeding period), rats were adapted to laboratory conditions, and had free access to a P14 diet (baseline food). The last day of the pre-feeding period is referred as d0. Rats had free access to tap water during the whole experiment.

Experiment 1: Effect of chemical or electrolytic lesions of the APC on high protein diet consumption

Surgery.

Before surgery, the rats were anaesthetized with a ketamine cocktail (2,5ml/kg body weight, i.p., containing ketamine hydrochloride and xylazine), and were mounted into stereotaxic frame (Kopf, Germany) using blunt ear bars. After midline incision, 27-gauge stainless cannulas were implanted bilaterally using flat-skull stereotaxic techniques (29). According to previous studies (16,27), the coordinates of the targeted area were [from Bregma, (29)]: AP +3.0mm, L +3.1mm, D -6.3mm (under cortex level). In a first experiment, rats were injected

with ibotenic acid (IBO, n=22). In a second experiment, rats were injected kainic acid (KAI, n=9) or were electrolytically lesioned (EL, n=10). A control group (control) received no injection nor was mounted into stereotaxic frame. A sham group was mounted into stereotaxic frame but received phosphate buffer saline solution instead of ibotenic or kainic acid. Control (n=8) and sham (n=6) groups were used for ibotenic lesions and others (respectively n=8 and n=9) for kainic and electrolytic lesions.

Intracerebral injections.

After implantation, cannulas were left in place during 5min, then rats received 0.35 μ l of either ibotenic (6 μ g) or kainic (2.1 μ g) (30,31) acid or phosphate buffer saline solution (pH=7.4). Injection was made with a 1 μ l-Hamilton syringe (linked to cannulas with polyethylene tube) at a rate of 0.035 μ l/min. Cannulas were left in place 10 min after the end of the injection then removed, and skull skin was stitched up.

Electrolytic lesions.

As described for the cannulas, we implanted bilaterally an electrode insulated except at the tip and we passed a current of 2,5mA for 1min through the tip into the APC. Electrodes were left in place 5min before and after passing current.

Drugs and antibodies.

Ibotenic and kainic acids were purchased from Sigma (St-Louis, MO). Ibotenic acid powder (1mg) was dissolved into 6 μ l of NH₄OH (23) and then added to 44 μ l of 0.1M phosphate buffer saline [pH=7.4, (32)]. Kainic acid powder (10mg) was dissolved into 3,3mL of 0.1M phosphate buffer saline (pH=7.4). Ibotenic and kainic acid solutions were prepared right before each surgery session and then stored in refrigerator for one day. Primary polyclonal

antibody Ab-5 raised against Fos protein was purchased from VWR and manufactured by Oncogene Sciences. Primary polyclonal antibody anti-GluR1 was purchased from Chemicon International (Temecula, CA, USA). Secondary antibody and ABC kits (Vectastain) were purchased from Vector Laboratories (Burlingame, CA). Basic laboratory salts and chemical supplies were purchased from Sigma (St Louis, MO).

Experimental design.

Rats were left 10d for recovery before experimental protocol began. During this period, rats were given free access to P14 diet. From d1 to d3, all groups received P55 diet, then P14 for 3 days (recovery period). From d7 to d11, they received Thr-Dev diet, then P14 diet for 5d (recovery period). From d17 to d18, they received Thr-Cor diet (**Fig 1**). Daily food intake was measured, and consumption is expressed as a relative value (percentage) of consumption during the previous days before changing diet (consumption under P14 diet), considered as basal consumption.

Histology of lesion placement.

After the rats tested all the diets (d19), they were deeply anesthetized with sodium pentobarbital, and perfused transcardially with 250 ml of physiological serum followed immediately by 1000 ml of a 10% buffered formol solution (except rats that underwent kainic acid lesions). Brains were removed and post-fixed for 1wk in formol. Brains were then frozen (-40°C), sectioned at 40 µm in a cryostat (Leica, Germany) from the rostral part (AP: +3.8mm) to the caudal part (AP: 1.2mm) of the APC. Sections were stained with cresyl violet, so that the placement and the spreading of the lesions could be examined. Estimates of lesion damage were made by an observer without any reference to the individual behavioural data.

Immunohistochemistry: AMPA glutamate receptor 1

To perform immunohistochemistry of glutamate receptor 1 (GluR1), rats from the KAI group were perfused transcardially with a 4% buffered paraformaldehyde solution instead of the formol solution. Procedure for anesthesia and brain removing was the same as above. Brains were frozen (-40°C), sectioned at 20µm in a cryostat at -24°C (Leica, Germany), and floating sections were collected in PB in serially ordered sets. For each rat, 2 series (of 24-26 sections each, located 100µm apart) were collected, ranging from +3.8 to +1.2 mm from Bregma. First series were stained with cresyl violet and second were processed for IHC of the GluR1. After being mounted of slices and dried, sections moisturized in PBS, and then incubated for 60 minutes at room temperature in 10% normal goat serum (NGS), 0,3% Triton X-100 in PBS to block non-specific sites. Sections were incubated at 4°C for 48 hours in rabbit anti-GluR1 antibody diluted in a solution of 1% NGS, 0,1% of bovine serum albumin (BSA), 0,3% Triton X-100 in PBS (PBS-BSA) (1ug/mL). After several washing in PBS, sections were placed for 3 hours at room temperature, in a wet chamber, in a biotinylated donkey anti-rabbit secondary antibody (Vector laboratories), diluted 1:200 in PBS-BSA. Sections were then rinsed in PBS and incubated for 30min at room temperature in an avidin-FITC complex (Vector laboratories) diluted 1:400 in a 1% sodium bicarbonate solution. Slides were mounted with a special medium for fluorescence (Vectarshield Hard Set H-400, Vector) and sections were observed under a Zeiss computer assisted microscope (Zeiss, Germany) with FITC filter.

Experiment 2: Effect of high protein or threonine devoid meals on APC neuronal activation***Experimental design***

Adult male Wistar rats (n=32) were housed in the same conditions as described above and were conditioned during a wk to a two-meal daily pattern of food intake (**Fig 2**). First meal

consisted during this wk in a calibrated 30 min intake of 3g of P14 (43.8 kJ) followed, 60 min after the end of this first meal, by ad libitum consumption of P14 diet during the rest of the dark period. At d0, rats were separated into four groups (n=8) which received an isocaloric and isovolumic 3g meal of P14, P55, Thr-Dev or Thr-Cor according to the group. Rats from Thr-Dev and Thr-Cor groups were sacrificed at d1 and P14 and P55 groups at d2.

Tissue collection

Considering the dynamics of Fos protein expression in the CNS (33), rats were killed with a lethal injection of pentobarbital sodium (90 mg/kg, ip) 90 min after the beginning of their 3g calibrated first meal. Thoracic cage was opened and rats were transcardially perfused, via a 16 gauge needle placed in the left ventricle, with 500 ml of saline followed by 1000 ml of 4% phosphate-buffered (PB, pH=7.4) paraformaldehyde. Brains were removed and let overnight in 15% sucrose in PB for cryoprotection then stored in 30% sucrose in PB with sodium azide (to prevent bacterial contamination).

Immunohistochemical staining

Brains were frozen (-40°C), sectioned at 20µm in a cryostat at -24°C (Leica, Germany), and floating sections were collected in PB in serially ordered sets. For each rat, one series (of 38-40 sections each) were collected, ranging from 3.6 to -0.2 mm from Bregma (identified with Paxinos and Watson stereotaxic atlas). The sections were processed for c-Fos immunochemistry using the ABC complex/DAB method. Briefly, sections were mounted on slides, drying overnight and frozen (-20°C). After moisturizing in PBS, slices were incubated for 60 minutes at room temperature in 2% bovine serum albumin (BSA), 0.5% Triton X-100 in PBS (PBS-BSA). After appropriate washing in PBS (as for after each incubation, sections were incubated for 24 hours with goat anti c-Fos antibody at a dilution of 1:40000 (at room

temperature). Sections were placed for 3 hours at room temperature in a biotinylated secondary antibody (Vector laboratories), diluted 1:200 in PBS-BSA. For quenching endogenous peroxidase, slides were treated with 1% H₂O₂ for 30 min and treated afterwards with Elite Vectastain ABC reagent (1h at room temperature) in order to enhance bound secondary antibody. Antibody complexes were then revealed by a 5-to-10-min diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) (with 0,01% H₂O₂) reaction until Fos-like brown-black staining appeared. After being washed and dried overnight, sections were cleared in an 100% ethanol bath (2 min) followed by 2 baths of xylene (5 and 10 min respectively) and cover slipped with Depex (BDH). To control for staining variability between days, series contained matched sections from all experimental groups. c-Fos quantitative analysis Analyzed sections were magnified under a Zeiss computer assisted microscope (Zeiss, Germany). Pictures were performed and analyzed using an imaging software (Axiovision v4.5, Zeiss, Germany). C-Fos positive cells appeared in brown whereas the background remained slightly yellow.

Statistics.

Results are expressed as means $\pm$ S.E.M. Differences between groups were determined by two-way ANOVA (Proc GLM, SAS version 6.11, Cary, NC, USA), testing a group (lesion experiments) or diet (c-Fos study) effect. The level of significance was set at $P < 0.05$, but when a significant effect was revealed by ANOVA, differences between individual means were determined using a post hoc test (Dunnet test with the control group for the lesion experiment). Because a time effect was involved in lesion experiments differences between groups were determined using mixed models for repeated measurements with group, time and time x group effects tested (proc mixed, Sas version 6.11). Multiple comparisons were made using ad hoc post hoc tests under the mixed models.

RESULTS

Experiment 1: lesions of the APC

Lesion placement and extent

For each lesioned groups (IBO, KAI, EL), lesions were considered effective if bilateral lesions could be observed after violet cresyl staining. If rats exhibited unilateral lesion or if no lesion were identified they were excluded from results. Finally, IBO group contained 9 well lesioned rats, KAI group 4 rats and EL group 5 rats. Lesion extents were calculated using Paxinos and Watson atlas. They extended from 3.8 +0.1 mm to 2.0 + 0.2 mm.

Concerning ibotenic or electrolytic lesions, the placement and extent of the lesions were easily noticeable with a complete disappearance of the neuronal structure after violet cresyl staining (**Fig 3A and C**). Brain slices indeed exhibited a large round shaped and almost unstained spot instead of the dense structure of the APC.

However, with kainic acid lesions, no difference were easily noticeable when compared with control group (**Fig 3D**) on any rats with violet cresyl staining. Nevertheless, GluR1 staining showed that no GluR1 bearing neuron could be detected in APC of rats correctly lesioned with kainic acid (**Fig 3E**) throughout the area of interest (from 3.8 mm to 2.0 mm), contrary to control rats, where few but nonetheless some GluR1 positive neurons could be detected within the APC. Rats with no GluR1 staining were therefore considered lesioned even if no difference were noticeable with violet cresyl staining.

Food intake of lesioned group rats

Ibotenic lesioned group showed no difference in food intake compared with either sham or control groups whatever the diet tested (**Fig 4**). Not a single rat correctly lesioned, whatever the lesion used, exhibited a behavior significantly different from control or sham groups.

Under P55 diet, lesioned rats consumed $66.3 \pm 2.0\%$ while sham group consumed $74.3 \pm 4.1\%$ and control group $73.2 \pm 4.1\%$ of basal consumption. With Thr-Dev diet, rats ate $38 \pm 3.9\%$, $39.9 \pm 2.3\%$ and $36.2 \pm 3.7\%$ of basal consumption for IBO, sham and control groups respectively. Moreover, similar feeding behaviors were also observed after kainic or electrolytic lesions (**Fig 5**). With kainic or electrolytic lesions, rats consumed $51.6 \pm 4.9\%$ (KAI), $51.7 \pm 3.2\%$ (EL), $54.8 \pm 8.6\%$ (sham) and $52.0 \pm 5.6\%$ (control) of basal consumption under P55 diet. Then, they consumed $42.5 \pm 2.7\%$ (KAI), $38.7 \pm 5.4\%$ (EL), $34.4 \pm 1.5\%$ (sham) and $40.5 \pm 5.5\%$ (control) of basal consumption under Thr-Dev diet.

Experiment 2: c-Fos study

Concerning the effect of a high protein meal on APC activation, P55 group did not exhibit any difference in Fos activation throughout the APC compared with P14 group. Indeed, P55 fed rats expressed an average number of Fos positive neurons of 16.2 ± 1.9 neurons per slice while P14 fed rats expressed an average number of Fos positive neurons of 13.3 ± 1.6 neurons per slice.

Analysis of APC activation pattern showed great differences between diets tested. Thr-Dev group exhibited stronger activation of the APC compared with Thr-Cor group (28.2 ± 1.2 vs. 14.4 ± 1.1 average Fos positive neurons per section, diet effect $P < 0.001$, for Thr-Dev and Thr-Cor groups respectively).

The most impressive difference appears to be located in the rostral part of the APC, between 3.6 mm and 3.0 mm (**Fig 6**; 36.3 ± 6.3 vs. 11.2 ± 5.2 at 3.6 mm, diet effect $P < 0.01$; 35.2 ± 1.8 vs. 13.7 ± 3.9 at 3.4 mm, diet effect $P < 0.001$; 36.7 ± 7.7 vs. 14.3 ± 4.7 at 3.2 mm, diet effect $P < 0.05$ for Thr-Dev and Thr-Cor groups respectively). Another area where Thr-Dev group showed more Fos activation than Thr-Cor group is between 2.2 mm and 1.8 mm (29.1 ± 4.5 vs. 14.2 ± 5.8 at 2.2 mm, diet effect $P < 0.05$; 34.6 ± 3.7 vs. 10.4 ± 4.9 at 2.0 mm, diet effect

P<0.01 for Thr-Dev and Thr-Cor groups respectively). Finally, a third area, located caudally between 0.8 mm and 0.4 mm, is more activated with Thr-Dev diet (31.8 ± 4.1 vs. 13 ± 4.2 , diet effect P<0.01; 25.3 ± 2.5 vs. 17.1 ± 5.6 , diet effect P<0.05, for Thr-Dev and Thr-Cor groups respectively).

In order to further characterize the pattern of Fos activation in the APC, this region has been divided into three parts on coronal slices: an outer lateral part, a medial part and an inner ventral part (**Suppl. Fig 1A**). This division showed that the activation on the rostral part of the APC in a result of an overall activation in the three subdivision (**Suppl. Fig 1B, C and D**). On the contrary, the most caudal area of activation with Thr-Dev diet is mainly due to the inner/ventral part of the APC.

DISCUSSION

The present study aimed at exploring the capacity of anterior pyriform cortex (APC) at detecting a high protein diet and initiating the anorectic response to this diet, similarly to what has already been described with indispensable amino acid (IAA) imbalanced diets. Our results showed that chemical or electrolytic lesions of the APC did not affect high protein diet intake, and that high protein meals did not induce specific Fos activation in the APC, contrary to IAA meals. Surprisingly, in our study, neither chemical nor electrolytic lesions of the APC impaired detection of threonine-devoid diet.

High protein diets are known to induce strong and lasting decrease in energy intake (1,4). However, mechanisms underlying this anorectic effect remain still unclear. Unfortunately, none of our lesion, either chemical or electrolytic, produced a change in rats' behavior. Our results are in agreement with previous one (20), who have studied the involvement of the APC in the detection of high protein diets by lesion experiments, showing electrolytic lesions of the APC do not prevent rats from decreasing their energy intake and therefore that the APC

is not required for the anorectic effect of high protein diet to happen. Moreover, high protein meal did not specifically triggered Fos activation within the APC. Therefore, the APC is presumably not involved in detection of high protein diet, contrary to other brain areas like the nucleus of the solitary tract or hypothalamic nuclei like the arcuate nucleus (34,35).

However, electrolytic lesions destroy not only neurons of the targeted area but also fibers passing through the targeted area, so that the study of the effects of chemical lesions seemed relevant. Chemical lesions carried out in this study aimed at destroying two subtypes of APC glutamatergic neurons: NMDA and/or AMPA. Ibotenic acid lesions were supposed to target specifically NMDA neurons (24), but the quite large doses used probably exceed the only NMDA neurons and affected other type of glutamatergic neurons, according to the extent of the lesion observed after histology, where no neuronal structure can still be observed. The lesions we performed with ibotenic lesions were pretty important and large so that both lesions groups (injected at +3.0mm or +2.4mm) had a common part of the APC completely lesioned, between 3.4 and 2.0 mm. Therefore, both groups of ibotenic lesioned rats could be considered as a single group regarding interpretation of results on this segment. Despite large and noticeable lesions after Cresyl violet staining, ibotenic acid did not impair detection of the high protein diet. More unexpectedly, ibotenic lesions did not alter IAA diet intake as well. This result is in apparent contradiction with a previous study showing that injection of NMDA antagonist (D-AP5) within the APC increase food intake in rats (26), even if the NMDA receptor itself has never been showed to be implicated in the intracellular response to IAA in APC neurons, contrary to AMPA receptor (27). As hypothesized in the APC as IAA chemosensor paradigm, a very few numbers of neurons (less than 100) (16), specifically located in the APC, between +3.4 mm and +2.3 mm are solely able to detect IAA deficient diet. Therefore, very precise lesions are required to expect seeing any effect. The lesion performed in our study did match the whole area suspected to contain these neurons.

However, none of the lesions we used were able to impair IAA diet detection. Concerning AMPA neurons, action of the AMPA receptor GluR1 has been previously shown to have a role in IAA detection, since IAA diet induce phosphorylation of GluR1 (27) and injection of the AMPA antagonist in the APC weakens IAA detection (26). However, our results showed that kainic lesion did not change consumption of IAA diet. Kainic lesions could not be observed after Cresyl violet staining because AMPA neurons are not numerous in the APC as it was previously reported (27) so that comparison between lesioned and control animals cannot allow to make a difference with this staining. However, specific staining of GluR1 allowed us to discriminate between kainic lesioned rats. For rats considered to be well-lesioned, our results showed that none of GluR1 bearing neurons remained after kainic lesions. Even if our experiment does not rule an involvement of AMPA receptor in IAA detection, it suggests that these neurons are not mandatory to their detection. Similar conclusions can be made with ibotenic or electrolytic lesions. Regarding electrolytic lesions, we strongly expected that they would impair detection of IAA deficient diet, since this study has already been performed by Leung and Rodgers (20). We tried to reproduce this seminal experiment as closely as we could, but some information was missing, especially about the size of the lesions which are not specified in this paper. However, it is quite unlikely that Leung and Rodgers's lesions extended far beyond what we performed in our study, even if this hypothesis cannot be ruled out and could explain some of the differences with our study. Even if our results suggested that APC is not mandatory for detecting IAA diets, this area is however strongly activated by IAA diets. Such activation has already been shown before (36), but our study provided further information regarding the specific areas within the APC activated by IAA diets. Thus, the pattern of activation showed that threonine devoid diet increase number of Fos positive neurons in three parts of the APC, the most anterior one, which was also targeted by lesion experiment, but also two other areas more caudally. This

pattern showed that activation of the APC is not restricted to the anterior part of the APC, which has been investigated in most studies of the APC. The existence of other part of the APC activated by IAA diets suggests that other neurons may be involved in IAA detection. Moreover, other brain areas like the lateral hypothalamic area (LHA) is thought to be able to detect amino acid deficiency since injection of the dietary limiting amino acid in the LHA of rats consuming IAA diet impairs detection of this diet (37), similarly to what has been observed in the APC (21).

In conclusion, APC did not appear in our study to be involved in detection of high protein diets. Therefore studies of other brain areas known to be involved in regulation of energy intake have to be carried out in order to further understand the mechanisms underlying the satiety properties of proteins.

Bibliography

1. Bensaid, A., Tome, 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.
2. French, J., Wainwright, C., Booth, D. & Hamilton, J. (1992) Effects of meat species and particle size on postprandial satiety. *Proc Nutr Soc.* 51: 51-57.
3. Reid, M. & Hetherington, M. (1997) Relative effects of carbohydrates and protein on satiety -- a review of methodology. *Neurosci Biobehav Rev* 21: 295-308.
4. Jean, C., Rome, S., Mathe, V., Huneau, J. F., Aattouri, N., Fromentin, G., Achagiotis, C. L. & Tome, D. (2001) Metabolic evidence for adaptation to a high protein diet in rats. *J Nutr* 131: 91-98.
5. Lacroix, M., Gaudichon, C., Martin, A., Morens, C., Mathe, V., Tome, D. & Huneau, J. F. (2004) A long-term high-protein diet markedly reduces adipose tissue without major side effects in Wistar male rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 287: R934-942.
6. Booth, D. A. & Simson, P. C. (1971) Food preferences acquired by association with variations in amino acid nutrition. *Q J Exp Psychol* 23: 135-145.
7. Feurte, S., Nicolaidis, S. & Berridge, K. C. (2000) Conditioned taste aversion in rats for a threonine-deficient diet: demonstration by the taste reactivity test. *Physiol Behav* 68: 423-429.
8. Feurte, S., Tome, D., Gietzen, D. W., Even, P. C., Nicolaidis, S. & Fromentin, G. (2002) Feeding patterns and meal microstructure during development of a taste aversion to a threonine devoid diet. *Nutr Neurosci* 5: 269-278.
9. Fromentin, G., Feurte, S., Nicolaidis, S. & Norgren, R. (2000) Parabrachial lesions disrupt responses of rats to amino acid devoid diets, to protein-free diets, but not to high-protein diets. *Physiol Behav* 70: 381-389.
10. Fromentin, G., Gietzen, D. W. & Nicolaidis, S. (1997) Aversion-preference patterns in amino acid- or protein-deficient rats: a comparison with previously reported responses to thiamin-deficient diets. *Br J Nutr* 77: 299-314.
11. Gietzen, D. W. (1993) Neural mechanisms in the responses to amino acid deficiency. *J Nutr* 123: 610-625.
12. Simson, P. C. & Booth, D. A. (1974) Dietary aversion established by a deficient load: specificity to the amino acid omitted from a balanced mixture. *Pharmacol Biochem Behav* 2: 481-485.
13. Fromentin, G., Feurte, S. & Nicolaidis, S. (1998) Spatial cues are relevant for learned preference/aversion shifts due to amino-acid deficiencies. *Appetite* 30: 223-234.

14. Koehnle, T. J., Russell, M. C. & Gietzen, D. W. (2003) Rats rapidly reject diets deficient in essential amino acids. *J Nutr* 133: 2331-2335.
15. Hao, S., Sharp, J. W., Ross-Inta, C. M., McDaniel, B. J., Anthony, T. G., Wek, R. C., Cavener, D. R., McGrath, B. C., Rudell, J. B. et al. (2005) Uncharged tRNA and sensing of amino acid deficiency in mammalian piriform cortex. *Science* 307: 1776-1778.
16. Sharp, J. W., Ross-Inta, C. M., Hao, S., Rudell, J. B. & Gietzen, D. W. (2006) Co-localization of phosphorylated extracellular signal-regulated protein kinases 1/2 (ERK1/2) and phosphorylated eukaryotic initiation factor 2alpha (eIF2alpha) in response to a threonine-devoid diet. *J Comp Neurol* 494: 485-494.
17. Maurin, A. C., Jousse, C., Averous, J., Parry, L., Bruhat, A., Cherasse, Y., Zeng, H., Zhang, Y., Harding, H. P. et al. (2005) The GCN2 kinase biases feeding behavior to maintain amino acid homeostasis in omnivores. *Cell Metab* 1: 273-277.
18. Zhang, P., McGrath, B. C., Reinert, J., Olsen, D. S., Lei, L., Gill, S., Wek, S. A., Vatter, K. M., Wek, R. C. et al. (2002) The GCN2 eIF2alpha kinase is required for adaptation to amino acid deprivation in mice. *Mol Cell Biol* 22: 6681-6688.
19. Gietzen, D. W. & Rogers, Q. R. (2006) Nutritional homeostasis and indispensable amino acid sensing: a new solution to an old puzzle. *Trends Neurosci* 29: 91-99.
20. Leung, P. M. & Rogers, Q. R. (1971) Importance of prepyriform cortex in food-intake response of rats to amino acids. *Am J Physiol* 221: 929-935.
21. Beverly, J. L., Gietzen, D. W. & Rogers, Q. R. (1990) Effect of dietary limiting amino acid in prepyriform cortex on food intake. *Am J Physiol* 259: R709-715.
22. Jarrard, L. (1991) Use of ibotenic acid to selectively lesion brain structures. Academic Press, Philadelphia, PA.
23. Winn, P. (1991) Excitotoxins as tools for producing brain lesions. Academic Press, Philadelphia, PA.
24. Inglis, W. L. & Semba, K. (1997) Discriminable excitotoxic effects of ibotenic acid, AMPA, NMDA and quinolinic acid in the rat laterodorsal tegmental nucleus. *Brain Res* 755: 17-27.
25. Fletcher, E. J. & Lodge, D. (1996) New developments in the molecular pharmacology of alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionate and kainate receptors. *Pharmacol Ther* 70: 65-89.
26. Blevins, J. E., Truong, B. G. & Gietzen, D. W. (2004) NMDA receptor function within the anterior piriform cortex and lateral hypothalamus in rats on the control of intake of amino acid-deficient diets. *Brain Res* 1019: 124-133.
27. Sharp, J. W., Ross, C. M., Koehnle, T. J. & Gietzen, D. W. (2004) Phosphorylation of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase type ii and the alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-

4-isoxazole propionate (ampa) receptor in response to a threonine-devoid diet. *Neuroscience* 126: 1053-1062.

28. Bensaid, A., Tome, D., L'Heureux-Bourdon, 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.

29. Paxinos, G. & Watson, C. (1998) *The rat brain in stereotaxic coordinates*. 4th Edition. Academic Press, New York.

30. Gioanni, H., Rey, J., Villalobos, J., Richard, D. & Dalbera, A. (1983) Optokinetic nystagmus in the pigeon (*Columba livia*). II. Role of the pretectal nucleus of the accessory optic system (AOS). *Exp Brain Res* 50: 237-247.

31. Poljacek, I., Jakus, J., Stransky, A., Barani, H., Halasova, E. & Tomori, Z. (2004) Cough, expiration and aspiration reflexes following kainic acid lesions to the pontine respiratory group in anesthetized cats. *Physiol Res* 53: 155-163.

32. Grigson, P. S., Reilly, S., Shimura, T. & Norgren, R. (1998) Ibotenic acid lesions of the parabrachial nucleus and conditioned taste aversion: further evidence for an associative deficit in rats. *Behav Neurosci* 112: 160-171.

33. 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.

34. Darcel, N., Fromentin, G., Raybould, H. E., Gougis, S., Gietzen, D. W. & Tome, D. (2005) 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.

35. Faipoux, R., Tome, D., Bensaid, A., Morens, C., Oriol, E., Bonnanno, L. M. & Fromentin, G. (2006) Yeast proteins enhance satiety in rats. *J Nutr* 136: 2350-2356.

36. Wang, Y., Cummings, S. L. & Gietzen, D. W. (1996) Temporal-spatial pattern of c-fos expression in the rat brain in response to indispensable amino acid deficiency. I. The initial recognition phase. *Brain Res Mol Brain Res* 40: 27-34.

37. Blevins, J. E., Dixon, K. D., Hernandez, E. J., Barrett, J. A. & Gietzen, D. W. (2000) Effects of threonine injections in the lateral hypothalamus on intake of amino acid imbalanced diets in rats. *Brain Res* 879: 65-72.

Fig.1. Feeding pattern after lesions of the APC.

Rats' feeding behaviour is monitored when ingesting 3 different diets: P55, Thr-Dev or Thr-Cor. Between each period, P14 days are meant to allow them to return to regular consumption. Energy intakes during the last two days of each P14 period are used to calculate "basal" consumption.

Fig. 2. Daily feeding pattern in c-Fos study.

Rats received a calibrated 3g-meal according to their group. 60' after the end of it, they had *ad libitum* period of P14 diet until the rest of the day.

Fig. 3. Cresyl violet staining of control and lesioned rats.

A: Slice of the APC of rat (AP: +3.0mm) where the APC is easily noticeable with dense violet neuronal layers.

B and C: Slices of rats with ibotenic (C) and electrolytic (D) lesions that exhibited large and round shaped disappearance of cresyl violet stained cells instead of dense colored APC.

D: Slice of rat with kainic lesion did not showed any noticeable difference after cresyl violet staining compared with control (A).

E: Same rat exhibited no GluR1 positive neurons in the APC contrary to other area on this slice (white arrow).

Fig. 4. Food intake after ibotenic lesions of the APC.

Rats with or without ibotenic lesions (n=9; control, n=8; sham, n=6) did not exhibit any difference in daily energy intake under P55, Thr-Dev, or Thr-Cor diets.

Fig. 5. Food intake after kainic and electrolytic lesions of the APC.

Rats with or without kainic (n=4) or electrolytic (n=5; control, n=8; sham, n=9) lesions did not exhibit any difference in daily energy intake under P55, Thr-Dev or Thr-Cor diets.

Fig. 6. Fos positive neurons in the APC after Thr-Dev and Thr-Cor meals.

Values are means $\pm$ SEM. *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$.

Table 1*Composition of experimental diets. **

	P14	P55	Thr-Dev	Thr-Cor
	<i>g/kg diet</i>			
Total milk protein ¹	140	530		
AA mix (except threonine) ^{a, b}			201	201
Threonine			0	6
Cornstarch	622.4	277	569.7	564.7
Sucrose	100.3	50	92	91
Soybean oil ⁴			40	
AIN 93M mineral mix ⁵			35	
AIN93V vitamin mix ⁵			10	
Cellulose ⁶			50	
Choline ⁵			2.3	
Metabolizable energy kJ/g	14.6	14.6	14.6	14.6
P/E (%)	14	55	21	21
G/E (%)	76	35	68	68
L/E (%)	10	10	10	10

¹ Armor Protéines Saint Brieux, France; ² Cerestar, Haubourdin, France; ³ Eurosucre, Paris, France; ⁴ Bailly SA, Aulnay-sous-bois, France; ⁵ ICN Biochemicals, Ohio, USA (see Reeves et al. 1993 for composition); ⁶ Medias filtrants Durieux, Torcy, France. P/E, G/E, L/E: percentage of diet energy provided by protein, carbohydrates and lipids, respectively.

^a Indispensable amino acid (g/kg) in the Thr-Dev diet: L-methionine, 10; L-cystine, 6; L-histidine, 12; L-lysine, 15; L-isoleucine, 15; L-leucine, 21; L-phenylalanine, 15.5; L-tryptophan, 4; L-valine, 16; and L-tyrosine, 9.5; total: 124. Thr-Cor diet contains the same amino acid quantity plus L-threonine, 6; total: 130.

^b Dispensable amino acid (g/kg): glutamic acid, 30; L-glycine, 10; L-arginine, 10; L-alanine, 3.5; L-asparagine, 10; L-proline, 10; and L-serine, 3.5; total: 77 (amino acids were purchased from Degussa, Ridgefield Park, NJ).

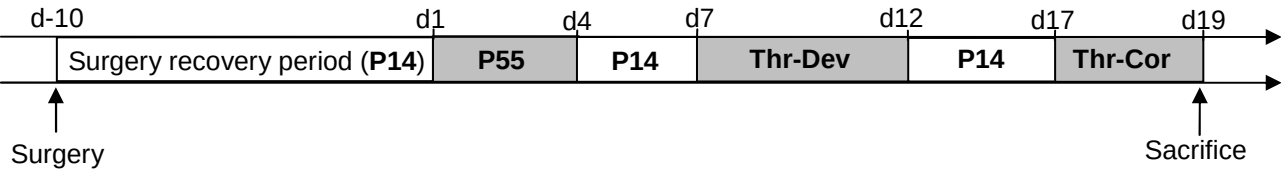


Figure 1

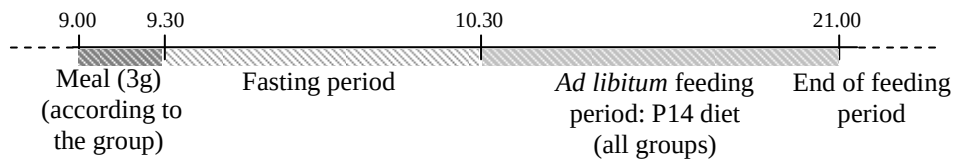


Figure 2

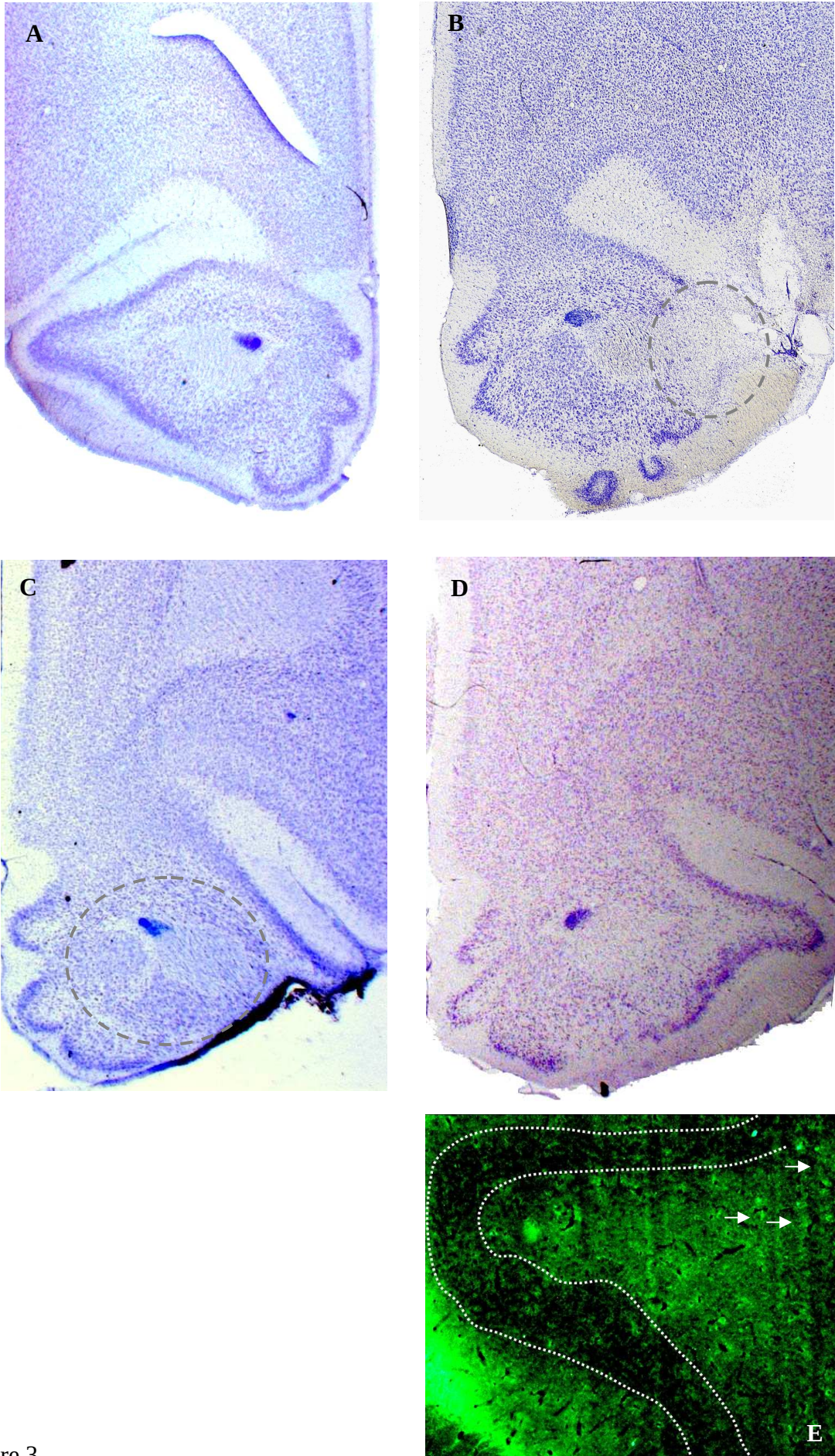


Figure 3

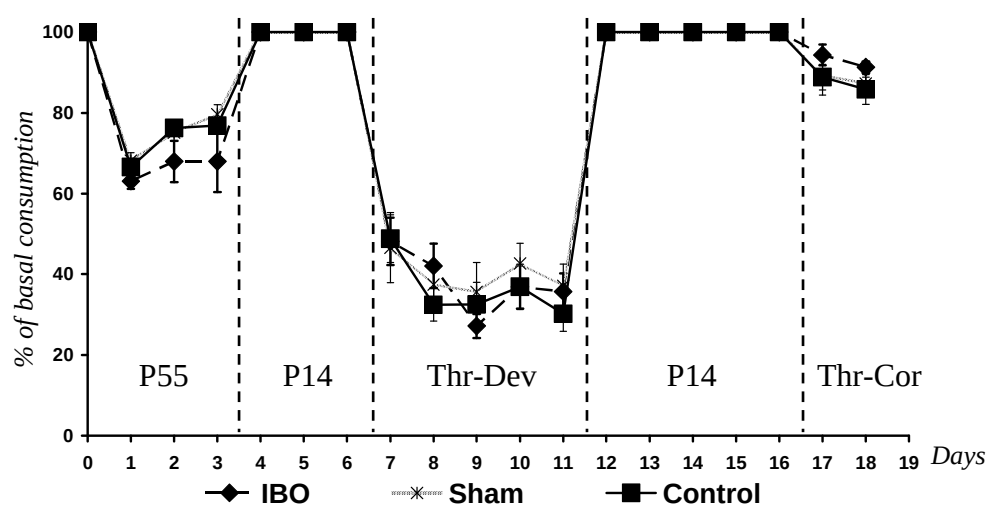


Figure 4

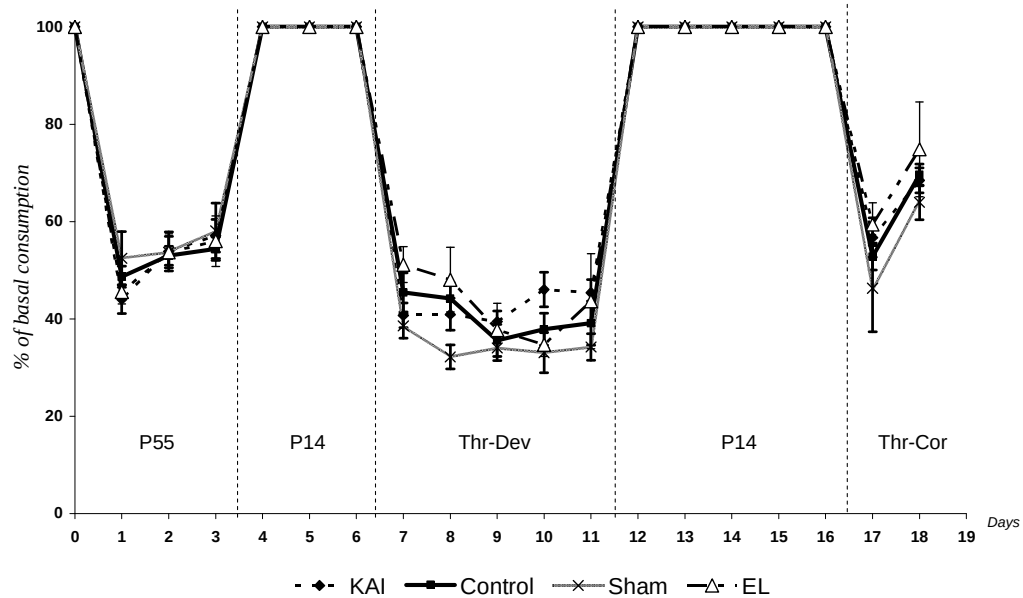


Figure 5

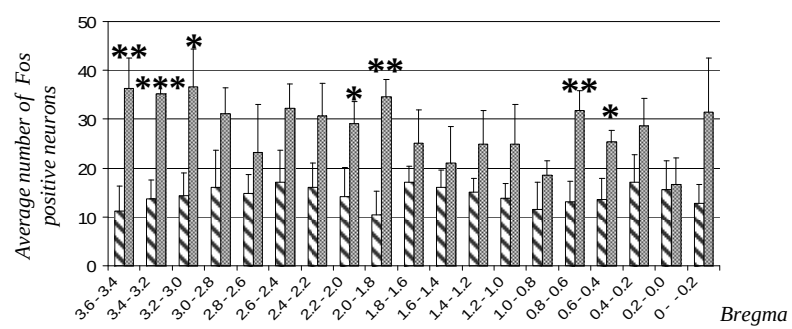
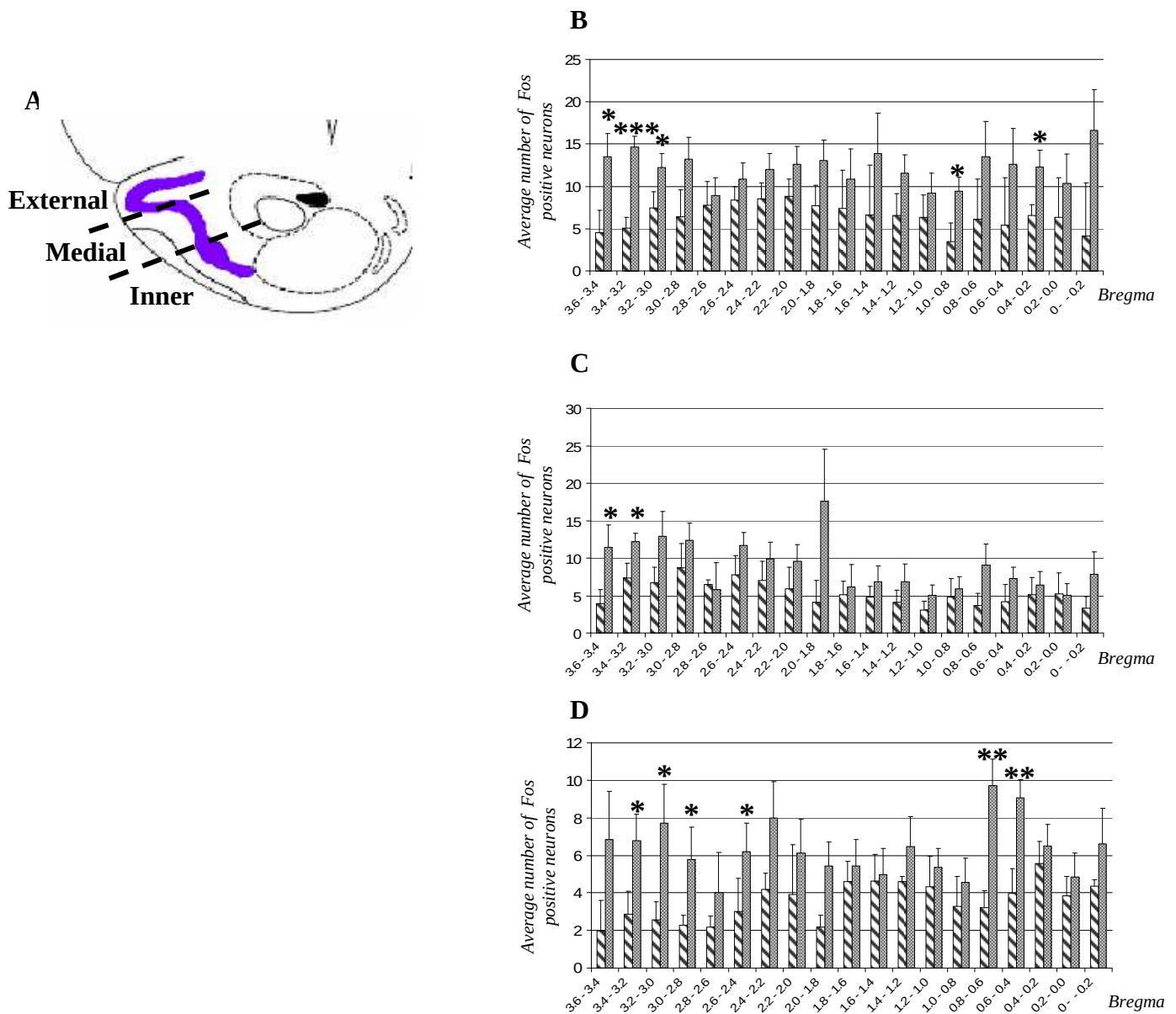


Figure 6

	Thr-Cor	Thr-Dev
Méthionine	10	10
Cystine	6.0	6.0
Histidine	12.0	12.0
Lysine	15.0	15.0
Thréonine	6.0	-
Isoleucine	15.0	15.0
Leucine	21.0	21.0
Phenylalanine	15.5	15.5
Tryptophane	4.0	4.0
Valine	16.0	16.0
Tyrosine	9.5	9.5
Total	130.0	124.0



Supplementary figure 1. Subdivision of the APC in external, medial and inner part (A) and corresponding Fos activation (B, C and D).

Values are means $\pm$ SEM. *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$.

II. EFFET DES PROTEINES ET DES PEPTIDES DE LEVURE SUR LA PRISE ALIMENTAIRE CHEZ LE RAT ET CHEZ L'HOMME ET SIGNALISATION CENTRALE

II.1 Introduction et objectifs

Parmi les trois macronutriments, les protéines possèdent le pouvoir satiétogène le plus élevé (Reid & Hetherington, 1997, Jean *et al.*, 2001, Bensaid *et al.*, 2002). En outre, la transition d'un régime normoprotéique (14% P/E) vers un régime hyperprotéique (>30% P/E) se traduit par une baisse importante de la prise alimentaire les premiers jours, ainsi qu'une baisse de poids, qui diminue au fil du temps sans pour autant retrouver le niveau de consommation du régime normoprotéique.

Cette diminution de la prise alimentaire induite par les protéines n'est cependant pas forcément homogène selon la nature de la protéines, et si l'effet de cette nature reste controversée, certaines fractions protéiques semblent plus satiétogènes que d'autres, comme dans le cas des protéines de lactosérum par rapport aux caséines (Hall *et al.*, 2003). Dans ce contexte, la société Bio-Springer a développé un extrait de protéines de levure (**Figure 33**) issue de l'autolyse de levures, qui est susceptible d'induire un effet satiétogène important chez le rat.

L'objectif de cette partie est donc de quantifier chez le rat et chez l'Homme cet effet anorexigène et d'expliquer les mécanismes qui lui sont sous jacents. Cette étude s'est déroulée en 3 temps.

Tout d'abord, l'effet satiétogène des protéines a été quantifié par rapport à celui de différentes protéines, à la fois dans le cas d'apport de protéines de levure comme unique source protéique, ou en charge quotidienne sur une alimentation traditionnelle. Afin de repérer l'apparition d'une éventuelle aversion gustative conditionnée associée à l'ingestion des protéines de levure, nous avons étudié la séquence comportementale de satiété par enregistrement vidéo et l'étude de la cinétique de vidange gastrique nous a permis d'élaborer certaines hypothèses permettant d'expliquer l'effet satiétogène observé.

Différentes fractions peptides ont ensuite été isolées à partir de ces protéines de levure. En effet, certaines propriétés organoleptiques très saillantes des protéines de levure rendent leur formulation très délicate dans des produits destinés à l'alimentation humaine. La société Bio-Springer a donc isolé des fractions peptidiques beaucoup plus neutres en goût, ce qui faciliterait beaucoup leur formulation. Il s'agit cependant de tester le pouvoir satiétogène

respectif de ces différentes fractions chez le rat. Une fois déterminée, la fraction la plus satiétogène a ensuite été testée chez le rat sous forme de charge quotidienne, en mesurant la prise alimentaire en continu tout au long de la journée (afin de déterminer le temps d'apparition de l'effet satiétogène ainsi que le point maximum de l'effet) puis en mesurant l'effet après habitude (plusieurs semaines), pour déterminer les effets à plus long terme. L'étude de la généralisation de l'effet à l'Homme a ensuite été entreprise en milieu hospitalier, dans l'optique d'une commercialisation.

Enfin, afin de mieux comprendre les mécanismes mis en jeu lors de la réponse anorexigène aux peptides de levure, l'activation de certaines régions du CNS et spécifiquement de certains réseaux de neurones, connus pour être activés par les protéines (voir article 1) a été quantifiée : les neurones noradrénergiques et GLP-1 du NTS, ainsi que les neurones mélanocortiques (POMC) de l'ARC.

II.2 Matériels et méthodes

II.2.1 Caractérisation de l'effet satiétogène des protéines de levure chez le rat

Cette étude se découpe en 4 expériences.

Dans la première expérience, 24 rats Wistar mâles sont divisés en trois groupes : deux groupes sont nourris *ad libitum* pendant 21 jours avec un régime normoprotéique de lait (P14) ou de levure (P14-y). Le troisième groupe (P14-pf) est un groupe *pair-fed*, auquel est donné en P14 la quantité énergétique consommée la veille par le groupe P14-y. Les consommations alimentaires ainsi que les poids des animaux sont mesurés chaque jour. A la fin de la période expérimentale, les animaux sont sacrifiés, les différents organes ainsi que les tissus adipeux sont alors séparés et pesés.

Dans la seconde expérience, 64 rats sont chirurgicalement équipés d'une canule intra-orale (voir détail de la procédure dans l'article), et séparés, après la période de récupération post-opératoire, en 5 groupes. Les rats sont alors habitués à un protocole alimentaires divisés en 3 repas : 1 repas calibré (de 10h à 10h15) de 3g (1:1 poudre pour eau), puis deux périodes d'alimentation *ad libitum* d'une heure chacune (de 15h à 16h puis de 20h à 21h). Tous ces repas contiennent uniquement du P14. Au début de la période expérimentale, les rats reçoivent quotidiennement à 19h une charge intra-orale d'amidon de maïs (40% G/E, WS, n=14) ou de

régimes hyperprotéiques (55% P/E) de lait (P55, n=12), de levure (P55-y, n=8), de soja (P55-s, n=15) ou de gluten (P55-g, n=15) selon leur groupe. Ces charges sont hydratées (1:2 poudre pour eau). Les rats reçoivent ces charges pendant 4 jours consécutifs, et les consommations de tous les repas sont mesurées. Les résultats sont exprimés en pourcentage de la consommation basale (jours précédents le début de la période expérimentale) pour chaque rat et chaque repas.

Dans la troisième expérience, 18 rats ont été divisés en trois groupes, P14, P14-y et P55-y, nourris exclusivement avec le régime concerné pendant 14 jours. Ces rats ont été placés dans des cages en plexiglas et filmés pendant la première heure de présentation de l'aliment à J1, J2 et J14. Les vidéos ont ensuite été analysées afin de déterminer la part relative des 4 principaux comportements : alimentation, nettoyage, activité et repos. La consommation de la première heure a également été mesurée, et les différents paramètres microstructurels (nombre et durée des bouffées) ainsi déterminés.

La cinétique gastrique de 60 rats a ensuite été étudiée suite à l'ingestion d'une charge de P14, P55 ou P55-y. Les estomacs ont été prélevés après sacrifice à différents temps suivant la fin de la période d'ingestion de la charge : 0, 30, 60 et 180 minutes. Le poids total du contenu de l'estomac, ainsi que le poids sec (après lyophilisation) ont été mesurés, et la teneur en protéines a été estimée à partir de la détermination de la teneur en azote par spectrographie de masse. Durant cette expérience, le volume d'eau consommé par les rats a été mesuré avant et pendant la période d'ingestion de la charge. La consommation d'eau est mesurée 6 heures avant la présentation de la charge (durant toute la période durant laquelle les rats sont à jeun avant la présentation des charges) afin de contrôler un éventuel déficit hydrique, puis avant et après la charge. Les mesures sont effectuées par pesée des biberons.

II.2.2 Effet satiétogène des peptides de levure chez le rat et chez l'Homme

II.2.2.1 Détermination de l'effet de différentes fractions peptidiques

42 rats Wistar mâles, pesant entre 180 et 200g au début de l'expérience, ont été habitués pendant une semaine à une alimentation divisée en deux parties : au début du cycle nuit, un repas de 2g de P14 (charge ratio 1:2 poudre pour eau) ou de l'aliment peptidique testé, puis 30' après la fin de la charge, une période d'alimentation *ad libitum* pendant 20h (P14, ratio 1:1). Les consommations sont mesurées à 1h, 3h et 20h suivant le début de la période *ad libitum*.

Après la semaine d'habituation, durant laquelle tous les rats reçoivent uniquement des charges P14, les rats sont séparés en 6 groupes : 3 groupes normoprotéiques correspondant aux trois peptides testées : PepB 14, Pep2006 14, Peptone 14, ainsi que trois groupes hyperprotéiques : Pep 55, Pep2006 55 et Peptone 55.

Ces groupes reçoivent alors en alternance (1 jour sur 2) une charge de P14 ou une charge de la fraction peptidique correspondant à leur groupe. Le protocole se poursuit alors pendant 8 jours : 4 jours P14 dit jour « basaux » et 4 jours peptides dit « tests ».

L'alternance des journées (une journée basale / une journée test) permet d'étudier l'effet satiétogène induit par la charge en s'affranchissant d'éventuels effets persistants d'une journée sur l'autre. En outre, les journées basales servent de journée de consommation de référence « flottante », qui permet donc de calculer des consommations relatives fiables par animal. Les consommations sont en effet exprimées en pourcentage de la consommation du jour basal précédent, afin de s'affranchir des variations interindividuelles. Les tests statistiques effectués sont donc des tests *t* appariés comparés à 100%.

II.2.2.2 Enregistrement continu de la prise alimentaire suivant l'ingestion d'un repas contenant des peptides de levure

16 rats Wistar mâles, pesant entre 180 et 200 g au début de l'expérience, sont habitués au même protocole alimentaire que celui décrit précédemment (en II.1). La charge est cette fois-ci de 3g (ratio 1:2). Après une semaine d'habituation, les rats sont divisés en deux groupes : P14 et P14-pep. Les deux types de charges contiennent chacune 14% de protéines (P/E).

Les rats sont installés dans des cages équipées de gamelles enregistreuses permettant de suivre la consommation des rats en continu. Ces gamelles sont reliées à un programme d'acquisition informatique qui mesure (toutes les secondes) le poids restant dans la gamelle (indirectement par mesure de la conductivité de l'aliment préalablement calibré). La consommation est donc suivie en temps réel. L'enregistrement est lancé au début de la période d'alimentation *ad libitum* en P14 et arrêté à la fin. La consommation totale est mesurée chaque jour. Comme dans l'expérience précédente, les rats reçoivent un jour sur deux une charge de P14 ou une charge de Pep14, afin de ne pas cumuler un éventuel effet satiétogène des peptides de levure sur le jour suivant.

II.2.2.3 Effet d'un repas contenant des peptides de levure après habitude chez le rat

16 rats Wistar mâles ont été séparés en deux groupes : P14 et P14-pep. Ces rats ont été habitués à un protocole deux repas (**Figure 34**), avec un premier repas calibré de 3g (1:1) suivi par une période d'alimentation ad libitum en P14 (1:1), 90 minutes après. Les rats du groupe P14 ont reçu lors du repas calibré une charge quotidienne de P14 pendant 24 jours et une charge de peptides de levure les deux derniers jours de la période expérimentale. Le groupe P14-pep a reçu quotidiennement une charge de P14-pep pendant toute l'étude. Les consommations après 3h et à la fin de la période d'alimentation ad libitum sont mesurées quotidiennement ainsi que le poids des rats.

II.2.2.4 Effet d'un en-cas contenant des peptides de levure sur la prise alimentaire chez l'Homme

17 volontaires, répondant aux critères d'inclusion et d'exclusion définis par l'étude (voir article pour détails) ont été soumis au protocole alimentaire suivant : pendant 5 semaines, les volontaires ont participé à deux périodes d'étude de deux semaines chacune, une par produit testé à l'hôpital Avicenne de Bobigny. Chaque période commence par deux journées durant lesquelles les volontaires viennent prendre leur déjeuner à l'hôpital, afin de les habituer au protocole et leur consommation pour chacun des plats est mesurée (pour le détail des menus, voir article). Durant ces journées passées à l'hôpital, les volontaires se voient remettre un panier repas pour le petit déjeuner (la veille au soir) et un panier repas pour le ou les repas suivant(s) le déjeuner. Ces paniers sont ramenés le lendemain et les produits non consommés sont pesés. Toute consommation en dehors de la nourriture fournie est interdite, en dehors de l'eau, du café ou du thé (non sucrés). A la suite de ces deux premiers jours, les volontaires se voient confier des en-cas sous forme de sachets de poudre contenant une soupe de tomate enrichie soit en peptides de levure, soit en protéines de soja. Les deux soupes possèdent des propriétés organoleptiques proches et sont difficiles à différencier. Les volontaires doivent consommer cette soupe quotidiennement à heure fixe (11h30) pendant les 12 jours suivants, avant de revenir deux journées à l'hôpital, durant lesquelles ils consommeront cette soupe puis le déjeuner dans nos locaux, et le reste de leur consommation quotidienne sera mesuré comme durant les premiers jours. Durant chaque période, les volontaires testent un en-cas différent. Durant les journées passées à l'hôpital, les volontaires remplissent à différents moments de la journée des échelles analogiques visuelles visant à déterminer leur état de faim et de satiété.

Les volontaires sont informés que l'étude porte sur la modulation des facultés de concentration selon la consommation d'un en-cas dans la matinée, raison pour laquelle ils remplissent un test de logique à 12h, lors des journées passées à l'hôpital.

II.2.2.5 Etude des régions centrales activées par un repas contenant des peptides de levure

Les animaux suivent exactement le protocole décrit en II.3. A l'issue des 24 jours, les animaux du groupe P14 reçoivent alors quotidiennement (pendant deux jours) une charge de P14-pep. Ces rats sont alors placés dans un groupe dénommé P14-pepS. Le groupe P14-pep continue selon le même protocole alimentaire et se nomme désormais P14-pepL. Les rats des deux groupes sont sacrifiés et perfusés 90' après le début de leur repas calibré le 26^{ème} jour de l'étude. Les cerveaux sont prélevés congelés et découpés et les coupes techniques et les neurones dénombrés selon la procédure décrite dans l'article 1.

II.3 Résultats et interprétations

II.3.1 Caractérisation de l'effet satiétogène des protéines de levure chez le rat

Les expériences de prise alimentaire montrent que les protéines de levure induisent une dépression de la prise alimentaire importante. Ainsi, dans l'expérience 1, les rats nourris *ad libitum* avec un régime normoprotéique de levure diminuent dès le premier jour leur prise alimentaire par rapport au groupe P14 (258.2 ± 14.3 kJ vs 412.5 ± 10.4 kJ, $P < 0.001$). Cette dépression de la prise alimentaire s'accompagne d'une baisse de prise de poids sur l'ensemble de la période expérimentale, et par une baisse du poids des différents tissus prélevés (à l'exception du tissu adipeux blanc), alors qu'aucune différence de prise de poids n'est observée entre le groupe P14-y et le groupe *pair-fed* (article 3, figure 1). Dans l'expérience 2, les protéines de levure montrent une nouvelle fois leur pouvoir satiétogène plus important en comparaison des protéines de lait, mais également des protéines de soja et de gluten, qui sont toutes plus satiantes que l'amidon. Les protéines de levure diminuent alors la prise alimentaire du repas suivant l'ingestion de la charge de $25.3 \pm 6.5\%$ et la consommation quotidienne de $18.1 \pm 2.6\%$ (article 3, table 3).

Ces résultats montrent que les protéines de levure ont un effet anorexigène dépassant celui traditionnellement associés aux protéines. Cet effet ne s'explique cependant pas par l'installation d'une aversion gustative conditionnée (expérience 3). L'analyse de la séquence comportementale de satiété ne montre en effet aucune différence majeure entre des régimes normo- ou hyperprotéiques de levure et un régime normoprotéique de lait concernant la part relative de chaque comportement ou l'ordre d'apparition de ce comportement (article 3, figure 2). En outre, les paramètres de microstructure ne sont pas modifiés, en particulier la vitesse d'ingestion. Ces différents résultats montrent que les protéines de levure n'induisent pas d'aversion gustative conditionnée. La réduction de la prise alimentaire induite par les protéines de levure est donc bien de nature satiétogène.

Cet effet satiétogène, peut être du à une vidange gastrique spécifique, susceptible d'induire des signaux de nature satiétogène à différents niveaux (Phillips & Powley, 1996). Ainsi, les protéines de levure induisent un volume gastrique post-prandial beaucoup plus important que les protéines de lait, et cette différence de distension gastrique est génératrice de signaux de satiété plus importants de la part de l'estomac (article 3, figure 3). Parallèlement, la matière sèche résiduelle présente dans l'estomac à la fin du repas est beaucoup plus faible que dans le cas des protéines de lait. Le transit prandial est donc accéléré (tout en maintenant paradoxalement un volume plus élevé), hypothétiquement en raison d'une fermeture plus tardive du pylore suite à un apport de liquide plus long (voir discussion de l'article). Cet apport n'étant pas du à une consommation d'eau plus importante puisque nous remarquons qu'il n'existe aucune différence significative entre les trois groupes concernant la consommation d'eau pendant la période d'ingestion de la charge, ni durant la période précédant la présentation de la charge (**Tableau 3**). Les différences observées au niveau du volume gastrique résultent donc vraisemblablement de sécrétions gastriques plus importantes, qui pourraient jouer un rôle de compensation osmotique suite à l'ingestion des protéines de levure qui sont fortement hydrolysées. L'augmentation du flux de nutriments au niveau duodénal dans les premières minutes du repas, qui dans le cas des protéines de levure, concerne des fractions fortement hydrolysées, apporte donc une quantité beaucoup plus importante d'acides aminés prêts à être absorbés dans le duodénum, ce qui constitue un nouveau signal potentiellement fortement satiétogène^{viii}.

^{viii} Il est en réalité délicat de déterminer l'importance relative de l'intensité et de la durée des signaux de satiété. Ainsi, pour le volume, un volume plus important stimule plus fortement les mécanorécepteurs de la paroi gastrique, mais qu'en est-il d'une stimulation moyenne mais prolongée ? Il semblerait que dans ce cas, les afférences vagales aient tendance à se désensibiliser au court du temps.

II.3.2 Effet satiétogène des peptides de levure chez le rat et chez l'Homme

II.3.2.1 Description des fractions peptidiques obtenues

L'effet satiétogène des protéines de levure, très intéressant sur le plan fonctionnel, a rapidement perdu de son intérêt industriel en raison de leur pouvoir aromatique très marqué, qui rend pratiquement impossible toute formulation avec les doses utilisées pour mettre en évidence cet effet satiétogène (voir article 2).

L'analyse des spectres de chromatographies a mis en évidence que l'extrait protéique de levure est constitué de molécules de différentes tailles : des molécules de grandes tailles (>10 kD) majoritairement des glucides complexes issus de la dégradation des parois de la levure, des molécules de tailles moyennes, peptides et acides nucléiques, dont la taille est comprise entre 1 et 10 kD, et enfin des molécules plus petites, dont la taille n'excède pas 1 kD, principalement des acides aminés libres (**Figure 35**).

Cette dernière fraction, qui compose entre 80 et 90% de l'extrait initial (dit protéines de levure), contient la majorité des composés aromatiques. Eliminer cette fraction permet donc de s'affranchir des difficultés de formulation. La fraction supérieure à 10 kD a également été supprimée afin de purifier au maximum le produit final. Trois fractions différentes ont été isolées par ce procédé, à partir de deux extraits protéiques différents (**Figure 33**). Ces trois extraits comprennent quasi exclusivement des molécules dont la taille est comprise entre 1 et 10 kD. L'extrait protéique initialement utilisé correspond à l'autolysat permettant d'obtenir le peptide dit B. Les produits ont été réalisés au sein de l'atelier pilote de la société Bio-Springer, à Maisons-Alfort.

Afin de les faire ingérer par les rats, les trois extraits peptidiques ont été formulés dans des aliments normo- et hyperprotéiques de même densités énergétiques que les aliments P14.

II.3.2.2 La fraction dite « B » est plus satiétogène que les autres

Les animaux n'ayant pas complètement consommé la charge lors des deux premières (T1 et T2), seuls les jours T3 et T4 ont pu être correctement étudiés.

Dans le cas des flux de nutriments, il est encore plus difficile, en raison de la saturation éventuelle des systèmes d'absorption et de la sécrétion d'hormones (qui dans le cas de d'hormones comme l'insuline ou la leptine n'est pas instantanée), de savoir si un flux plus important au départ est plus satiétogène qu'un flux plus faible mais prolongé.

En hyperprotéique, les charges PepB 55 et Pep 2006 55 induisent à partir de T3 une forte dépression de la prise alimentaire à 1h (**Figure 36**). Concernant le régime Peptone 55, cet effet apparaît dès T2 (mais consommation incomplète de la charge) mais disparaît à T4. Ces effets entraînent une diminution de la prise énergétique comprise entre 10 et 20%.

A 3h, cet effet n'est présent qu'à T3 pour les groupes Pep2006 55 et Peptone 55, et apparaît progressivement pour le groupe PepB 55 et devient significatif à T4 (**Figure 37**).

Aucun effet n'est observé sur la consommation quotidienne, même si une tendance semble se dessiner sur la période.

En normoprotéique, les effets sont beaucoup moins prononcés, et seul le groupe PepB 14 présente un effet significatif à 1h à T4, avec une réduction d'environ 15% de la prise énergétique (**Figure 36**). A 3h, le groupe PepB 14 présente une diminution de la prise énergétique d'environ 12% à T3 ainsi qu'à T4, alors que pour les autres groupes nous n'observons un effet qu'à T4 (**Figure 37**).

A l'échelle de la journée, aucun effet n'est observé.

Ces résultats montrent que les différentes fractions de peptides de levure, malgré des procédés d'obtention assez différents, induisent tous à leur niveau, une dépression de la prise alimentaire assez importante, même si elle reste limitée à l'échelle de la journée. Cependant, la fraction qui possède le pouvoir satiétogène le plus constant en utilisation hyper- ou normoprotéique est sans conteste la fraction PepB. Les rats nourris dans cette expérience avec cette fraction ont vu leur appétit diminuer de manière progressive dans cette expérience, et il semble donc nécessaire de compléter cette étude avec une caractérisation plus complète du comportement des animaux à l'échelle de la journée.

Dans toute la suite, la fraction peptidique étudiée est la fraction PepB, appelée simplement peptides de levure.

II.3.2.3 Le pic de l'effet satiétogène induit par les peptides de levure apparaît au bout de 3-4 heures

Les résultats sont présentés pour les jours tests 5 et 6 (soit les 10 et 12^{ème} jours expérimentaux). Les résultats sont similaires pour ces deux journées (résultats présentés pour le jour 6 sur la **Figures 38 et 39 et Tableau 4**). Les rats recevant une charge de P14-pep réduisent fortement leur prise alimentaire lors de la première heure de consommation de P14 ad libitum, résultant d'une baisse du nombre de bouffées alimentaire sans que la vitesse d'ingestion ne soit affectée, ces deux paramètres indiquant une augmentation de la satiété (Feurte *et al.*, 2002)

(**Tableau 4**). Cette dépression initiale de la prise alimentaire est ensuite compensée jusqu'à 3-4 heures après le début de la période ad libitum. A partir de ce moment, les rats ayant reçu une charge calibrée de P14-pep mangent moins que les rats ayant reçu une charge calibrée de P14, et cette différence est importante pendant les 6 heures suivantes, mais cette différence s'amenuise par la suite (**Figure 39**). Les rats P14-pep terminent tout de même la journée avec une consommation quotidienne inférieure à celle des rats P14, ce qui se traduit sur la période expérimentale par une légère décroissance de la prise de poids, trop faible pour être significative, en raison des journées de charge P14 entrecoupant chaque prise de charge P14-pep.

Afin de maximaliser l'effet des peptides de levure sur la prise énergétique quotidienne et donc sur la prise de poids, il semble donc nécessaire de donner aux animaux des charges quotidiennes de peptides de levure, et un arrêt de la période d'alimentation ad libitum au bout de 10 heures permet de maintenir un écart important dans la consommation énergétique quotidienne.

II.3.2.4 Les peptides de levure induisent une dépression de la prise alimentaire chez le rat comme chez l'Homme après habitude

Les analyses de prise alimentaire, chez le rat comme chez l'Homme, montrent des résultats très similaires. L'ingestion du repas contenant des peptides de levure induit une dépression de la prise alimentaire qui n'apparaît pas lors du repas suivant (sauf chez le rat durant les premiers jours, non mesurée chez l'Homme), mais plus tard dans la journée, ce qui se traduit chez l'Homme par une baisse de la consommation lors du dîner et au niveau de la consommation quotidienne (respectivement -10.3 et -7.6%, soit environ 237 kcal pour une journée) et chez le rat par une diminution de l'énergie quotidienne ingérée (-12% après habitude). Chez le rat, cet effet apparaît dès le 7^{ème} jour, la période d'habitude choisie dans l'étude clinique est donc suffisante. En outre, cet effet ne disparaît pas chez le rat durant la période testée (24 jours). Les peptides de levure, après une période d'habitude d'une semaine, induisent donc une dépression de la prise alimentaire profonde et prolongée qui apparemment, ne connaît pas de phénomènes d'atténuation à moyen terme.

II.3.2.5 Les peptides de levure activent les neurones POMC du noyau arqué

L'étude des circuits neuronaux activés à la suite de l'ingestion de ces peptides de levure est en parfait accord avec les observations des études comportementales. En effet, les neurones

du NTS, qui sont traditionnellement activés dans la régulation de la prise énergétique à court terme (Berthoud, 2002), ne sont pas activés par les peptides de levure (sauf à court terme, ce qui correspond aux observations comportementales) et en particulier, les neurones noradrénergiques ne sont pas activés, tout comme les neurones GLP-1 (**Figure 40**). Ces profils d'activation confirment l'absence de régulation sur le repas suivant observé avec les peptides de levure.

En revanche, les neurones POMC de l'ARC, dont le rôle primordial dans la régulation de la prise alimentaire à moyen terme et le maintien de l'homéostasie énergétique est bien connu (Schwartz *et al.*, 2000), sont plus activés après habituation aux peptides de levure (article 3, figure 4 et 5). Cette activation s'accompagne, comme dans le cas des repas hyperprotéiques de lait, d'une inhibition indispensable des neurones NPY/AgRP (voir article 1) mais contrairement à ces régimes, elle va également de pair avec une augmentation du nombre total de neurones POMC (article 3, figure 5). Cette activation des neurones POMC est cohérente avec l'absence de régulation à court terme observé avec les peptides de levure, puisque les neurones POMC de l'ARC sont plus souvent impliqués dans des phénomènes de régulation de la balance énergétique et de gestion des réserves, que dans la taille des repas, même si ils peuvent également jouer un rôle dans ces phénomènes (Ellacott & Cone, 2004). La mesure du stimulus étant placée à ce moment de la journée pour des raisons d'interprétations liées aux interférences concernant le marquage de la protéine Fos avec le reste de la consommation de la journée, l'activation des neurones POMC que nous avons mesurée ne reflète peut être pas ce qu'elle peut être à d'autres moments de la journée, en particulier plusieurs heures après l'ingestion des peptides de levure, au moment même où l'effet satiétogène est le plus important. Néanmoins, la présence de neurones POMC en plus grand nombre suggère une plus forte sensibilité de cette région à des stimuli post absorptifs qui pourrait apparaître plusieurs heures après l'ingestion de la charge. L'augmentation du nombre de neurones POMC détecté dans l'ARC, qui doit prendre un certain temps à se mettre en place, expliquerait également la période d'habituation d'une semaine observé dans les études comportementales. Cette augmentation pourrait être due à un phénomène de neurogénèse, possible au niveau du noyau arqué (Kokoeva *et al.*, 2005), à la suite d'une stimulation quotidienne des peptides de levure. Le délai (une semaine) correspond à ce qui pu être observé dans le complexe vagal dorsal à la suite d'une vagotomie (Bauer *et al.*, 2005). Cette hypothèse demanderait à être testée avec les méthodes connues de détection de neurogénèse. Une autre hypothèse pouvant expliquer ce phénomène est l'augmentation des teneurs en α -MSH au sein

des neurones POMC, à la suite de stimulus répétés au cours de la première semaine, qui rendrait ces neurones détectables par immunohistochimie. Quoiqu'il en soit, la présence d'un plus grand nombre de neurones POMC après habitude aux charges de peptides levure potentialise la force de la réponse satiétogène associée à ces derniers et correspond à un mécanisme d'action très intéressant pour ces peptides, car l'augmentation du nombre de neurones sensibles au stimulus rend moins probable l'apparition de phénomènes d'habitude.

II.4 Discussion

Les protéines et peptides de levure induisent une sur satiété par rapport aux autres protéines.

Satiété accrue des protéines de levure

Les extraits de levure isolés par la société Bio-Springer possèdent des caractéristiques remarquables. L'observation initiale de ces effets fut presque le fruit du hasard lors d'études comportementales sur les propriétés anti-stressantes de ces protéines. A la suite de cette constatation initiale, les protéines de levure ont montré un pouvoir satiétogène très supérieur aux autres protéines traditionnellement utilisées dans l'alimentation. Cet effet existe lors de l'utilisation des protéines sous forme de régime normoprotéique (en alimentation unique), ou lors d'administration de charges hyperprotéiques (sous régime général normoprotéique). Dans les deux cas, les protéines de levure réduisent fortement la prise alimentaire, par rapport aux protéines de lait, de soja et de gluten. En régime *ad libitum* normoprotéique, cette dépression de la prise alimentaire apparaît dès le premier jour et se poursuit au moins pendant les 21 jours suivants. Elle s'accompagne d'un ralentissement de la prise de poids et de la croissance des tissus adipeux par rapport à un régime normoprotéique de lait. Nous avons observé un effet différent quand les protéines étaient utilisées sous forme de charges hyperprotéiques, avec lesquelles une sur-satiété ne se développe par rapport aux autres protéines que pendant les premiers jours, avant de rejoindre le niveau induit par les autres charges hyperprotéiques.

La nature de cette dépression de la prise alimentaire demeurerait cependant inconnue, et il était primordial de déterminer si elle s'accompagnait ou non d'une aversion gustative conditionnée. La satiété générale des protéines ne s'explique pas par un phénomène d'aversion gustative conditionnée, puisque les animaux nourris avec un régime hyperprotéique ne présentent pas de séquence comportementale de la satiété modifiée (Bensaid *et al.*, 2003,

L'Heureux-Bouron *et al.*, 2004a). Cette séquence est en effet particulièrement perturbée lorsqu'un aliment est couplé avec une injection de substance provoquant un malaise viscéral comme le chlorure de lithium (Ishii *et al.*, 2004). Dans le cas général des protéines, et également comme nous l'avons montré dans celui des protéines de levure, cette séquence n'est pas du tout modifiée par rapport à un régime normoprotéique de lait. La dépression de la prise alimentaire induite par les protéines de levure n'est donc pas due à une identification par l'organisme de propriétés néfastes de ces protéines pour l'organisme, entraînant un rejet. En revanche, la palatabilité des protéines de levures est vraisemblablement faible, même si nous n'avons effectué aucun test de palatabilité pour le vérifier. Cette faible palatabilité pourrait expliquer une partie de la dépression alimentaire induite par ces extraits lorsqu'ils sont utilisés dans des régimes protéiques et consommés ad libitum. Elle ne peut en revanche, comme dans le cas général des protéines, expliquer la totalité de cet effet (Semon *et al.*, 1987). Un impact de la palatabilité sur la prise alimentaire altère les propriétés microstructurelles des repas, en particulier en diminuant la vitesse d'ingestion (Blundell *et al.*, 1985), ce qui n'arrive pas dans le cas des protéines de levure.

Intérêt industriel des peptides de levure.

Malgré un effet satiétogène important, l'intérêt industriel pour les protéines de levure en tant qu'ingrédient alimentaire à destination de produits facilitant le contrôle de la prise alimentaire et une éventuelle perte de poids est en réalité assez faible. Les propriétés organoleptiques des protéines de levure (qui ont un goût particulièrement prononcé), les rendent en effet quasiment impossible à formuler dans un en-cas (ou un plat) type « hyperprotéique de levure » comme ceux utilisés dans le cas des études chez le rat. C'est l'une des raisons pour lesquelles la société Bio-Springer s'est intéressée à la purification des extraits protéiques, en éliminant les fractions les plus hydrolysées (acides aminés libres et petits peptides) ou de plus faible masse moléculaire (acides organiques, aldéhydes ...) qui présentent les caractéristiques organoleptiques les plus saillantes. L'autre objectif de cette purification a bien entendu été de se rapprocher au maximum du principe actif des protéines de levure responsable de leur effet satiétogène. Ainsi, la fraction, appelée peptides de levure tout au long de ce travail, qui représente la fraction purifiée comprise entre 1 et 10 kD de l'extrait protéique de levure initial, est une fraction 10 à 20 fois plus concentrée que l'extrait protéique initial, et présente des propriétés organoleptiques pratiquement neutres, ce qui facilite fortement sa formulation dans des produits destinés à l'alimentation humaine.

Différentes fractions peptidiques ont été isolées à la suite de l'utilisation de différents procédés et ont ensuite été testées chez le rat. Ces fractions présentaient toutes un intérêt, soit en terme de rendement, ou de propriétés organoleptiques, mais leur pouvoir satiétogène étant variable selon les fractions, seul l'extrait présentant le pouvoir satiétogène le plus élevé et le plus régulier a été retenu. Ces différences quant aux effets sur la prise alimentaire des différentes fractions testées, dont les compositions en acides aminés étaient presque identiques, indiquent que l'effet satiétogène observé résulte vraisemblablement de l'action d'un ou de plusieurs peptides spécifiques et non d'une composition générale de l'extrait.

Les peptides de levure réduisent de manière importante et durable la prise alimentaire.

Les conditions dans lesquelles les peptides de levure réduisent la prise alimentaire sont cependant assez inhabituelles. Ainsi, les agents anorexigènes connus ont un effet sur la prise alimentaire à très court terme (généralement sur le repas suivant une injection ou l'ingestion d'un aliment plus satiétogène), comme dans le cas des repas hyperprotéiques (Bensaid *et al.*, 2002), mais il est assez difficile d'obtenir un produit qui joue sur la prise alimentaire à l'échelle d'une journée, à moins d'utiliser des quantités importantes par rapport au reste de l'alimentation. En outre, et c'est également le cas des protéines, la plupart des agents satiétogènes induisent au bout de quelques jours une habitude qui les rend beaucoup moins efficaces. Or, les peptides de levure ne présentent aucune de ces trois caractéristiques. Nos études ont montré que leur ingestion n'entraîne en effet aucune diminution de la prise alimentaire lors du repas suivant, mais diminue par contre la prise alimentaire quotidienne et s'accompagne donc d'une diminution de la prise de poids. De plus, une période d'habitude est nécessaire pour que l'effet satiétogène apparaisse mais, une fois installée, cet effet perdure au moins pendant les trois semaines suivantes. Ces caractéristiques se retrouvent avec à la fois chez le rat et chez l'Homme, suggérant l'implication de mécanismes communs chez ces deux modèles. En outre, chez l'Homme, les peptides de levure induisent un effet similaire indifféremment du sexe, ou de l'âge, impliquant un caractère assez général de cet effet.

Mécanismes expliquant l'effet satiétogène des protéines et des peptides de levure.

La digestion des protéines de levure génère des signaux satiétogènes.

L'effet anorexigène des extraits protéiques de levure semble être issu d'un pouvoir satiétogène accru de ces protéines. Un des mécanismes permettant d'expliquer cet effet réside dans les propriétés originales des protéines de levure lors de leur digestion, en particulier lors de leur vidange gastrique. Ainsi, les protéines de levure induisent, lors et juste après le repas, un volume gastrique beaucoup plus important que des protéines de lait, sans que ce volume soit a priori dû à une absorption d'eau supplémentaire lors du repas ou juste après. Ce volume plus important s'accompagne paradoxalement d'un contenu gastrique vidangé beaucoup plus rapidement que dans le cas des protéines de lait. Il semble légitime d'après ces observations de spéculer que lors de l'ingestion d'une charge de protéines de levure certaines propriétés physico-chimiques de ces protéines entraînent des sécrétions gastriques plus importantes qu'à l'accoutumée. Cette augmentation plus importante mais surtout vraisemblablement plus longue que dans le cas des protéines de lait (et sans doute des autres protéines) retarde la fin de la première phase de vidange gastrique, durant laquelle le pylore reste ouvert (Kaplan *et al.*, 1992) et la vidange, beaucoup plus rapide, n'est pas régulée sur le plan énergétique (contrairement à la deuxième phase, où le pylore régule l'apport énergétique arrivant au duodénum). Cette première phase permet normalement à 20-25% du repas d'être vidangé avant la fin de la période d'ingestion (Maerz *et al.*, 1994), ce que nous retrouvons dans le cas des charges normo- ou hyperprotéiques de lait. Dans le cas des protéines de levure, ce taux dépasse 40%. Ainsi, la digestion des protéines de levure associe deux caractéristiques pouvant expliquer un pouvoir satiétogène plus important (Phillips & Powley, 1996): un volume gastrique plus important (et qui en outre se maintient plus élevé que dans le cas des autres protéines pendant les trois heures suivant le repas) et un apport massif de nutriments dans les premières minutes du repas. En outre, les propriétés des protéines de levure, qui sont à plus de 90% constituées d'acides aminés libres ou de di ou tri-peptides, ne nécessitent pas une digestion enzymatique importante et permettent donc une absorption très rapide au niveau du duodénum.

Malgré cela, la mesure des activations neuronales dans des régions du cerveau impliquées lors de la régulation du comportement alimentaire à court terme (en particulier le NTS) ne montrent pas de différence d'activation entre des protéines de levure ou de lait. En

outre, les centres de détection des acides aminés (CPA, noyau arqué) n'expriment pas non plus une activation plus importante à la suite d'une charge de protéines de levure. L'action centrale des protéines de levure demeure donc mal connue.

Les peptides de levure activent le système mélanocortique de l'ARC.

Si les peptides de levure n'induisent pas d'activation particulière au niveau du NTS, comme dans le cas des protéines de levure, leur ingestion entraîne par contre une forte activation des neurones du système mélanocortique de l'ARC, associée avec une augmentation du nombre de neurones exprimant le neuromédiateur de ce système, contrairement aux protéines de levure qui ne modifient pas l'activation de ce système (**Annexe 2**). La non-activation du NTS est tout à fait logique avec le manque de régulation de la prise alimentaire à court terme, tout comme l'implication de l'ARC, région connue comme l'un des principaux leviers du CNS dans la régulation de l'homéostasie énergétique (Schwartz *et al.*, 2000). En outre, l'augmentation du nombre de neurones exprimant l' α -MSH entre des animaux naïfs et habitués à recevoir une charge quotidienne de peptides de levure peut expliquer la nécessité d'une période d'habituation avant l'apparition des propriétés satiétogènes des peptides de levure.

Les protéines et peptides de levure présentent des mécanismes d'action différents.

Les peptides et protéines de levure possèdent des propriétés satiétogènes semblables, mais qui relèvent donc de mécanismes très différents. Dans les expériences menées dans ce travail, l'effet satiétogène des protéines de levure n'est sans doute pas dû aux peptides contenus dans cet extrait. La concentration de l'extrait en peptides (purs) est de l'ordre de 4-5%, alors qu'elle excède 80% dans l'extrait dit peptides de levure. L'apport quotidien en peptides de levure est donc de 0.36g dans le cas d'un repas quotidien normoprotéique de peptides de levure et de 0.13g dans le cas d'un repas hyperprotéique de protéines de levure, soit presque trois fois moins. Les études d'effets doses réalisées montrent que les peptides sont inefficaces à des doses aussi faibles. En revanche, l'absence d'habituation observée dans le cas d'utilisation d'un régime normoprotéique de levure est peut-être due à un effet répétitif des peptides de levure, alors apportés à hauteur de 0.28g en moyenne par jour, puisque les protéines de levure sont alors l'aliment principal. L'effet initial serait généré par les propriétés satiétogènes des protéines de levure, avant que les peptides ne jouent leur rôle après habituation.

Ces constatations laissent d'ores et déjà apparaître de grandes différences avec l'effet satiétogène induit par l'extrait protéique de levure initialement utilisé. En effet, ces protéines agissent dès le premier jour, sur le repas suivant et n'ont d'effet sur la consommation journalière que dans le cas d'alimentation exclusive avec un régime contenant des protéines de levure et non dans le cas d'une charge quotidienne unique. En outre, l'effet des charges contenant des protéines de levure dure quelques jours puis s'estompe, comme dans le cas des autres protéines. Les deux produits possèdent donc des effets totalement différenciés dans le temps, même si leur amplitude est similaire. Aucune mesure de la cinétique de vidange gastrique n'a été précisément entreprise pour les peptides de levure, comme dans le cas des protéines de levure, mais une mesure du volume gastrique 90 minutes après le début du repas (temps de prélèvement des cerveaux en méthode c-fos) montre que les peptides de levure induisent un volume beaucoup moins important que les protéines de levure et similaire à celui obtenus avec des protéines de lait (**Annexe 2**). Même si une mesure effectuée à ce moment de la cinétique n'est pas forcément révélateur d'un comportement durant et dans les premières minutes suivant le repas, il indique cependant que les deux extraits provoquent certainement des cinétiques de vidange gastrique différentes, avec dans le cas des peptides de levure, une cinétique sans doute proche de celle des protéines de lait.

Article 2 - Yeast proteins enhance satiety in rats. Rodolphe Faipoux, Daniel Tomé, Ahmed Bensaid, Céline Morens, Eric Oriol, Laurent Michel Bonanno et Gilles Fromentin.

The Journal of Nutrition. 2006 Sept; 136 (9): 2350-2356.)



Yeast Proteins Enhance Satiety in Rats^{1,2}

Rodolphe Faipoux,^{3,4} Daniel Tomé,³ Ahmed Bensaid,³ Céline Morens,³ Eric Oriol,⁴ Laurent Michel Bonnano,⁴ and Gilles Fromentin^{3*}

³Institut National de la Recherche Agronomique, Unité INRA-INAPG de Physiologie de la Nutrition et du Comportement Alimentaire, Institut National Agronomique Paris-Grignon, F75231 Paris Cedex 05, France and ⁴Bio-Springer, 94704 Maisons Alfort Cedex, France

Abstract

This study was designed to characterize the suppressant effect of yeast protein and purified peptides on energy intake. For this purpose, 5 experiments were carried out using adult male Wistar rats. Rats that consumed ad libitum a standard yeast protein diet ate significantly less and were leaner over 21 d than rats that consumed ad libitum a standard milk protein diet (Expt. 1). Moreover, rats fed a high yeast protein load reduced their next meal and daily energy intake more than rats fed any other well-balanced, amino acid, high protein load (soy, total milk protein, or wheat gluten) and more than those fed a wheat starch diet (Expt. 2). Purified peptides from the yeast protein extract produced similar effects on subsequent energy intake (Expt. 3). Study of the behavioral satiety sequence showed that rats consuming P14-y or P55-y diets ad libitum did not acquire a conditioned food aversion (Expt. 4). Finally, a preliminary study of gastric emptying in rats fed yeast protein loads showed that yeast protein was emptied more rapidly through the pylorus than total milk protein during a meal, which may induce satiety (Expt. 5). Taken together, these experiments show that yeast proteins enhance satiety in rats more than other proteins. J. Nutr. 136: 2350–2356, 2006.

Introduction

Of the 3 macronutrients, dietary proteins are the most potent in inhibiting appetite in both rats and humans (1–3). In rats, the transition from a standard protein diet [14% protein energy (P/E)⁵] to a high protein diet (>45% P/E) leads to a decrease in food intake, weight gain, and white adipose tissue (4,5). Nevertheless, opinions differ as to whether different, well-balanced amino acid proteins induce the same reduction in food intake. In rats, total milk protein and gluten, albeit differing in their amino acid content, induce an equivalent appetite-inhibitor effect (3), whereas studies in humans show that loads containing different proteins can reduce subsequent food intake (6). The aim of the present study was to evaluate how a yeast protein extract could reduce food intake and growth in rats. The appetite-inhibiting effect of this yeast protein was therefore compared with that of other protein sources in different situations when adult rats were fed a long-term diet with or without yeast protein extract, or when they were fed loads containing different proteins. Video recordings allowed us to determine whether yeast protein induced a conditioned food aversion. To clarify the mechanisms

that account for its stronger appetite-suppressant effects, we studied both the effects of yeast protein loads on gastric emptying and how the intake of peptides extracted from yeast protein affects the quantity of food intake.

Materials and Methods

Animals and diets. Adult male Wistar rats from Harlan were housed in individual cages at 22 ± 2°C, under a 12-h reverse light/dark cycle (1000, 2200; with lights on at 2200). All experimental procedures used during the study complied with the guidelines issued by the French National Animal Care Committee and were approved by the Regional (Ile de France Sud) Animal Care and Ethics Committee. Standard protein diets were modified versions of the AIN-93M diet. (Table 1) (7). Instead of casein and cystine, the standard protein diet contained 140 g total milk protein/kg of diet (P14) and the standard yeast diet contained 140 g of yeast protein/kg of diet (P14-y). High protein diets were also based on the AIN-93M diet and contained 55% of P/E from milk (P55). The high protein yeast diet contained 55% P/E from yeast (P55-y). The addition of protein replaced equivalent amounts of sucrose and starch. During Expt. 2, three other diets were used as an intra-oral load: a protein-free wheat starch diet (WS), a high-protein diet containing soy protein (P55-s), and a high-protein diet containing gluten (P55-g). Amino acid analysis of the yeast protein extract demonstrated a well-equilibrated profile (Supplemental Table 1). Except when otherwise specified, all diets were moistened (P55 and P14 diets, 1:2 and 1:1 ratios of powder to water, respectively) to minimize spillage. Food intake was determined by the difference in food cup wt before and after each experimental period, corrected for spillage, the amount of water added and evaporation. Food containers were refilled daily at 1000. All rats had free access to water during the entire experimental period. For the first 10 d of the experiments (prefeeding period), rats were adapted to laboratory conditions, and consumed ad libitum a P14 diet (baseline food for all

¹ This work received grants from the Institut National de la Recherche Agronomique (Paris, France), Institut National Agronomique Paris-Grignon (Paris, France), and Bio-Springer (Maisons-Alfort, France).

² Supplemental Table 1 is available with the online posting of this paper at jn.nutrition.org.

⁵ Abbreviations used: BSS, behavioral sequence of satiety; P/E, percentage of protein energy; P14, P14-y, and P14-pep, 14% P/E from milk, yeast, and yeast peptide protein diets, respectively; P14-pf, P14 pair-fed; P55, P55-y, P55-g and P55-s: 55% P/E from milk, yeast, gluten, and soy protein diets, respectively; WS, 100% P/E from wheat starch diet.

* To whom correspondence should be addressed. E-mail: fromenti@inapg.fr.

TABLE 1 Composition of experimental diets and/or loads¹

	P14	P14-y	P14-pep	P55	P55-s	P55-g	P55-y	WS
	g/kg diet							
Total milk protein ²	140	—	—	530	—	—	—	—
Yeast extract ³	—	140	—	—	—	—	535.7	—
Peptide yeast extract ³	—	—	107.7	—	—	—	—	—
Soy protein ⁴	—	—	—	—	530	—	—	—
Gluten ⁴	—	—	—	—	—	530	—	—
Cornstarch ⁵	622.4	622.7	655	277	277	277	272.3	741.6
Sucrose ⁶	100.3	100.3	100.3	50	50	50	50	120.7
Metabolizable energy, kJ/g	14.6	14.2	14.3	14.6	14.6	14.6	13.3	14.5
P/E, %	14	14	14	55	55	55	55	—
G/E, %	76	76	76	5	5	5	5	100
L/E, %	10	10	10	40	40	40	40	—

¹ Amount of constant component (g/kg): soybean oil (Bailey SA), 40; AIN 93M mineral mix and AIN93V vitamin mix (ICN Biochemicals), 35 and 10, respectively [see (28) for composition]; cellulose (Medias filtrants Durieux), 50; choline (ICN Biochemicals), 2.3. P/E, G/E, and L/E, represent percentage of diet energy brought by protein, carbohydrates and lipids, respectively.

² Armor Protéines;

³ Bio Springer;

⁴ ICN Biochemicals;

⁵ Cerestar;

⁶ Eurosucre.

experiments), except for those under Expt. 3, where the rats were conditioned to a 3-meal pattern. The last day of the prefeeding period is referred to as d 0.

Experiment 1: Comparison of chronically ad lib P14 fed and P14-y fed rats. Twenty-four rats, weighing 276 ± 3.6 g at the start of the experiment, were divided into 3 groups: P14, P14-y, and P14-pf ($n = 8$ /group). After the prefeeding period, P14 and P14-y rats consumed the specified diet ad libitum for 21 d. The pair-fed group of rats (P14-pf) were given the amount of energy ingested the previous day by the P14-y group, but were fed a P14 diet. Body weight and daily food intake were monitored for 21 d. On d 22, rats in 3 of the groups (P14, P14-y, and P14-pf) were killed using sodium pentobarbital (45 mg/kg body weight) and their carcasses analyzed. After rapid dissection, the following tissues were carefully removed and weighed: liver, heart, kidneys, white adipose tissues (WAT; including epididymal, retroperitoneal and subcutaneous fat pads), and stripped carcass. The liver, heart, and kidneys were washed free of gross blood in a NaCl 9 g/L solution before weighing.

Experiment 2: Satiety induced by high protein diets. On d 3 of the prefeeding period, rats were surgically equipped with an intra-oral cannula according to the procedure described by Philips and Norgren (8). Rats were allowed 1 wk for postoperative recovery. During this recovery period, the rats were infused with increasing volumes of water (≤ 10 mL) to ensure that the cannula remained patent and to habituate the rats accustomed to receiving the intra-oral load. Loads were delivered at a rate of 1 mL/min (9,10) by an infusion pump via polyethylene tubing (ID 1.14 mm) connected to the oral cannula (Biotech IPC-S, 12 channels).

During the entire period (16 d), rats received 3 separate meals/d to reproduce human feeding patterns. They were administered the load via the intra-oral catheter to guarantee complete consumption. The first meal was limited to 3 g and was made available between 1000 and 1015 (breakfast). For the other 2 meals, rats ate ad libitum for 1 h between 1500 and 1600 (lunch) and then between 2000 and 2100 (dinner). This schedule allowed the rats to adapt to eating their meals promptly while ensuring an adequate daily food intake (~ 25 g). All rats received the P14 diet during the 3 meals. After this period of acclimatization and for 4 consecutive d (load period), rats were administered different intra-oral loads as a function of their group for 10 min, 1 h before dinner. We

ensured that none of the infused loads were rejected during the infusion period. After the recovery period, 64 rats, weighing 175–190 g, were divided into 5 groups named according to the special load they were offered each day: a protein-free WS load ($n = 14$) and different high-protein loads containing 40% WS (as starch energy) and 55% protein differing as a function of the group: P55 (total milk protein, $n = 12$); P55-y (yeast protein, $n = 8$), P55-s (soy protein, $n = 15$) and P55-g (wheat gluten, $n = 15$). These loads were moistened (1:2), and were isovolumic and isocaloric (10 mL, 4.3 MJ/L). Food intake was measured after breakfast, lunch, loads (if any), and dinner. To account for between-day differences in daily food intake, the basal food intake was the mean meal intake during the last 2 d of the adaptation period (d 11 and d 12). To account for between-rat differences of food intake/meal, the amount eaten during each meal was expressed as a percentage of the basal meal food intake. This allowed each rat to serve as its own control. The effects of oral loads on basal food intake were calculated from 3 ratios: 1) the dinner ratio [(load + dinner) mean energy intake during the 4 load days $\times 100$ / (dinner) energy intake during the baseline period]; 2) the lunch ratio (lunch mean energy intake during the 4 load days $\times 100$ / lunch energy intake during the baseline period); 3) the total next-day energy intake ratio (total next-day mean energy intake during the 4 load days $\times 100$ / total next-day energy intake during the baseline period). These ratios were calculated with the means of the data for loads on d 13, 14, 15, and 16.

Experiment 3: Effect of a yeast peptide load. A mixture of peptides (ranging from 1 kD to 10 kD) was extracted from the native yeast (used in all yeast diets described above) by Bio-Springer (Maisons-Alfort). These peptides were used as the unique protein source to develop a diet called P14-pep, containing 14% of P/E as peptides. The effect of this diet was compared with the effect of P14 and P14-y diets. Thus, after the prefeeding period, 21 rats weighing 206.4 ± 1.9 g were divided into 3 groups: P14, P14-y and P14-pep. At the beginning of the night cycle, rats were presented with an isocaloric (42 kJ) and isovolumic load of 2 g (moistened 1:2) for 30 min. One-half hour after this load, rats were given free access to the P14 diet for the rest of the day, and the amount of P14 diet eaten was measured. Each experimental day (test day) was preceded by a “basal day” when the load in all groups was composed of the P14 diet. Food intakes were measured after 1, 3, and 20 h.

Experiment 4: Behavioral satiety sequence. The experimental chamber, video equipment, and analysis of video tape were utilized as previously described in Bensaid et al. (7). After the prefeeding period, 18 rats weighing 190–220 g were assigned to 3 groups (P14, P14-y, and P55-y) and received the corresponding diets. The experimental period lasted for 14 d. For 2 d prior to the test day (d 14), the rats were habituated to their test video chamber between 0745 and 1000 (just before food presentation). The behavior of animals was video recorded for the first hour of food presentation (between 1000 and 1100) and food was consumed ad libitum. The food was removed between 0600 and 1000 every day to ensure that rats would eat during the video session. For this analysis, animal behavior was categorized into 4 types, as described by Bensaid et al. (7). The total 1-h food intakes were also measured, as were the parameters concerning each eating bout (number and duration). The mean eating rate was therefore calculated for each rat by dividing the total 1-h energy intake by the total 1-h bout duration (11). Rats were returned to their home cages with their food cup after each behavioral recording session.

Experiment 5: Gastric emptying kinetics. After the prefeeding period, 60 rats weighing 180–200 g were divided into 3 groups named P14, P55, and P55-y. During the experimental period, the daily feeding schedule was divided into 2 parts: at 1000 (end of light cycle) rats were given a load of 2 g (moistened 1:2) for 30 min, and then ate a P14 diet (moistened 1:1) ad libitum between 1230 and 1800. Every day (except for the last 2 d of the experiment, d 9 and 10), the loads consisted of the P14 diet, but otherwise the diet corresponded to the name of the group. On the last day of the experiment (d 10), the rats were killed using sodium pentobarbital at different time points after the end of the load ingestion

period (0, 30, 60, and 180 min). The stomachs were quickly ligatured and removed, weighed, and emptied, and the contents were also weighed. The contents were subsequently freeze-dried and the nitrogen rate determined by mass spectrometry.

Statistics. Results are expressed as means $\pm$ SEM. Differences between groups were determined by 2-way ANOVA (Proc GLM, SAS, version 6.11), and a diet effect was tested except when specified. The level of significance was set at $P < 0.05$, but when a significant effect was revealed by ANOVA, differences between individual means were determined using a post hoc test (Tukey-Kramer or the Dunnett test when one diet was considered a control diet, usually the P14-fed group). When only 2 groups were involved, data comparisons were performed using Student's t test. In Expt. 2, energy intakes (expressed as a percentage of the mean basal-day energy intakes to account for between-day and between-rat differences) were compared with a baseline of 100% (using a paired Student's t test) to clarify differences between the diets. Because a time effect was involved in Expts. 1 and 3, differences between groups were determined using mixed models for repeated measurements to test the effects of diet (or behavior in Expt. 3), time, and time $\times$ diet (or behavior) (Proc Mixed, SAS, version 6.11). Multiple comparisons were made using ad hoc contrast (Expt. 3) under the mixed models.

Results

Energy intake, body weight gain, and body composition in rats fed a standard yeast protein diet (Expt. 1). Until d 0, there were no differences in food intake or body weight gain between the P14 and P14-y groups, and the P14 energy intake was 407 ± 9 kJ/d. As early as d 1, a decrease in daily energy intake was observed in rats receiving the P14-y diet (412.5 ± 10.4 kJ/d and 258.2 ± 14.3 kJ/d in the P14 and P14-y groups, respectively (diet effect, $P < 0.001$). The reduction in energy intake occurred at the same time as a deceleration in body weight gain over the whole experimental period (diet effect, $P < 0.001$; Fig. 1A, B). In contrast, body weight gain did not differ between rats in the P14-y and P14-pf groups (P14-pf data are not shown in Fig. 1A, B because of too close similarities with P14-y data). Rats receiving the P14 diet had a higher final body weight

than those in the other 2 groups (diet effect, $P < 0.001$). All organ variables measured were significantly lower in rats receiving P14-y than in those eating the P14 diet ad libitum (except for white adipose tissue in the P14-y group), whereas rats fed the P14-y diet and those that were pair fed (P14-pf group) did not differ (Table 2).

Appetite-suppressing effect of several high protein loads or of yeast purified peptides in rats (Expts. 2 and 3). Before introducing the experimental load, the groups did not differ in lunch and dinner energy intakes. The effects of the load on energy intake during the next dinner, the next lunch, and the total daily energy intake following the load, are shown in Table 3. With the next dinner, except for the P55-s load, all other high protein loads induced a decrease in energy intake. There was a difference between high protein groups, and the P55-y load induced a more marked appetite-suppressing effect (diet effect, $P < 0.05$) than P55 and P55-g. In contrast, the WS load induced an increase in energy intake during dinner (paired Student's t test vs. 100%, $P < 0.01$). With lunch, the effect of the load did not last until the next lunch, when no between-group differences were noted, although the WS group tended to eat more ($P = 0.08$) and the P55-y group tended to eat less ($P = 0.1$) than other groups. Total next-day energy intake: only the P55-y load induced a decrease in the daily food intake (paired Student's t test vs. 100%, $P < 0.01$). In contrast, the WS load enhanced the daily food intake (paired Student's t test vs. 100%, $P < 0.05$).

The effect of yeast peptides on short-term food intake was then investigated. Food intake monitoring results indicated that P14-pep rats reduced their energy intake after the third intake of a P14-pep load (d 6), and this trend continued with the fourth intake (d 8). On d 6, this reduction in energy intake was only noticeable with respect to the 3-h intake, but was manifest on d 8 as early as 1 h after the start of the ad libitum period (i.e., 2 h after the end of the load), and strengthened further after 3 h. Energy intake was decreased compared with the basal day [d 6: 160.9 ± 5.41 , 142.4 ± 4.32 , diet effect, $P < 0.05$ (3 h); d 7: 84.0 ± 2.56 , 70.5 ± 2.63 , $P < 0.05$ (1 h) and 157.7 ± 3.17 , 139.1 ± 3.17 , diet effect, $P < 0.01$ (3 h), for the P14 and P14-pep loads, respectively], whereas energy intake between basal and test days did not differ in the P14 and P14-y groups.

Behavioral satiety sequence in rats eating standard or high protein diets containing yeast proteins (Expt. 4). In the P14 group, the 4 behaviors appeared in a well-defined sequence: eating, followed by grooming and/or activity, followed by resting (Fig. 2). Most eating occurred during the first 10 min after P14 diet presentation. The resting phase became predominant after 20 min (contrast of resting vs. other behaviors, $P < 0.001$) and its duration was the longest of the various behavioral satiety sequence (BSS) parameters. BSS parameters were not disturbed in the P14-y and P55-y groups. Behavioral profiles and parameters did not differ among the 3 groups. However, grooming was more important and resting was less important in the P55-y group compared with the P14-y group (diet effect, $P < 0.05$).

Moreover, no intergroup differences were seen between mean eating bout parameters (Table 4), although the P14-y group exhibited a tendency toward reduced meal bouts ($P = 0.09$). In contrast, daily energy intakes (d 14) differed in the P14 (519 ± 12 kJ), P14-y (391 ± 15 kJ), and P55-y (358 ± 6 kJ), groups (diet effect, $P < 0.001$). In addition, the yeast protein-containing diet increased the time spent drinking (P55-y > P14-y > P14; diet effect, $P < 0.001$).

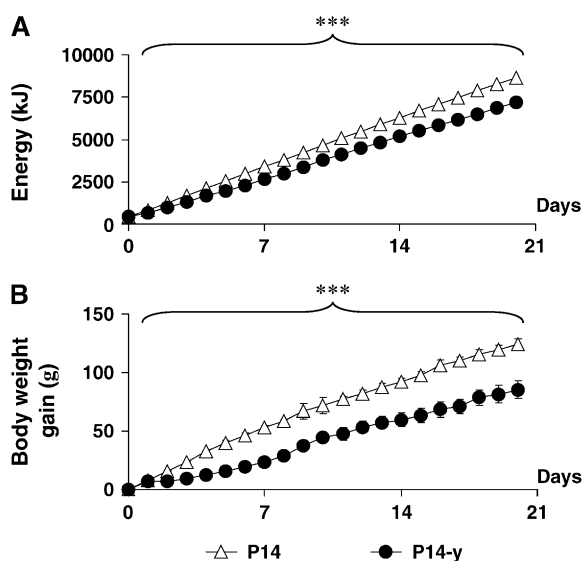


Figure 1 Energy intake (A) and body weight gain (B) of rats fed P14 or P14-y diets for 21 d (Expt. 1). Values are means $\pm$ SEM, $n = 8$ /group. ***Mixed procedure using repeated measurements with diet effect, $P < 0.001$.

TABLE 2 Body compositions of rats after 21 d of consuming various protein diets (Expt. 1)¹

	Wt	WAT ²	Carcass	Liver	Kidneys	Heart	WAT/carcass	Carcass/body wt
	<i>g</i>						<i>g/g</i>	
P14 ad lib	435.2 ± 4.4	57.9 ± 2.7	178.3 ± 3.2	13.8 ± 0.7	2.6 ± 0.1	1.06 ± 0.03	0.33 ± 0.02	0.41 ± 0.008
P14-y	385 ± 10.4*	46.8 ± 4.0	163.1 ± 3.8*	10.5 ± 0.7*	2.3 ± 0.1*	0.89 ± 0.03*	0.29 ± 0.02	0.43 ± 0.007
P14-pf	385.2 ± 12.3*	44.7 ± 3.8 *	162.7 ± 5.4*	9.8 ± 0.3*	2.1 ± 0.1*	0.91 ± 0.02*	0.27 ± 0.02	0.43 ± 0.004

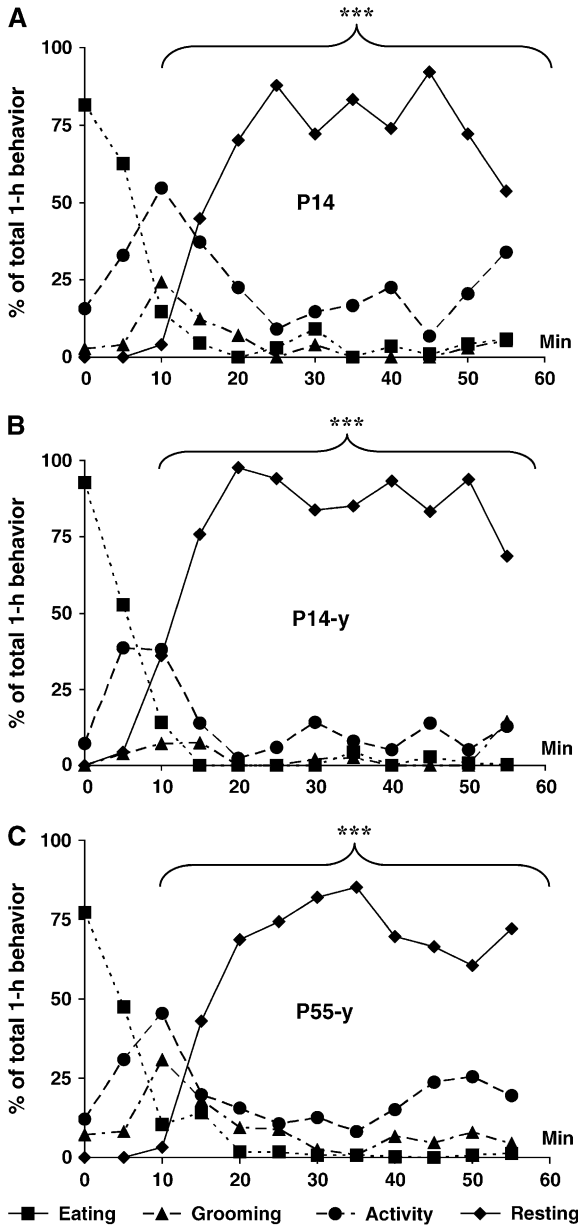
¹ Values are means ± SEM (*n* = 8). *Different from P14 ad lib, *P* < 0.05.
² WAT, white adipose tissue.

Gastric kinetics in rats fed the P14, P55 or P55-y diet (Expt. 5). Kinetic profiles exhibited marked behavioral differences between rats fed the various diets. Thus, at the end of the meal (considered as time 0), the P55-y load induced a marked increase in total stomach content weight (3.43 ± 0.25 g/g of dry P55-y diet; Fig. 3A) which was greater than the weight ingested (3 g/g of dry P55-y diet) during the meal. Consequently, the P55-y load induced higher weight than the other 2 loads at time 0 (diet effect, *P* < 0.01), although, in terms of dry weight (Fig. 3B), almost half of the P55-y load had already been emptied from the stomach by the end of the meal, whereas only 25% of the P14 and P55 loads had been emptied by this time (diet effect, *P* < 0.05). After the meal, the loads induced different profiles. Although the dry weight of the P55-y load fell during the first half hour, it then remained very stable, as if emptying had almost stopped, so that after 3 h the dry weight of this load was higher than with other loads (diet effect, *P* < 0.05). For every load tested, percentages of protein content were almost at the same level at the end of the meal as in the initial load (Fig. 3C), but the protein content of the P55-y load decreased more rapidly than that of the P55 load and thus differed after 60 min (diet effect, *P* < 0.05). The protein content of the P55-y-load then continued to decrease while the P55-load continued to exhibit the same protein level throughout gastric emptying. The protein content in the P14 load slightly and steadily increased throughout gastric emptying, resulting in ~30% protein after 3 h, which was not particularly relevant considering the amount of dry content remaining at that time.

Discussion

The present study evaluated similarities and differences regarding the effects of yeast protein extracts and other well-known proteins on energy intake, body weight, body composition, and the behavioral satiety sequence in rats. The results showed that dietary yeast protein extracts appear to act as strong appetite inhibitors and reduce food intake in rats more than other

proteins under similar conditions. The protein level in the meal or diet reinforced this effect. Moreover, rats fed a yeast protein diet did not acquire a conditioned food aversion and displayed a normal BSS. In addition, the yeast protein-derived peptide



Figures 2 Temporal profile of BSS at d 14 of rats fed P14 (A), P14-y (B) and P55-y (C) diets (Expt. 4). Values are means ± SEM, *n* = 6/group. ***Contrast of resting vs. other behaviors with a mixed procedure using repeated measurements with behavior effect (data after 10 min), *P* < 0.001.

TABLE 3 Percentage of P14 diet eaten by rats after high protein loads (Expt. 2)¹

	<i>n</i>	Dinner	Lunch	Daily
		<i>%</i>		
WS	12	124.1 ± 8.0**	124.8 ± 15.8	115.3 ± 6.1*
P55	12	91.0 ± 2.8 **	102.7 ± 5.0	96.5 ± 2.3
P55-y	8	74.7 ± 6.5**	90.6 ± 9.2	81.9 ± 2.6***
P55-s	15	104.2 ± 6.0	100.1 ± 8.6	100.4 ± 5.3
P55-g	15	90.2 ± 4.2**	107.1 ± 6.5	95.7 ± 2.9

¹ Values are means ± SEM. Asterisks indicate different from consumption (100 ± 0.0%, paired Student's *t* test); **P* < 0.05, ***P* < 0.01, ****P* < 0.001.

TABLE 4 Behavioral satiety sequence and eating parameters in rats during the first hour of food presentation at d 14 (Expt. 4)¹

	P14	P14-y	P55-y
Eating bout parameters			
<i>n</i>	7.0 ± 0.9	4.5 ± 0.8	5.8 ± 1.0
Duration, <i>s</i>	88.3 ± 12.5	133.6 ± 36	79.6 ± 11.6
Rate of ingestion, <i>kJ/min</i>	11.4 ± 1.9	16.4 ± 2.9	11.6 ± 2.1
1-h energy intake, <i>kJ</i>	105.0 ± 12.3	139.8 ± 29.2	94.6 ± 26.0
BSS, % of time			
Eating	15.9 ± 0.7	14.0 ± 1.6	12.8 ± 2.5
Grooming	5.2 ± 1.2 ^{ab}	3.1 ± 0.8 ^a	10.3 ± 3.2 ^b
Resting	54.5 ± 6.7 ^{ab}	68.0 ± 4.2 ^b	45.8 ± 6.2 ^a
Activity	24.0 ± 6.9	13.8 ± 3.2	23.2 ± 2.7
Drinking	0.4 ± 0.2 ^a	1.2 ± 0.5 ^a	7.8 ± 1.4 ^b

¹ Values are means ± SEM (*n* = 6). Means in a row with superscripts without a common letter differ, *P* < 0.05.

fraction exhibited an appetite suppressing effect similar to that of the yeast protein extract.

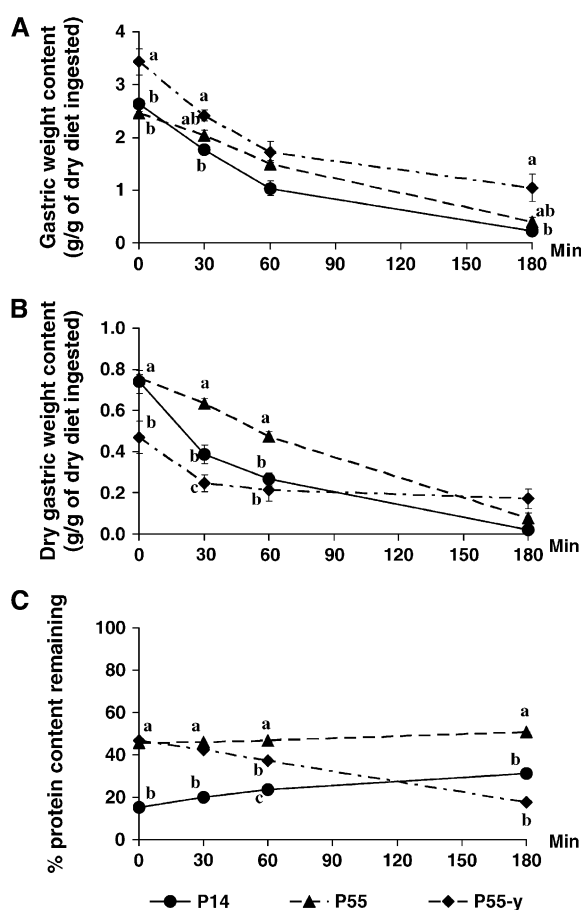
Interestingly, yeast proteins more potently inhibited energy intake than other well-balanced amino acid proteins. Various proteins have been used during appetite-suppressing experiments and it appears that not only the protein source but also the

experimental conditions (such as the time and quantity of food eaten) can interfere with the feeding response (3,6,12,13). When offered a standard protein diet (14% P/E), adult rats eating ad libitum a diet that contained yeast protein ate less, grew less, and were leaner than rats fed the standard protein (control) diet. When compared with rats pair-fed the control diet, body weight gain and relative body composition did not differ, which suggests that yeast protein acts as an appetite inhibitor and induces a reduction of body weight gain and body fat composition by depressing daily energy intake; yeast proteins, therefore, do not seem to increase energy expenditure. Yeast proteins in a high protein load induced the most marked, and a soy protein load the least marked, depression in food intake. During the various appetite-suppressing experiments described in the literature, it is still not clear what protein properties significantly affect the feeding response. During our experiment (except for yeast), the results did not differ with such biochemically contrasting proteins as soy, gluten, and total milk protein, as previously found in the literature (12,13).

One possibility for this result is that the yeast protein appetite-suppressive effect was partially induced by a low palatability. During Expt. 1, the diets differed only in terms of their oro-sensory properties due to the type of protein used and not because of the content in other macro- or micronutrients, and it can indeed be hypothesized that the yeast diet was less palatable than the control diet. Some decades ago, this question was studied by modifying the oro-sensory properties of experimental foods by adding flavors (14), unpleasant flavors [citral or eucalyptol (15)], or unpleasant substances [such as quinine or sucro octa acetate (16,17)]. To our knowledge, after a transient decline dependent on the substance used, all groups chronically consuming ad libitum the low palatable diets ate as much as the control group, so that a putative low palatability of yeast was probably not the principal mechanism causing a reduction in energy intake.

Moreover, there are several reasons why the more marked appetite-suppressing activity of the yeast protein extract was not induced by a conditioned food aversion. First of all, the rate of ingestion was not decreased, whereas this would have been the case (after the habituation period) in the event of a typical conditioned food aversion (18,19). This characteristic was confirmed by analysis of the BSS. Indeed, when eating the normal protein diet, the 4 main behaviors appeared in the well-defined sequence of eating and grooming and/or activity and resting (7,11), and this sequence was not modified by a normal or high yeast protein diet. This sequence differed completely from that observed in the event of illness-induced anorexia, such as with LiCl injections (20). However, the short-term (1-h) energy intake of rats chronically fed with P14, P14-y or P55-y diets did not differ (unlike in Expt. 1) despite differences in the total daily energy intake. These results suggest that the decrease in food intake occurred after the first hour of the night period, and that changes occurred to the control of feeding after chronic ingestion of the yeast diets.

Our results show that the gastric kinetics of the yeast load exhibited 2 characteristics that might induce satiety signals (21): 1) a higher stomach volume (Fig. 3A), with mechanical receptors activating vagal afferents, 2) and mainly a higher dose of energy and/or specific nutrients attaining the duodenum more rapidly (Fig. 3B) and potentially sending a strong satiety signal. Indeed, rats fed loads containing yeast proteins or total milk protein exhibited different patterns of gastric emptying. The increase in gastric volume induced by yeast proteins was probably due to an increase in gastric secretions and/or the amount of water drunk



Figures 3 Kinetics of total (A), dry (B) and protein contents (C) of rat stomachs after P14, P55, and P55-y loads (Expt. 5). Total and dry contents are expressed as relative measurements for 1 g of dry diet ingested. Values are means ± SEM, *n* = 5. Means at a time without a common letter differ, *P* < 0.05.

(as shown in Expt. 3). This could be due to the particular content of protein extracts [mainly composed of hydrolyzed proteins, small peptides (2–5%) and free amino acids (>80%)], increasing osmotic pressure and hence, stomach secretions. Even though gastric emptying is regulated by feedback signals from the duodenum to ensure a constant flow of energy through the pylorus after a meal (22), an early, short emptying phase before initial closure of the pylorus, does not precisely follow this pattern of regulation. The pylorus remains open during the early stage of a meal, so that it can partly empty directly into the duodenum without energy regulation until the stomach volume stabilizes (23). This emptied portion has been estimated at ~15–25% of the complete meal (24), which corresponds to what was obtained with the P14 and P55 loads. In contrast, half of the dry content of the yeast protein load was emptied during the meal. One hypothesis is that, during our experiment, the increase in stomach volume delayed pyloric closure so that more of the load was emptied from the stomach. This mechanism may have been triggered by a larger amount of water being consumed during the meal. This possible higher water intake with a yeast load may have changed its energetic density and therefore influenced the stomach volume of the rats and to a lesser extent the rate of emptying. However, the rate of ingestion did not differ between rats fed the control diet or the diets containing yeast, as shown in Expt. 4. The putative strong duodenal satiety signal may have been enhanced by the fact that the protein content was almost completely hydrolyzed and therefore immediately available for absorption and/or action (in the case of a peptide). Nevertheless, hydrolysis alone was not responsible for the satiety effect of this load because hydrolyzed and total proteins usually have the same effect on energy intake (13). The portion of the yeast diet that emptied very slowly after 30 min was mainly composed of partially hydrolyzed yeast fibers. These fibers, when added to a regular P14 meal, did not affect body weight gain in the rats (data not shown), suggesting that this part of the yeast extract was not responsible for the satiety properties of this diet.

Apart from these experiments, a small proportion of the yeast extract (mainly containing peptides from 1 to 10 kD) had been purified industrially. This fraction reduced energy intake, but only when the peptides had been consumed several times, unlike the yeast extract load that reduced food consumption (as from the first intake). This delayed effect suggests that this fraction may not be the only satiety agent in the yeast extract. Such a latency period tends to trigger properties related to intestinal receptors, the regulation of which results from weekly cell regeneration (25,26). Repeated intakes may therefore stimulate intestinal cells until sufficient specific receptors are available to send a signal strong enough to decrease energy intake (27). Moreover, use of a standard yeast protein load failed to reduce food intake, suggesting the involvement of a dose effect. The amount of peptides in a 2-g P14-pep load was indeed similar to a 3-g P55-y load and produced similar effects on food intake, unlike a 2-g P14-y load that contained much less peptide (~10%).

The appetite-suppressant effect of the yeast extract still needs to be explained (e.g., presence of a specific amino acid or peptide acting on gastric kinetics). To further investigate the mechanisms underlying the satiety properties of yeast protein extract and peptides, we will in the future focus on the major processes associated with energy-intake depression, such as 1) vagus-mediated signals produced by increased stomach distension, higher protein, or amino acid levels in the gut, and increased amino acid metabolism in the liver, and 2) elevated peripheral plasma free amino acid or related metabolite concentrations directly monitored by specific areas of the brain. Moreover, the

different brain areas probably involved in regulating energy intake (brainstem and hypothalamic area) should be investigated to determine whether yeast diets enhance their activation. Finally, digestive behavior requires further study, especially with respect to the duodenal absorption of peptides.

Literature Cited

- French JA, Wainwright CJ, Booth DA, Hamilton J. Effects of meat species and particle size on postprandial satiety. *Proc Nutr Soc.* 1992;51:51–7.
- Reid M, Hetherington M. Relative effects of carbohydrates and protein on satiety: a review of methodology. *Neurosci Biobehav Rev.* 1997;21:295–308.
- Bensaid A, Tome D, Gietzen D, Even P, Morens C, Gausseres N, Fromentin G. Protein is more potent than carbohydrate for reducing appetite in rats. *Physiol Behav.* 2002;75:577–82.
- Jean C, Rome S, Mathe V, Huneau JF, Aattouri N, Fromentin G, Achagiotis CL, Tome D. Metabolic evidence for adaptation to a high protein diet in rats. *J Nutr.* 2001;131:91–8.
- Lacroix M, Gaudichon C, Martin A, Morens C, Mathe V, Tome D, Huneau JF. A long-term high-protein diet markedly reduces adipose tissue without major side effects in Wistar male rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2004;287:R934–42.
- Anderson GH, Tecimer SN, Shah D, Zafar TA. Protein source, quantity and time consumption determine the effect of protein on short-term food intake in young men. *J Nutr.* 2004;134:3011–5.
- Bensaid A, Tome D, L'Heureux-Bourdon D, Even P, Gietzen D, Morens C, Gaudichon C, Larue-Achagiotis C, Fromentin G. A high-protein diet enhances satiety without conditioned taste aversion in the rat. *Physiol Behav.* 2003;78:311–20.
- Phillips MI, Norgren R. A rapid method for permanent implantation of an intraoral fistula in rats. *Behav Res Methods Instrum.* 1970;2:124–134.
- Geliebter A, Liang JT, Van Itallie TB. Effects of repeated isocaloric macronutrient loads on daily food intake of rats. *Am J Physiol.* 1984;247:R387–92.
- Kaplan JM, Spector AC, Grill HJ. Ingestion rate as an independent variable in the behavioral analysis of satiation. *Am J Physiol.* 1990;258:R662–71.
- Rodgers RJ, Halford JC, Nunes de Souza RL, Canto de Souza AL, Piper DC, Arch JR, Upton N, Porter RA, Johns A, Blundell JE. SB-334867, a selective orexin-1 receptor antagonist, enhances behavioral satiety and blocks the hyperphagic effect of orexin-A in rats. *Eur J Neurosci.* 2001;13:1444–52.
- Trigazis L, Ortmann A, Anderson GH. Effect of cholecystokinin-A receptor blocker on protein induced food intake suppression in rats. *Am J Physiol.* 1997;272:R1826–33.
- Anderson GH, Li ETS, Anthony SP, Ng LT, Bialik R. Dissociation between plasma and brain amino acid profiles and short-term food intake in the rat. *Am J Physiol.* 1994;266:R1675–86.
- Scott EM, Quint E. Self-selection of diet: II The effect of flavor. *J Nutr.* 1946;32:113–9.
- Le Magnen J. Role of dietary odour in the short-term control of intake in the white rat. *Appetite.* 1999;33:30–2.
- Kratz CM, Levitsky DA, Lustick S. Differential effects of quinine and sucrose octa acetate on food intake in the rat. *Physiol Behav.* 1978;665–7.
- Kratz CM, Levitsky DA. Post-ingestive effects of quinine on intake of nutritive and non-nutritive substances. *Physiol Behav.* 1978;21:851–4.
- Feurte S, Tome D, Gietzen DW, Even PC, Nicolaidis S, Fromentin G. Feeding patterns and meal microstructure during development of a taste aversion to a threonine devoid diet. *Nutr Neurosci.* 2002;5:269–78.
- Blundell JE, Rogers PJ, Hill AJ. Behavioral structure and mechanisms of anorexia: calibration of natural and abnormal inhibition of eating. *Brain Res Bull.* 1985;15:371–6.
- Ishii Y, Blundell JE, Halford JCG, Upton N, Porter R, Johns A, Rodgers RJ. Differential effects of the selective orexin-1 receptor antagonist SB-334867 and lithium chloride on the behavioral satiety sequence in rats. *Physiol Behav.* 2004;81:129–40.

21. Powley TL, Phillips RJ. Gastric satiation is volumetric, intestinal satiation is nutritive. *Physiol Behav.* 2004;82:69–74.
22. Calbet JAL, MacLean DA. Role of caloric content on gastric emptying in humans. *J Physiol.* 1997;498:553–9.
23. Kaplan JM, Spector AC, Grill HJ. Dynamics of gastric emptying during and after stomach fill. *Am J Physiol.* 1992;263:R813–20.
24. Maerz LL, Sankaran H, Scharpf SJ, Deveney CW. Effect of caloric content and composition of a liquid meal on gastric emptying in the rat. *Am J Physiol.* 1994;267:R1163–7.
25. Thomson ABR, Cheeseman CI, Keelan M, Fedorak R, Clandinin MT. Crypt cell production rate, enterocyte turnover time and appearance of transport along the jejunal villus of the rat. *Biochim Biophys Acta.* 1994;1191:197–204.
26. Ferraris RP. Dietary and developmental regulation of intestinal sugar transport. *Biochem J.* 2001;360:265–76.
27. Pupovac J, Anderson GH. Dietary peptides induce satiety via cholecystokinin-A and peripheral opioid receptors in rats. *J Nutr.* 2002;132:2775–80.
28. Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC. 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-76 Rodent diet. *J Nutr.* 1993;123:1939–51.

**Article 3 - Yeast peptides induce satiety in rats and humans and activate
hypothalamic pathways involved in satiety in rats.**

**Rodolphe Faipoux, Daniel Tomé, Robert Benamouzig, Eric Oriol, Laurent Michel
Bonanno, et Gilles Fromentin.
The Journal of Nutrition, soumis.**

Yeast peptides reduce food intake and activate hypothalamic pathways involved in satiety¹

R. Faipoux^{ab}, D. Tomé^a, S. Gougis^a, R. Benamouzig^c, E. Oriol^b, LM Bonanno^b and G. Fromentin^{a§}

^a INRA, AgroParisTech, UMR914 Nutrition Physiology and Ingestive Behavior, CRNH-IdF, F-75005 Paris, France.

^b Bio Springer, 103 rue Jean Jaurès, 94704 MAISONS ALFORT Cedex, France.

^c Department of Gastroenterology, Avicenne Hospital, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Clinical Investigation Centre of CRNH Ile-de-France (Human Nutrition Research Centre), 93000 Bobigny, France.

Key words: yeast peptides, satiety, arcuate nucleus.

Word count: 5773. Number of figures: 6; Number of tables: 2

¹ This work received grants from Institut National de la Recherche Agronomique (Paris, France), Institut National Agronomique Paris-Grignon (Paris, France) and Bio-Springer (Maisons-Alfort, France).

[§] To whom correspondence should be addressed. E-mail: fromenti@inapg.fr.

22 **Abstract**

23 The objective of this work was to further investigate and characterize the anorectic effect of yeast
24 peptides in rats as well as in humans. In this study, we investigated the anorectic response
25 following the ingestion of yeast-peptides meals/loads in rats and in humans. We also studied the
26 putative effect of this diet on brain areas involved in regulation of food intake, in the brainstem
27 and the hypothalamus in rats. Results showed that yeast peptides induced a strong and long
28 lasting decrease in daily energy intake (-10%), without any effect on subsequent meal intake. The
29 effects were very similar in rats and in humans in potency and regularity. Regarding activation of
30 neuronal pathways in rats, yeast peptides did not increase activation of brainstem pathways,
31 correlating the lack of regulation of next meal intake, but increased activation of melanocortin
32 pathway in the arcuate nucleus and number of neurons expressing detectable α -MSH. Taken
33 together, these results showed that yeast peptides are potent in decreasing daily energy intake in
34 rats as in humans, presumably through the activation of central pathway involved in regulation of
35 energy homeostasis.

INTRODUCTION

Dietary proteins induce satiety and depress food intake in both rats and humans (1-6) and the protein type used is also believed to widely modulate this effect (7-10). Interestingly, mycoproteins (11,12) and yeast proteins (2) enhance satiety to a higher level than other commonly consumed proteins in rats. In addition we previously observed that yeast protein hydrolysate-derived peptides ranging from 1 to 10 kD were seemingly responsible for the yeast protein-induced satiety in rats (2). In the present study, we further investigated the anorectic property of these yeast protein-derived peptides in rats as well as in humans. We also evaluated the influence of these peptides on brainstem and hypothalamic areas involved in the control of food intake in rats. For this purpose, we analyzed the effect of the peptides on the noradrenergic pathway involved in CCK² induced anorexia in the NTS (13), and on the melanocortin pathway involved in fuel sensing and in the regulation of energy homeostasis in the ARC (14).

² Abbreviations used: α -MSH: α -Melanocortin Stimulating Hormone; ARC: Arcuate Nucleus of the Hypothalamus; CCK: cholecystokinin; CTA: conditioned taste aversion; d β H: dopamine- β -Hydroxylase; GLP-1: glucagon-like-peptide 1; INAP-G: Paris National Institute of Agronomy; LHA: Lateral Hypothalamic Area; NA/A: noradrenalin/adrenalin; NTS: Nucleus of the Solitary Tract; P/E, G/E, L/E: percentage of diet energy brought by protein, carbohydrates and lipids, respectively; P14, P14-pepS and P14-pepL: 14% P/E milk and yeast peptides acute and chronic diets, respectively; PBS: phosphate buffer saline; POMC: pro-opiomelanocortin; VAS: visual analogic scale.

MATERIALS AND METHODS

Yeast protein-derived peptide extract and soy protein

The peptides are a mixture of different sizes, ranging from 1kD to 10 kD and are extracted from yeast proteins by Bio-Springer (Maisons-Alfort, France). Soy proteins were chosen as control proteins for the clinical study because they matched yeast peptides for taste when added to the tomato soup, contrary to total milk proteins, which completely altered the taste of the soup. Soy protein meal is as potent as milk protein to reduce food intake in rats (2,18) as well as in humans (7), which allows us to compare effects of yeast peptides on food intake reduction in rats and in humans. The reduction in energy intake observed with yeast peptides is unlikely to originate from the detection of an imbalance in indispensable amino acid composition (19) since soy proteins, total milk proteins and yeast peptides are well balanced amino acid proteins.

Effect of a yeast peptides snack on subsequent energy intake in humans

Human volunteers and design: The study was performed in the Human Nutrition Research Center in Avicenne Hospital (Bobigny, France). The protocol was approved by the Ethical Committee of Aulnay sous Bois (France). 17 volunteers, 8 men, 9 women, were selected with regular body mass index ($18 < \text{BMI} < 25$), aged between 18 and 60, non-smoking, non-restricted (three factor eating questionnaire < 10) and with regular feeding pattern habits.

9g of yeast-peptides extract was mixed with 24g of tomato soup powder to obtain a snack of 117 kcal. We used a mix of 24g of tomato soup with 9g of soy protein as control snack. The two snacks were isocaloric and aspect as well as taste was very similar. Experimental protocol was splitted into two periods of 16 days. During each period, volunteers tested one of the two snacks, and switched to the other snack for the other period. Groups were randomized between soy and peptides snacks to prevent bias regarding lassitude towards the procedure. During each period, volunteers came to the hospital during 4 days, two at the beginning (basal consumption

recording) and two at the end of the period (test days). Between these days, they were asked to consume a daily soup at 11.30 at home and/or work (**Fig 1**).

Experimental procedure: Each day at the hospital was strictly similar towards protocol and meals. At 11.15, volunteers arrived at the center and seated in separated boxes. At 11.30, they were given on test days the snack according to their group, diluted in 250ml of hot water and were told to eat it completely into 15 minutes. On basal days, they got nothing. At 12.00, they were given standard logical test in order to distract themselves from food. At the beginning of the study, they were told that the purpose of this study was to determine the effect on a mid-morning snack on focusing and intellectual capacities. At 12.30, they had lunch (identical each day) served in triple portion to let them eat until satiety. After lunch, they were given a food basket containing their dinner and their next-day breakfast. They were told not to eat or drink anything else than provided but water or sugar free coffee and/or tea for the whole day and to take back the next day what was not consumed. Food consumed during every meal (breakfast, lunch, dinner) was precisely weighted and energy intake calculated for each meal and for the entire day. Apart from food consumption, hunger and emotional perception was also monitored using visual analogic scales (VAS) that volunteers filled at different time during the day (**Fig 1**).

Effect of a yeast peptides meal on energy intake, body weight gain in rats

Animals and diets: Adult male Wistar rats from Harlan (Gannat, France) were housed in individual cages at $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$, under a 12-h reverse light/dark cycle (09:00, 21:00; lights on at 21:00). All experimental procedures used during the study complied with the guidelines issued by the French National Animal Care Committee and was approved by the Regional (Ile de France Sud) Animal Care and Ethical Committee. Concerning the composition of the diets used (**Table 1**), standard protein diets were modified versions of the AIN-93M diet (15). Instead of casein and cystine, the P14 diet contained 140 g total milk protein per kg of diet and the P14-pep diet contained 140 g yeast peptides per kg of diet. All diets were moistened (1:1 ratio of powder to

water for all diets) to minimize spillage by rats. All rats had free access to water during the entire experimental period. For the first 10d of the experiments (pre-feeding period), rats were adapted to laboratory conditions, and were conditioned to a two-meal pattern with P14 diet (baseline food). The last day of the pre-feeding period is referred to as d0.

Experimental design: During the pre-feeding period, feeding pattern was divided in two periods. At 9.00, first meal consisted of a 30 min intake using 3g of P14 (43.8 kJ) followed by an *ad libitum* consumption of the P14 diet from 10.30 until 18.30 (**Fig 2**). At d1, rats were divided in two groups: the P14-pepS group was treated with the same protocol as before. At d25, rats were given a 3g P14-pep meal instead of P14 during two days (in order to compare acute and chronic effect of yeast peptides on central activation). From d1 and until day d25, P14-pepL group was given 3g of the P14-pep diet (43.8 kJ) during the first calibrated meal, and the P14 diet during the *ad libitum* period. At d26, all rats were sacrificed and brains were removed. Food intake was measured each day after 3h and at the end *ad libitum* period. Food intake was determined by the difference in food cup weight before and after each experimental period, corrected for spillage, the amount of water added and evaporation. Rats were also weighted daily.

Effect of a yeast peptides meal on central activation of NTS and ARC in rats.

Tissue collection : Considering the dynamics of Fos protein expression in the CNS (16), rats were killed with a lethal injection of pentobarbital sodium (90 mg/kg, ip) 90 min after the beginning of their first meal. The 90 min fasting period allowed us to visualize brain activations only dependant on the 3g-calibrated meal. The thoracic cage was opened and rats were transcardially perfused via a 16 gauge needle placed in the left ventricle using 500 ml of saline followed by 1000 ml of 4% phosphate-buffered (PB, pH=7,4) paraformaldehyde and 0.2% picric acid (Sigma, St-Louis, MO) to improve neurotransmitter retention (17). Brains were removed and kept overnight in a 15% sucrose, PB solution for cryoprotection and then stored in a 30% sucrose, PB solution with sodium azide (to prevent bacterial contamination).

Immunohistochemical staining : Brains were frozen (-40°C), sectioned at 20µm in a cryostat at -24°C (Leica, Germany), and floating sections were collected in PB in serially ordered sets. For each rat, one serie was collected in the hypothalamus and two in the brainstem (identified with Paxinos and Watson stereotaxic atlas). In the brainstem, sections were collected from -14.5 to -13.3 mm from Bregma (12 sections), corresponding to the NTS's common part with the area postrema (AP). In the hypothalamic area, sections were collected from -4.5 to -2.1 mm from Bregma (24 sections), covering the entire arcuate nucleus (ARC). Each complete set of sections was processed for double labelling immunohistochemistry using the ABC complex/DAB method for c-Fos staining and the ABC complex/SG method for neuronal phenotype staining. Briefly, sections were mounted on slides, drying overnight and frozen (-20°C). After moisturizing in PBS, slices were incubated for 60 minutes at room temperature in 2% bovine serum albumine (BSA), 0,5% Triton X-100 in PBS (PBS-BSA). After appropriate washing in PBS (as for after each incubation), sections were incubated for 24 hours with goat anti c-Fos antibody at room temperature (for antibodies specifications and dilution, see **Table 2**). Sections were placed for 3 hours at room temperature in a biotinylated secondary antibody (Vector laboratories, Burlingame, CA), diluted 1:200 in PBS-BSA. For quenching endogenous peroxidase, slides were treated with 1% H₂O₂ for 30 min and treated afterwards with Elite Vectastain ABC reagent (1h at room temperature) in order to enhance bound secondary antibody. Antibody complexes were then revealed by a 5-to-10-min diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB, Sigma) (with 0,01% H₂O₂) reaction until Fos-like brown-black staining appeared. Fos staining was followed by neuronal phenotype staining (dβH¹ or GLP-1 for brainstem sections and α-MSH for hypothalamic sections). Briefly, sections were washed and incubated in PBS-BSA during 60 min before 72h-incubation at 4°C in proper primary antibody serum at appropriate

¹ Dopamine-β-Hydroxylase (dβH) is an enzyme responsible for the conversion of dopamine into noradrenalin and therefore allowed us to identify noradrenalin/adrenalin neurons.

dilution in PBS-BSA (see Table 2). After incubation in biotinylated secondary antibody, staining was amplified with ABC reagent as described before, and complexes were revealed by a 10-to-15 min reaction with Elite Vectastain SG kit (Vector laboratories) until blue-grey cytoplasmic staining appeared. After being washed and dried overnight, sections were cleared in a 100% ethanol bath (2 min) followed by 2 baths of xylene (5 and 10 min respectively) and cover slipped with Depex (BDH). To control for staining variability between days, series contained matched sections from both experimental groups.

Staining quantitative analysis: The sections for analysis were magnified under a Zeiss computer-assisted microscope (Zeiss, Germany). Pictures were obtained and analyzed using imaging software (Axiovision v4.5, Zeiss, Germany). The total number of Fos-positive neurons in each section was determined, as was the total number of specific phenotype-positive neurons. Finally, double-labeled neurons were counted. Fos-positive neurons were counted when exhibiting dark-brown nuclei, and phenotype-positive neurons were counted when dark-blue/grey ring cytoplasm were clearly identified. The results of neuronal activation are presented as averaged results for each 200- μ m segment of the studied area (averaging two counted sections per rat per segment), except for GLP-1 staining where 400- μ m segments were used because of the limited number of neurons exhibiting GLP-1 expression.

Statistics

Results are expressed as means $\pm$ S.E.M (n=6-8 per group for all data). Differences between groups were determined by one-way ANOVA (Proc GLM, SAS version 6.11, Cary, NC, USA), testing a diet effect on global activation of the areas studied. If statistical differences were found, post hoc test (Tuckey) were carried out to identify specific parts of the areas that expressed different activation in response to the diets. A difference was considered significant when $P < 0.05$.

RESULTS

Yeast peptides snacks decreased dinner and daily energy intake in humans

17 volunteers, at 61.6 ± 2.6 kg (BMI = 21.8 ± 0.7) of weight and 31 ± 4 years of age participated in this study. During the yeast peptides period, subjects ate (including the energy of the snack) 933 ± 43 kcal during lunch, 1309 ± 97 kcal during dinner and in total 2668 ± 151 kcal per day, whereas during the soy period 936 ± 35 kcal were eaten at lunch, 1445 ± 78 kcal at dinner and 2906 ± 127 kcal per day. Therefore, introducing the yeast peptides snack reduced dinner intake by $10.3 \pm 3.9\%$ (paired *t*-test vs. 100%, $P < 0.01$) and daily intake by $7.6 \pm 2.8\%$ (paired *t*-test vs. 100%, $P < 0.01$), which represented 237 ± 124 kcal, but had no effect on lunch intake compared with the soy snack introduction. However, the VAS showed no difference with regards to any question asked at any time of the day between soy and yeast peptides periods.

Yeast peptides meals decreased daily energy intake and body weight gain in rats

Rats weighting 281.7 ± 3.6 g at d0 did not decrease their 3h or daily P14 energy intake until d7. From d7, each day showed a significant decrease in energy intake between P14-pepS and P14-pepL until the end of the experiment (**Fig 3**; mean values vs. the P14-pep group and the P14-pepS group respectively, from d7: $P < 0.001$, proc mixed repeating time). Therefore, from d7, cumulative energy intake is significantly lower for the P14-pepL group than for the P14-pepS group so that after 24d the P14-pepS group's intake is 13% greater than of P14-pepL (7341 ± 326 kJ vs. 8288 ± 194 kJ for the P14-pepL and the P14-pepS group respectively, $P < 0.05$ diet effect). Moreover, at the end of the experimental feeding period (d24), the P14-pepL fed rats exhibited a significantly slower body weight gain than P14-pepS fed rats (390.6 ± 11.8 g vs. 417.5 ± 3.3 g respectively, $P < 0.05$, diet effect).

Yeast peptides activates POMC neurons in the ARC in rats

In the arcuate nucleus (ARC), P14-pepS and P14-pepL rats did not exhibit different pattern of Fos activation (53.7 ± 2.3 and 48.5 ± 2.7 for P14-pepS and P14-pepL diets per section respectively). However, P14-pepL diet significantly increased number of double labelled c-Fos + α -MSH in ARC (**Fig 4 and 6A**; 8.2 ± 1.5 and 15.9 ± 1.3 for P14-pepS and P14-pepL diets per section respectively, diet effect $F[1,121]=15.59$, $P<0.0001$). Specifically, P14-pepL diet increase activation of POMC neurons into three segments of ARC (**Fig 5A**; for P14-pepL and P14-pepS diets respectively: 22.1 ± 3.3 vs. 10.0 ± 4.1 around -3.4mm , diet effect $F[1,10]=6.57$, $P<0.05$; 22.1 ± 4.9 vs. 4.0 ± 2.0 around -3.0mm , diet effect $F[1,10]=12.05$, $P<0.01$; 17.7 ± 5.6 vs. 1.9 ± 2.0 around -2.6mm , diet effect $F[1,9]=5.82$, $P<0.05$). Moreover P14-pepL diet increased number of ARC neurons expressing sufficient density of α -MSH to be detected by immunostaining (**Fig 4**; 14.1 ± 2.1 and 33.1 ± 2.6 for P14-pepS and P14-pepL diets per section respectively, diet effect $F[1,121]=29.99$, $P<0.0001$). This increase occurred in 6 segments studied (**Fig 5B**; for P14-pepL and P14-pepS diets respectively: 36.9 ± 8.5 vs. 13.5 ± 5.4 around -4.0mm , diet effect $F[1,8]=7.55$, $P<0.05$; 44.7 ± 9.7 vs. 12.8 ± 10.7 around -3.8mm , diet effect $F[1,10]=5.93$, $P<0.05$; 39.8 ± 8.4 vs. 15.6 ± 7.3 around -3.6mm , diet effect $F[1,10]=5.44$, $P<0.05$; 44.0 ± 6.3 vs. 19.2 ± 8.8 around -3.4mm , diet effect $F[1,10]=6.76$, $P<0.01$; 41.8 ± 9.7 vs. 7.5 ± 3.5 around -3.0mm , diet effect $F[1,10]=11.42$, $P<0.01$; 27.6 ± 7.9 vs. 3.4 ± 3.3 around -2.6mm , diet effect $F[1,9]=6.72$, $P<0.05$). P14-pepL diet also induced a decreased in non-POMC activated neurons within the ARC compared with P14-pepS diet (**Fig 4**; 49.1 ± 3.8 and 32.8 ± 2.4 for P14-pepS and P14-pepL diets per section respectively, diet effect $F[1,122]=14.20$, $P<0.001$), that was significant in three segments (**Fig 5C**; for P14-pepL and P14-pepS diets respectively: 21.2 ± 7.1 vs. 66.1 ± 23.5 around -3.4mm , diet effect $F[1,10]=7.35$, $P<0.05$; 26.4 ± 5.1 vs. 44.5 ± 5.1 around -3.0mm , diet effect $F[1,10]=5.53$, $P<0.05$; 29.8 ± 5.7 vs. 50.9 ± 6.5 around -2.8mm , diet effect $F[1,10]=4.90$, $P<0.05$).

230 ***Yeast peptide and NTS activation in rats***

231 In the nucleus of the solitary tract, P14-pepS diet induced a higher activation of Fos protein
232 expression compared with P14-pepL diet (102.4 ± 5.8 and 76.1 ± 3.7 for P14-pepS and P14-pepL
233 diets per section respectively, diet effect $F[1,87]=15.49$, $P<0.001$). Specifically, P14-pepS diet
234 increase number of Fos positive neurons into around -13.8mm (108.6 ± 13.6 vs. 72.8 ± 7.0 for
235 P14-pepL and P14-pepS diets, respectively; diet effect $F[1,14]=5.77$, $P<0.05$). However, the two
236 diets did not induce any different pattern of activation in noradrenergic/adrenergic neurons
237 neither in GLP-1 containing neurons (**Fig 6 B, C**).

DISCUSSION

The present study aimed to precise the anorectic effect of yeast protein-derived peptides (2). The results showed that diets containing yeast peptides induced a strong and lasting decrease in energy intake in rats as well as in humans. In addition, our study aimed at linking the behavioural anorectic effect of meals containing yeast peptides with specific neuronal pathways in brain areas traditionally involved in the regulation of energy intake and showed that yeast peptides induced a high activation of melanocortin neurons in the arcuate nucleus of the hypothalamus (ARC).

The anorectic effect of yeast peptides in rats as well as in humans was strong and lasted for a significant amount of days (at least 2 weeks). Decrease in food intake was averaging 10% of daily energy intake in both models (236 kcal par day in humans), which was important for such a small stimulus, since the soup used in the clinical study was 4-5% of the daily energy intake. Moreover, the repetitive property of this effect is quite unusual for anorectic agents whose effects usually tend to decrease after a few days (1,20) (21), and is therefore an interesting aspect for dealing with systemic weight gain. The anorectic effect of yeast peptides had two unusual parameters: (i) it appeared after several days of habituation but did not weaken for 2 weeks after habituation and (ii) the ingestion of yeast peptides did not alter the next meal energy intake but decreased the daily energy intake. There are striking similarities between the feeding behaviour induced by yeast peptides meals in rats and in humans. In both models, the yeast peptides are more potent than another protein source in reducing food intake. But, similarly to what happened in rats, subsequent meal intake was not reduced contrary to a daily intake and the anorectic effect of yeast peptides remained for two weeks after habituation. However, we did not test the acute consumption condition so we were not able to see if several days like in rats were necessary for this effect to happen. The pattern of our clinical study was quite representative and equal in sex

with an almost 1/1 sex ratio, people of different classes of aging and different working conditions (students, unemployed or professionals). Our analyses showed no difference regarding the satiating effect of yeast peptides on sex, age or working conditions, indicating that this effect is not modified by these parameters and is therefore not restricted to a specific category of people. The lack of difference observed in the visual analysis scale results between the two proteins tested points out the dissociation between actual feeding behaviour and hunger perception. This phenomenon has already been reported before (22).

Analysis of the activation of brain areas by yeast peptides allow to speculate on the putative mechanisms by which they efficiently induced satiety. The lack of effect of yeast peptides on subsequent meal intake correlates with the activation of brainstem neuronal pathways. The nucleus of the solitary tract (NTS), as main site of integration of information from the GI tract conveyed through the vagus nerve, is indeed involved in short term regulation of food intake. Within the NTS, yeast peptides did not further increase activation of noradrenergic/adrenergic neurons that are mandatory to CCK-induced anorexia (13), suggesting that CCK is presumably not involved in the higher yeast peptides-induced reduction in energy intake. Moreover, yeast peptides did not specifically activate brainstem GLP-1 neurons, known to be triggered by moderate signals of satiety (23) as well as nociceptive and aversive stimuli (24-26) and activated during installation of CTA (27). The lack of activation of the GLP-1 pathway by yeast peptides provides therefore further evidence that the reduction in energy intake is not related to non-physiological anorexia. These results are in line with previous one showing that the analysis of the behavioral satiety sequence of rats consuming standard or high yeast protein diets *ad libitum* did not acquire a conditioned taste aversion (2). On the other hand, yeast peptides increased the activation of the melanocortin pathway in the ARC. Neurons in this area are principally regulated by (i) circulating nutrients and/or hormones or (ii) other brain areas/neural pathways regulating

energy intake, like NPY/AgRP neurons in the ARC. The pattern of food intake induced by yeast peptides suggests a modulation of systems regulating long term homeostasis rather than short term food intake. Therefore, yeast peptides induced satiety could be mediated by a modulation in the release of hormones such as insulin and leptin, which can both directly activate POMC neurons in the ARC to decrease food intake (28,29). Moreover, our results showed that non-POMC neurons were significantly less activated by yeast peptides after habituation. Since arcuate neurons are mainly POMC or NPY (30), it could be hypothesized that NPY neurons are thus less activated after habituation to yeast peptides. The activation of POMC neurons we monitored could therefore originate in a decrease in NPY activity, occurring along with a decrease in tonic inhibitory action of NPY neurons on POMC neurons (28,31). Our results also showed a greater number of α -MSH expressing neurons in the ARC after habituation to yeast peptides diets.

The present result could mainly agree with the observation that the anorectic response to yeast peptides only appeared after habituation to this diet. Indeed, neurogenesis has been recently reported in hypothalamic cells *in vivo*, and in ARC neurons (32,33). The period of time required for the anorectic effect to appear (7 days) is consistent with what was reported for neurogenesis in more studied areas like the dorsal vagal complex (34). Further experiments would nevertheless be required to assess the possibility the yeast peptides induced proliferation of new POMC neurons in the ARC. Whatever the origin of the increased number of POMC neurons was, this result showed that the ARC contained more POMC neurons so that the ARC could be considered as more sensitive to stimuli after habituation. In line with this result, the time-related response to yeast peptides (at least 3 hours) could be the consequence of a post-ingestive activation of the ARC several hours after the ingestion of the meal, which was not monitored in this study. In order to further explain the mechanisms involved in yeast peptides induced satiety, additional studies, especially about the integrity of the peptides after digestion, regulation of circulating

hormones following ingestion of yeast peptides and/or other brain circuitries involved in regulation of food intake needs to be carried out. Nonetheless, the results shown in the present study identified a very original peptide mix, whose strong and lasting anorectic effect is very interesting.

Bibliography

1. Bensaid, A., Tome, 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.
2. Faipoux, R., Tome, D., Bensaid, A., Morens, C., Oriol, E., Bonnanno, L. M. & Fromentin, G. (2006) Yeast proteins enhance satiety in rats. *J Nutr* 136: 2350-2356.
3. French, J., Wainwright, C., Booth, D. & Hamilton, J. (1992) Effects of meat species and particle size on postprandial satiety. *Proc Nutr Soc.* 51: 51-57.
4. Jean, C., Rome, S., Mathe, V., Huneau, J. F., Aattouri, N., Fromentin, G., Achagiotis, C. L. & Tome, D. (2001) Metabolic evidence for adaptation to a high protein diet in rats. *J Nutr* 131: 91-98.
5. Lacroix, M., Gaudichon, C., Martin, A., Morens, C., Mathe, V., Tome, D. & Huneau, J. F. (2004) A long-term high-protein diet markedly reduces adipose tissue without major side effects in Wistar male rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 287: R934-942.
6. Reid, M. & Hetherington, M. (1997) Relative effects of carbohydrates and protein on satiety -- a review of methodology. *Neurosci Biobehav Rev* 21: 295-308.
7. Anderson, G. H., Tecimer, S. N., Shah, D. & Zafar, T. A. (2004) Protein source, quantity, and time of consumption determine the effect of proteins on short-term food intake in young men. *J Nutr* 134: 3011-3015.
8. Borzoei, S., Neovius, M., Barkeling, B., Teixeira-Pinto, A. & Rossner, S. (2006) A comparison of effects of fish and beef protein on satiety in normal weight men. *Eur J Clin Nutr* 60: 897-902.
9. Hall, W. L., Millward, D. J., Long, S. J. & Morgan, L. M. (2003) Casein and whey exert different effects on plasma amino acid profiles, gastrointestinal hormone secretion and appetite. *Br J Nutr* 89: 239-248.
10. Uhe, A. M., Collier, G. R. & O'Dea, K. (1992) A comparison of the effects of beef, chicken and fish protein on satiety and amino acid profiles in lean male subjects. *J Nutr* 122: 467-472.
11. Turnbull, W. H., Walton, J. & Leeds, A. R. (1993) Acute effects of mycoprotein on subsequent energy intake and appetite variables. *Am J Clin Nutr* 58: 507-512.

12. Williamson, D. A., Geiselman, P. J., Lovejoy, J., Greenway, F., Volaufova, J., Martin, C. K., Arnett, C. & Ortego, L. (2006) Effects of consuming mycoprotein, tofu or chicken upon subsequent eating behaviour, hunger and satiety. *Appetite* 46: 41-48.
13. Rinaman, L. (2003) Hindbrain noradrenergic lesions attenuate anorexia and alter central cFos expression in rats after gastric viscerosensory stimulation. *J Neurosci* 23: 10084-10092.
14. Schwartz, M. W., Woods, S. C., Porte, D., Jr., Seeley, R. J. & Baskin, D. G. (2000) Central nervous system control of food intake. *Nature* 404: 661-671.
15. Bensaid, A., Tome, D., L'Heureux-Bourdon, 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.
16. 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.
17. Magoul, R., Onteniente, B., Benjelloun, W. & Tramu, G. (1993) Tachykinergic afferents to the rat arcuate nucleus. A combined immunohistochemical and retrograde tracing study. *Peptides* 14: 275-286.
18. L'Heureux-Bouron, D., Tome, D., Bensaid, 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.
19. Gietzen, D. W. & Rogers, Q. R. (2006) Nutritional homeostasis and indispensable amino acid sensing: a new solution to an old puzzle. *Trends Neurosci* 29: 91-99.
20. Long, S. J., Jeffcoat, A. R. & Millward, D. J. (2000) Effect of habitual dietary-protein intake on appetite and satiety. *Appetite* 35: 79-88.
21. Geliebter, A., Liang, J. T. & Van Itallie, T. B. (1984) Effects of repeated isocaloric macronutrient loads on daily food intake of rats. *Am J Physiol* 247: R387-392.
22. Doucet, E., St-Pierre, S., Almeras, N. & Tremblay, A. (2003) Relation between appetite ratings before and after a standard meal and estimates of daily energy intake in obese and reduced obese individuals. *Appetite* 40: 137-143.
23. Vrang, N., Phifer, C. B., Corkern, M. M. & Berthoud, H. R. (2003) Gastric distension induces c-Fos in medullary GLP-1/2-containing neurons. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 285: R470-478.
24. Grill, H. J., Carmody, J. S., Amanda Sadacca, L., Williams, D. L. & Kaplan, J. M. (2004) Attenuation of lipopolysaccharide anorexia by antagonism of caudal brain stem but not forebrain GLP-1-R. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 287: R1190-1193.

25. Rinaman, L. (1999) A functional role for central glucagon-like peptide-1 receptors in lithium chloride-induced anorexia. *Am J Physiol* 277: R1537-1540.
26. Thiele, T. E., Seeley, R. J., D'Alessio, D., Eng, J., Bernstein, I. L., Woods, S. C. & van Dijk, G. (1998) Central infusion of glucagon-like peptide-1-(7-36) amide (GLP-1) receptor antagonist attenuates lithium chloride-induced c-Fos induction in rat brainstem. *Brain Res* 801: 164-170.
27. Thiele, T. E., Van Dijk, G., Campfield, L. A., Smith, F. J., Burn, P., Woods, S. C., Bernstein, I. L. & Seeley, R. J. (1997) Central infusion of GLP-1, but not leptin, produces conditioned taste aversions in rats. *Am J Physiol* 272: R726-730.
28. Cowley, M. A., Smart, J. L., Rubinstein, M., Cerdan, M. G., Diano, S., Horvath, T. L., Cone, R. D. & Low, M. J. (2001) Leptin activates anorexigenic POMC neurons through a neural network in the arcuate nucleus. *Nature* 411: 480-484.
29. Elias, C. F., Aschkenasi, C., Lee, C., Kelly, J., Ahima, R. S., Bjorbaek, C., Flier, J. S., Saper, C. B. & Elmquist, J. K. (1999) Leptin differentially regulates NPY and POMC neurons projecting to the lateral hypothalamic area. *Neuron* 23: 775-786.
30. Bagnol, D., Lu, X. Y., Kaelin, C. B., Day, H. E., Ollmann, M., Gantz, I., Akil, H., Barsh, G. S. & Watson, S. J. (1999) Anatomy of an endogenous antagonist: relationship between Agouti-related protein and proopiomelanocortin in brain. *J Neurosci* 19: RC26.
31. Jobst, E. E., Enriori, P. J. & Cowley, M. A. (2004) The electrophysiology of feeding circuits. *Trends Endocrinol Metab* 15: 488-499.
32. Kokoeva, M. V., Yin, H. & Flier, J. S. (2005) Neurogenesis in the hypothalamus of adult mice: potential role in energy balance. *Science* 310: 679-683.
33. Pencea, V., Bingaman, K. D., Wiegand, S. J. & Luskin, M. B. (2001) Infusion of brain-derived neurotrophic factor into the lateral ventricle of the adult rat leads to new neurons in the parenchyma of the striatum, septum, thalamus, and hypothalamus. *J Neurosci* 21: 6706-6717.
34. Bauer, S., Hay, M., Amilhon, B., Jean, A. & Moyse, E. (2005) In vivo neurogenesis in the dorsal vagal complex of the adult rat brainstem. *Neuroscience* 130: 75-90.
35. 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.

Fig.1. Clinical study protocol: detail of one period.

The complete protocol is divided in two periods like the one described (one per soup tested).

Fig.2. Feeding pattern of rats with yeast peptides.

At d0, rats are separated in two groups: P14 (fed with P14 diet) and P14-pepL (fed with P14-pep meal then P14 diet). From d20, P14 group also received a daily P14-pep meal and is named P14-pepS group. Black days correspond to day with daily P14-pep meals.

Fig.3. Effects of yeast peptides on cumulative food intake.

Yeast peptides meals decrease daily food intake from d7 so that cumulative food intake is significantly lower from d7 to d24. *** $P < 0.001$

Fig.4. Activation of arcuate POMC or non-POMC neurons after acute or chronic yeast peptides meals.

Values are means $\pm$ SEM. ***: $P < 0.001$.

Fig.5. Number of double labelled Fos/ α -MSH (A), single labelled α -MSH (B) and non- α -MSH activated neurons (C) in the ARC after acute or chronic yeast peptides meals expressed through rostro-caudal level of the ARC.

Values are means $\pm$ SEM. *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$.

Fig. 6. Effect of yeast peptides meals on brainstem noradrenergic and GLP-1 and arcuate POMC neuronal activations.

469 A: Photomicrograph of the arcuate nucleus. Fos-labeled neurons (brown nuclei, x20) and double-
470 labeled Fos/ α -MSH neurons (brown nuclei and blue/grey cytoplasm). Zoom (x40) shows one
471 double-labeled neuron.

472 B: Photomicrograph of the rostral part of the NTS. Fos-labeled neurons (brown nuclei, x10) and
473 double-labeled Fos/d β H neurons (brown nuclei and blue/grey cytoplasm). Zoom (x40) shows one
474 neuron.

475 C: GLP-1 staining in the NTS (blue/grey cytoplasm, x20). Zoom (x40) shows one double-labeled
476 neuron.

477 Arrows: examples of double-labeled neurons.

478

479

Table 1*Composition of experimental diets. **

	P14	P14-pep
	<i>g/kg diet</i>	
Total milk protein ¹	140	-
Peptide yeast extract ²	-	107.7
Cornstarch ³	622.4	655
Sucrose ⁴	100.3	100.3
Metabolizable energy <i>kJ/g</i>	14.6	14.3
P/E (%)	14	14
G/E (%)	76	76
L/E (%)	10	10

[†] Amount of constant component (g/kg): soybean oil (Bailly SA, Aulnay-sous-bois, France): 40; AIN 93M mineral mix and AIN93V vitamin mix (ICN Biochemicals, Ohio, USA): 35 and 10 respectively [see (35) for composition]; cellulose (Medias filtrants Durieux, Torcy, France): 50; choline (ICN Biochemicals): 2.3. P/E, G/E, L/E: percentage of diet energy brought by protein, carbohydrates and lipids, respectively.

* ¹ Armor Protéines Saint Brieux, France; ² Bio Springer, Maisons-Alfort, France; ³ Cerestar, Haubourdin, France; ⁴ Eurosucre, Paris, France.

Table 2

Source and dilution of antibodies used *

Antibody	Dilution	Host	Source
c-fos (sc-52)	1:1000	Rabbit	Santa Cruz Biotechnology Inc, Santa Cruz CA
dβH (MAB308)	1:1000	Mouse	Chemicon Int, Temecula, CA
GLP-1 (T-4057)	1:1000	Rabbit	Peninsula Laboratories Inc, Belmont, CA
α-MSH (AB5087)	1:10000	Sheep	Chemicon Int, Temecula, CA

* α-MSH, α-Melanocortin Stimulating Hormone; GLP-1, Glucagon Like Peptide-1; dβH, dopamine-β-Hydroxylase.

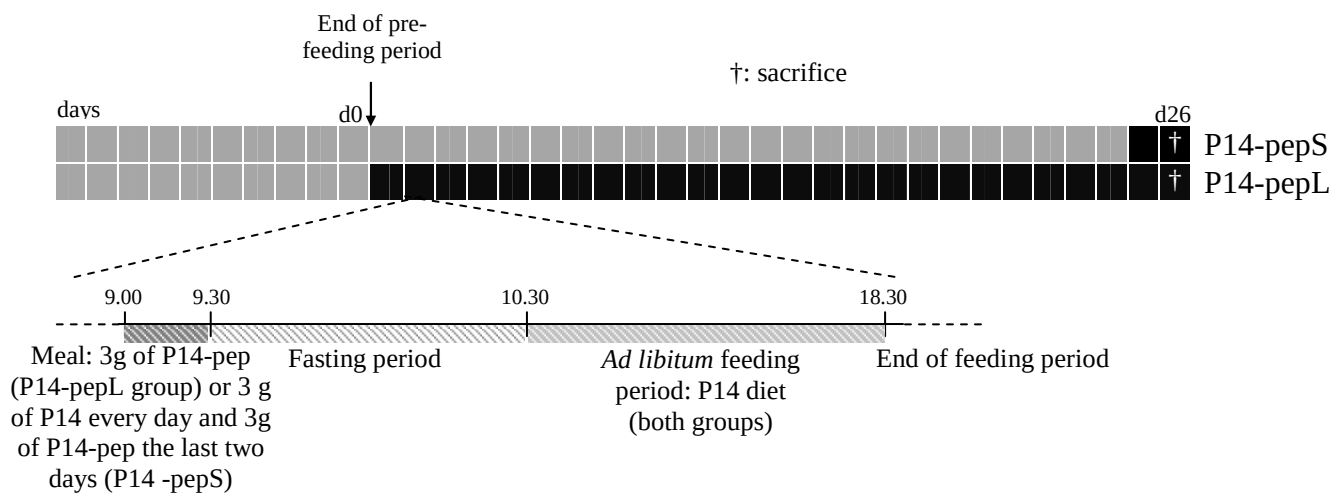


Figure 1

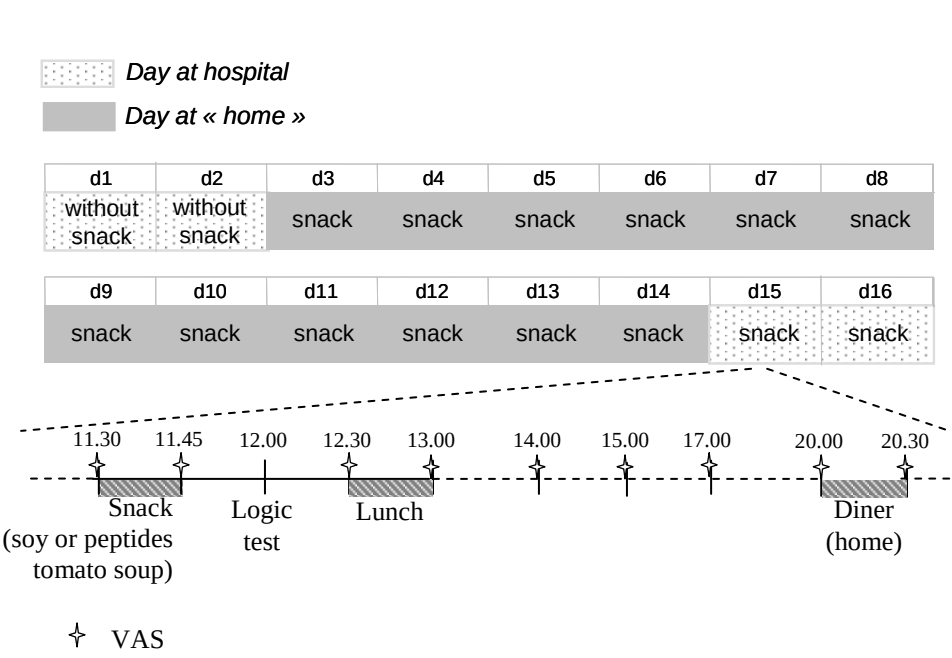


Figure 2

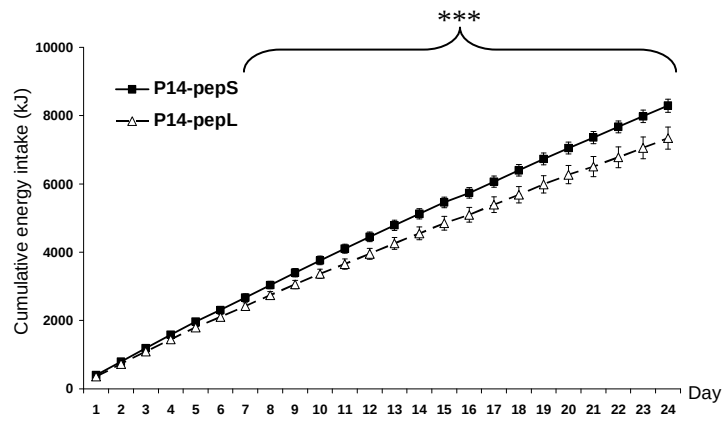


Figure 3

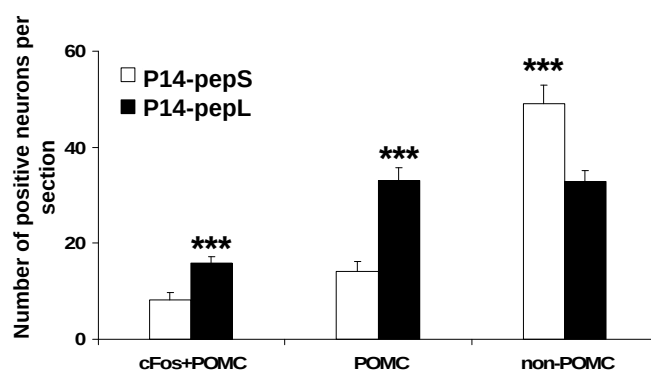


Figure 4

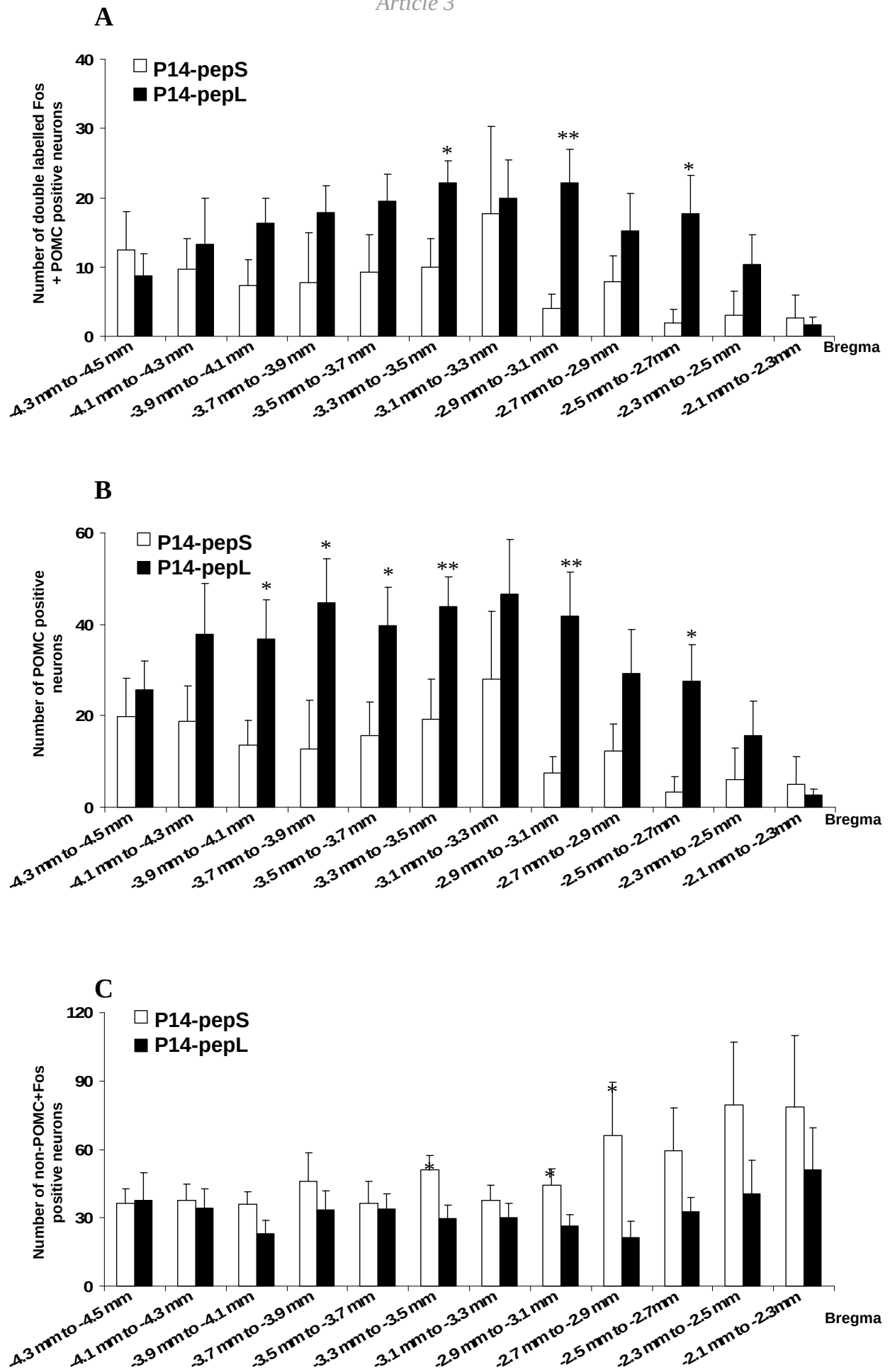


Figure 5

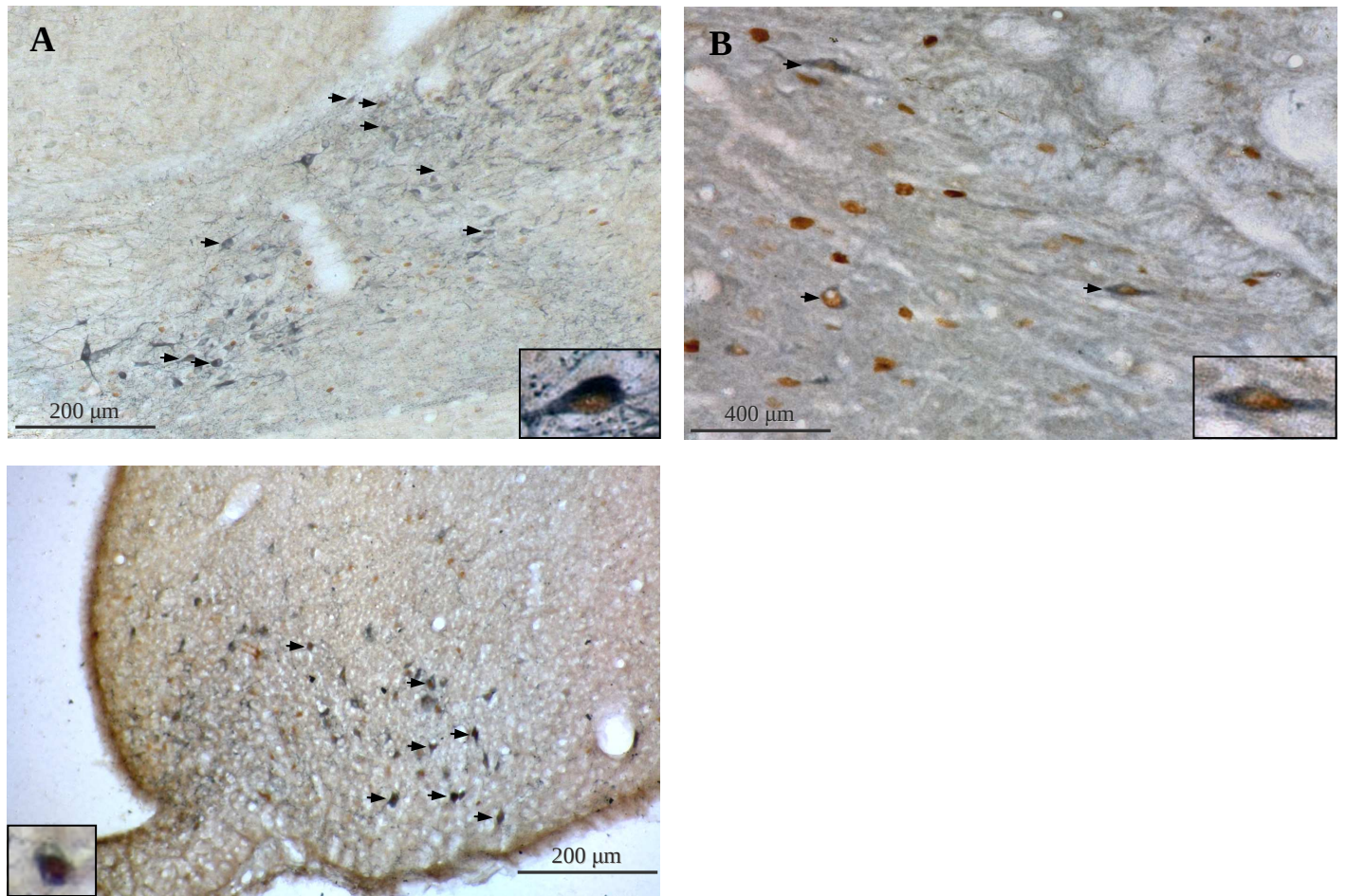


Figure 6

D CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

CONCLUSIONS.

L'objectif initial de ces travaux était d'étudier la satiété induite par les extraits protéiques et peptidiques de levure chez le rat et chez l'Homme. Dans le but d'étudier la signalisation centrale de ces peptides, nous avons tout d'abord étudié la signalisation centrale des protéines en général, pour nous intéresser ensuite au cas particulier des peptides de levure.

Nos principaux résultats concernant les régimes ou repas hyperprotéiques sont une augmentation conjointe de l'activité de différentes régions du système nerveux central (CNS) suite à l'ingestion de protéines (**Figure 41**). Parmi les régions étudiées, nous avons montré que le NTS ainsi que plusieurs noyaux de la région hypothalamique voient, à court terme comme après habituation, leur activité accrue par l'ingestion de protéines, en particulier certains réseaux de neurones comme les neurones noradrénergiques du NTS et les neurones mélanocortiques de l'ARC. En outre, les protéines inhiberaient l'activation de neurones GABAergiques et opioïdiques dans le noyau accumbens, et inhiberaient ainsi la prise alimentaire en diminuant la réponse hédonique à l'alimentation, vraisemblablement en raison de leur faible palatabilité. Enfin, nous avons montré que les protéines ne semblent pas utiliser le cortex pyriforme antérieur, région pourtant connue pour détecter les carences en acides aminés indispensables (AAI), comme point d'entrée dans le CNS puisque la lésion de cette région ne modifie pas le comportement des animaux sous régime hyperprotéique. Par ailleurs, ces régimes ne provoquent aucune activation particulière de cette région, selon les marqueurs que nous avons choisi (c-fos, transporteur au glutamate EAAC1) contrairement à un régime carencé en AAI.

Concernant les protéines et les peptides de levure, nous avons montré que cet effet satiétogène est particulièrement important comparativement aux autres protéines testées (lait, soja, gluten). Dans le cas des peptides de levure, l'installation de cet effet nécessite une période d'habituation de quelques jours mais ne s'estompe pas après habituation (21 jours). Leur ingestion ne régule pas la prise alimentaire lors du repas suivant mais à l'échelle de la journée. Au niveau central, ces caractéristiques particulières sont cohérentes avec les activations observées : absence d'activation du noyau du tractus solitaire (NTS, régulation de la prise alimentaire à court terme), mais augmentation de l'activation des neurones mélanocortiques du noyau arqué de l'hypothalamus (ARC, régulation de l'homéostasie énergétique à moyen terme), dont l'activation est associée à une réponse anorexigène, après habituation et augmentation conjointe de la sensibilité de cette région au stimuli anorexigène (**Figure 42**). En

raison de différences comportementales et d'activation centrale, les protéines et les peptides de levure, malgré un effet semblable en intensité sur la prise alimentaire, semblent avoir des mécanismes totalement distincts.

PERSPECTIVES.

Signalisation des protéines au niveau central.

Nos études ont montré que les protéines activaient dans le NTS les neurones noradrénergiques. Cependant, une simple mesure d'activation ne rend pas compte du caractère indispensable de cette région dans la régulation du comportement alimentaire induit par les protéines. Il serait donc très intéressant d'étudier plus en profondeur l'implication des neurones noradrénergiques dans la satiété induite par les protéines. Pour cela, plusieurs points doivent être élucidés.

Tout d'abord les projections exactes de ces neurones demeurent inconnues. Elles peuvent être grossièrement séparées en deux : celles dirigées vers le PVH et les autres. Notre étude n'a pas discriminé quelle partie est plus activée par les protéines. Il serait donc judicieux de regarder, dans le cas d'une lésion rétrograde des neurones noradrénergiques depuis le PVH [comme dans l'expérience de Ritter (Ritter *et al.*, 2001)] si les repas hyperprotéiques possèdent toujours leur pouvoir satiétogène, et si les neurones noradrénergiques restant dans le NTS (qui sont responsable de l'effet anorexigène de la CCK) sont plus activés.

Dans le même esprit, les expériences de vagotomie menées précédemment n'ont pas montré d'implication indispensable du nerf vague dans la satiété des protéines (L'Heureux-Bouron *et al.*, 2003). Pourtant, la CCK semble bien liée à cette satiété, puisque l'injection d'inhibiteur au récepteur à la CCK supprime l'effet satiétogène des protéines (Reidelberger *et al.*, 2004). Il serait donc judicieux de combiner vagotomie et blocage du récepteur à la CCK et de comparer, avec des enregistrements de prise alimentaire, le comportement des animaux. Si la CCK est impliqué au niveau central, il ne devrait pas y avoir de différence de comportement entre des animaux vagotomisés et bloqués pour la CCK au niveau central, et des animaux intacts mais simplement bloqués pour la CCK au niveau central. Si la CCK est impliquée au niveau vagal, mais qu'elle prend le relais par voie humorale au niveau central, il est vraisemblable que les animaux vagotomisés réduisent leur prise alimentaire un peu plus tard que les animaux intacts.

Concernant les autres régions, des études plus approfondies du rôle des protéines sur la région hypothalamique doivent être entreprises, en particulier sur la modulation des hormones et peptides gastro-intestinaux suivant l'ingestion d'un repas hyperprotéique. En outre, le rôle de l'hypothalamus latéral, comme relais entre la régulation hédonique et physiologique de la prise alimentaire, devrait être étudié.

Perspectives d'utilisation des peptides de levure.

Les peptides de levure présentent donc des propriétés satiétogènes très intéressantes dans l'optique de la commercialisation d'un produit fini. Cependant, les études cliniques ont montré certaines limites dans l'utilisation des peptides. Le protocole utilisé, pour lequel les doses de peptides ont été extrapolées à partir des quantités nécessaires pour obtenir un effet significatif chez le rat, employait les peptides dans un en-cas placé une heure avant le déjeuner. Afin de ne pas donner un en-cas trop important et donc difficile à consommer quotidiennement, l'énergie de la charge utilisée était très faible (120kcal) par rapport aux en-cas utilisés dans la littérature pour obtenir un effet satiétogène (>250 kcal) (Anderson *et al.*, 2004). De ce fait, la régulation énergétique quotidienne n'était pas significativement différente avec ou sans en-cas, tout en étant significativement plus faible qu'avec l'autre en-cas protéique (de soja) testé. Ce résultat laisse penser que le protocole utilisé n'est pas le plus efficace pour valoriser l'effet satiétogène des peptides de levure. Pour cela, il serait plus efficace d'introduire les peptides de levure dans un repas (en les formulant dans une sauce par exemple). Ingérer les peptides de levure dans un en-cas avant un repas n'a en effet pas vraiment d'intérêt puisque la baisse de la prise alimentaire met plusieurs heures à intervenir. En outre, l'énergie ingérée serait alors plus comparable entre des groupes sans ou avec peptides de levure. Cette idée peut être généralisée à tous les repas, en introduisant une dose plus faible de peptides de levure, mais répétée lors des différents repas de la journée, ce qui permettrait peut-être d'obtenir un effet encore plus important.

Au niveau mécanistique, certains points demeurent mal connus, en particulier la séquence exacte et la teneur des différents peptides contenus dans l'extrait que nous avons utilisé. Ce séquençage précis devra être réalisé et l'effet satiétogène du ou des peptides majoritaires testé. Si l'effet satiétogène des peptides de levure est un effet peptidique, comme les résultats que nous avons obtenus le suggèrent, il serait ainsi possible de vérifier que le (ou les) peptide(s) actif(s) demeure(nt) intact(s) après l'absorption intestinale. Concernant les

modalités d'activation du noyau arqué par les peptides de levure, la question centrale qui reste à explorer est le phénomène de plasticité que nous avons observé. Il serait particulièrement intéressant de savoir s'il s'agit ou non de neurogénèse et de voir quels facteurs au sein de l'extrait peptidique de levure provoquent ce phénomène.

BIBLIOGRAPHIE

1. **Acuna-Goycolea, C. and A. N. van den Pol** (2005). "Peptide YY(3-36) inhibits both anorexigenic proopiomelanocortin and orexigenic neuropeptide Y neurons: implications for hypothalamic regulation of energy homeostasis." *J Neurosci.* 25(45): 10510-9.
2. **Air, E. L., S. C. Benoit, K. A. Blake Smith et al.** (2002a). "Acute third ventricular administration of insulin decreases food intake in two paradigms." *Pharmacol Biochem Behav.* 72(1-2): 423-9.
3. **Air, E. L., S. C. Benoit, D. J. Clegg et al.** (2002b). "Insulin and leptin combine additively to reduce food intake and body weight in rats." *Endocrinology.* 143(6): 2449-52.
4. **Aja, S., S. Sahandy, E. E. Ladenheim et al.** (2001). "Intracerebroventricular CART peptide reduces food intake and alters motor behavior at a hindbrain site." *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 281(6): R1862-7.
5. **Aja, S., S. Sisouvang, J. A. Barrett et al.** (2000). "Basolateral and central amygdaloid lesions leave aversion to dietary amino acid imbalance intact." *Physiol Behav.* 71(5): 533-41.
6. **Altschuler, S. M., X. M. Bao, D. Bieger et al.** (1989). "Viscerotopic representation of the upper alimentary tract in the rat: sensory ganglia and nuclei of the solitary and spinal trigeminal tracts." *J Comp Neurol.* 283(2): 248-68.
7. **Anand, B. K. and J. R. Brobeck** (1951). "Localization of a "feeding center" in the hypothalamus of the rat." *Proc Soc Exp Biol Med.* 77(2): 323-4.
8. **Anderson, G. H. and E. T. Li** (1987). "Protein and amino acids in the regulation of quantitative and qualitative aspects of food intake." *Int J Obes.* 11 Suppl 3: 97-108.
9. **Anderson, G. H., E. T. Li, S. P. Anthony et al.** (1994). "Dissociation between plasma and brain amino acid profiles and short-term food intake in the rat." *Am J Physiol.* 266(5 Pt 2): R1675-86.
10. **Anderson, G. H., S. N. Tecimer, D. Shah et al.** (2004). "Protein source, quantity, and time of consumption determine the effect of proteins on short-term food intake in young men." *J Nutr.* 134(11): 3011-5.
11. **Anderson, H. L., N. J. Benevenga and A. E. Harper** (1968). "Associations among food and protein intake, serine dehydratase, and plasma amino acids." *Am J Physiol.* 214(5): 1008-13.
12. **Appleyard, S. M., T. W. Bailey, M. W. Doyle et al.** (2005). "Proopiomelanocortin neurons in nucleus tractus solitarius are activated by visceral afferents: regulation by cholecystokinin and opioids." *J Neurosci.* 25(14): 3578-85.
13. **Araya, H., J. Hills, M. Alvina et al.** (2000). "Short-term satiety in preschool children: a comparison between high protein meal and a high complex carbohydrate meal." *Int J Food Sci Nutr.* 51(2): 119-24.
14. **Azzara, A. V., J. P. Sokolnicki and G. J. Schwartz** (2002). "Central melanocortin receptor agonist reduces spontaneous and scheduled meal size but does not augment duodenal preload-induced feeding inhibition." *Physiol Behav.* 77(2-3): 411-6.
15. **Azzout-Marniche, D., C. Gaudichon, C. Blouet et al.** (2007). "Liver glycconeogenesis: a pathway to cope with postprandial amino acid excess in high-protein fed rats?" *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 292(4): R1400-7.
16. **Bagdade, J. D., E. L. Bierman and D. Porte, Jr.** (1967). "The significance of basal insulin levels in the evaluation of the insulin response to glucose in diabetic and nondiabetic subjects." *J Clin Invest.* 46(10): 1549-57.
17. **Bagnol, D., X. Y. Lu, C. B. Kaelin et al.** (1999). "Anatomy of an endogenous antagonist: relationship between Agouti-related protein and proopiomelanocortin in brain." *J Neurosci.* 19(18): RC26.
18. **Bakshi, V. P. and A. E. Kelley** (1993). "Feeding induced by opioid stimulation of the ventral striatum: role of opiate receptor subtypes." *J Pharmacol Exp Ther.* 265(3): 1253-60.
19. **Baldo, B. A., K. M. Alsene, A. Negron et al.** (2005). "Hyperphagia induced by GABAA receptor-mediated inhibition of the nucleus accumbens shell: dependence on intact neural output from the central amygdaloid region." *Behav Neurosci.* 119(5): 1195-206.
20. **Baldo, B. A., K. Sadeghian, A. M. Basso et al.** (2002). "Effects of selective dopamine D1 or D2 receptor blockade within nucleus accumbens subregions on ingestive behavior and associated motor activity." *Behav Brain Res.* 137(1-2): 165-77.

21. **Ballantyne, G. H.** (2006). "Peptide YY(1-36) and peptide YY(3-36): Part I. Distribution, release and actions." *Obes Surg.* 16(5): 651-8.
22. **Balthasar, N., R. Coppari, J. McMinin et al.** (2004). "Leptin receptor signaling in POMC neurons is required for normal body weight homeostasis." *Neuron.* 42(6): 983-91.
23. **Balthasar, N., L. T. Dalgaard, C. E. Lee et al.** (2005). "Divergence of melanocortin pathways in the control of food intake and energy expenditure." *Cell.* 123(3): 493-505.
24. **Banks, W. A.** (2004). "The many lives of leptin." *Peptides.* 25(3): 331-8.
25. **Banks, W. A., M. Tschop, S. M. Robinson et al.** (2002). "Extent and direction of ghrelin transport across the blood-brain barrier is determined by its unique primary structure." *J Pharmacol Exp Ther.* 302(2): 822-7.
26. **Barkeling, B., S. Rossner and H. Bjorvell** (1990). "Effects of a high-protein meal (meat) and a high-carbohydrate meal (vegetarian) on satiety measured by automated computerized monitoring of subsequent food intake, motivation to eat and food preferences." *Int J Obes.* 14(9): 743-51.
27. **Baskin, D. G., J. F. Breininger and M. W. Schwartz** (1999). "Leptin receptor mRNA identifies a subpopulation of neuropeptide Y neurons activated by fasting in rat hypothalamus." *Diabetes.* 48(4): 828-33.
28. **Bassareo, V., M. A. De Luca and G. Di Chiara** (2002). "Differential Expression of Motivational Stimulus Properties by Dopamine in Nucleus Accumbens Shell versus Core and Prefrontal Cortex." *J Neurosci.* 22(11): 4709-19.
29. **Batterham, R. L., M. A. Cowley, C. J. Small et al.** (2002). "Gut hormone PYY(3-36) physiologically inhibits food intake." *Nature.* 418(6898): 650-4.
30. **Bauer, S., M. Hay, B. Amilhon et al.** (2005). "In vivo neurogenesis in the dorsal vagal complex of the adult rat brainstem." *Neuroscience.* 130(1): 75-90.
31. **Becker, E. E. and H. R. Kissileff** (1974). "Inhibitory controls of feeding by the ventromedial hypothalamus." *Am J Physiol.* 226(2): 383-96.
32. **Bellinger, L. L., J. F. Evans and D. W. Gietzen** (1998). "Dorsomedial hypothalamic lesions alter intake of an imbalanced amino acid diet in rats." *J Nutr.* 128(7): 1213-7.
33. **Bellinger, L. L., J. F. Evans, C. M. Tillberg et al.** (1999). "Effects of dorsomedial hypothalamic nuclei lesions on intake of an imbalanced amino acid diet." *Am J Physiol.* 277(1 Pt 2): R250-62.
34. **Benoit, S. C., E. L. Air, L. M. Coolen et al.** (2002). "The catabolic action of insulin in the brain is mediated by melanocortins." *J Neurosci.* 22(20): 9048-52.
35. **Bensaid, A., D. Tome, D. Gietzen et al.** (2002). "Protein is more potent than carbohydrate for reducing appetite in rats." *Physiol Behav.* 75(4): 577-82.
36. **Bensaid, A., D. Tome, D. L'Heureux-Bourdon et al.** (2003). "A high-protein diet enhances satiety without conditioned taste aversion in the rat." *Physiol Behav.* 78(2): 311-20.
37. **Berridge, K. C.** (1996). "Food reward: brain substrates of wanting and liking." *Neurosci Biobehav Rev.* 20(1): 1-25.
38. **Berridge, K. C.** (2003). "Pleasures of the brain." *Brain Cogn.* 52(1): 106-28.
39. **Berridge, K. C. and T. E. Robinson** (1998). "What is the role of dopamine in reward: hedonic impact, reward learning, or incentive salience?" *Brain Res Brain Res Rev.* 28(3): 309-69.
40. **Berridge, K. C. and T. E. Robinson** (2003). "Parsing reward." *Trends Neurosci.* 26(9): 507-13.
41. **Berthoud, H. R.** (2002). "Multiple neural systems controlling food intake and body weight." *Neurosci Biobehav Rev.* 26(4): 393-428.
42. **Berthoud, H. R.** (2004a). "Mind versus metabolism in the control of food intake and energy balance." *Physiol Behav.* 81(5): 781-93.
43. **Berthoud, H. R.** (2004b). "Neural control of appetite: cross-talk between homeostatic and non-homeostatic systems." *Appetite.* 43(3): 315-7.
44. **Berthoud, H. R., N. R. Carlson and T. L. Powley** (1991). "Topography of efferent vagal innervation of the rat gastrointestinal tract." *Am J Physiol.* 260(1 Pt 2): R200-7.
45. **Berthoud, H. R. and L. M. Patterson** (1996). "Anatomical relationship between vagal afferent fibers and CCK-immunoreactive entero-endocrine cells in the rat small intestinal mucosa." *Acta Anat (Basel).* 156(2): 123-31.

46. **Berthoud, H. R. and T. L. Powley** (1992). "Vagal afferent innervation of the rat fundic stomach: morphological characterization of the gastric tension receptor." *J Comp Neurol.* 319(2): 261-76.
47. **Bertile, F. and T. Raclot** (2006). "The melanocortin system during fasting." *Peptides.* 27(2): 291-300.
48. **Beverly, J. L., D. W. Gietzen and Q. R. Rogers** (1990). "Effect of dietary limiting amino acid in prepyriform cortex on food intake." *Am J Physiol.* 259(4 Pt 2): R709-15.
49. **Bittencourt, J. C., F. Presse, C. Arias et al.** (1992). "The melanin-concentrating hormone system of the rat brain: an immuno- and hybridization histochemical characterization." *J Comp Neurol.* 319(2): 218-45.
50. **Blevins, J. E., K. D. Dixon, E. J. Hernandez et al.** (2000). "Effects of threonine injections in the lateral hypothalamus on intake of amino acid imbalanced diets in rats." *Brain Res.* 879(1-2): 65-72.
51. **Blom, W. A., A. Lluch, A. Stafleu et al.** (2006). "Effect of a high-protein breakfast on the postprandial ghrelin response." *Am J Clin Nutr.* 83(2): 211-20.
52. **Blundell, J. E., P. J. Rogers and A. J. Hill** (1985). "Behavioural structure and mechanisms of anorexia: calibration of natural and abnormal inhibition of eating." *Brain Res Bull.* 15(4): 371-6.
53. **Boirie, Y., M. Dangin, P. Gachon et al.** (1997). "Slow and fast dietary proteins differently modulate postprandial protein accretion." *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94(26): 14930-5.
54. **Booth, D. A.** (1988). "Mechanisms from models--actual effects from real life: the zero-calorie drink-break option." *Appetite.* 11 Suppl 1: 94-102.
55. **Booth, D. A., A. Chase and A. T. Campbell** (1970). "Relative effectiveness of protein in the late stages of appetite suppression in man." *Physiol Behav.* 5(11): 1299-302.
56. **Booth, D. A. and P. C. Simson** (1971). "Food preferences acquired by association with variations in amino acid nutrition." *Q J Exp Psychol.* 23(1): 135-45.
57. **Booth, D. A. and L. Thibaut** (2000). "Macronutrients-specific hungers and satieties and their neural basis, learnt from pre- and postingestional effects of eating particular foodstuffs." in. ed. pp. 61-91. CRC Press LLC
58. **Borzoei, S., M. Neovius, B. Barkeling et al.** (2006). "A comparison of effects of fish and beef protein on satiety in normal weight men." *Eur J Clin Nutr.* 60(7): 897-902.
59. **Bouret, S. G., S. J. Draper and R. B. Simerly** (2004a). "Formation of projection pathways from the arcuate nucleus of the hypothalamus to hypothalamic regions implicated in the neural control of feeding behavior in mice." *J Neurosci.* 24(11): 2797-805.
60. **Bouret, S. G., S. J. Draper and R. B. Simerly** (2004b). "Trophic action of leptin on hypothalamic neurons that regulate feeding." *Science.* 304(5667): 108-10.
61. **Bouret, S. G. and R. B. Simerly** (2004). "Minireview: Leptin and development of hypothalamic feeding circuits." *Endocrinology.* 145(6): 2621-6.
62. **Bowen, J., M. Noakes and P. M. Clifton** (2006a). "Appetite regulatory hormone responses to various dietary proteins differ by body mass index status despite similar reductions in ad libitum energy intake." *J Clin Endocrinol Metab.* 91(8): 2913-9.
63. **Bowen, J., M. Noakes, C. Trener et al.** (2006b). "Energy intake, ghrelin, and cholecystokinin after different carbohydrate and protein preloads in overweight men." *J Clin Endocrinol Metab.* 91(4): 1477-83.
64. **Brobeck, J. R., J. Tepperman and C. N. H. Long** (1943). "Experimental hypothalamic hyperphagia in the albino rat." *Yale J Biol Med.* 15: 831-53.
65. **Broberger, C., L. De Lecea, J. G. Sutcliffe et al.** (1998a). "Hypocretin/orexin- and melanin-concentrating hormone-expressing cells form distinct populations in the rodent lateral hypothalamus: relationship to the neuropeptide Y and agouti gene-related protein systems." *J Comp Neurol.* 402(4): 460-74.
66. **Broberger, C., J. Johansen, C. Johansson et al.** (1998b). "The neuropeptide Y/agouti gene-related protein (AGRP) brain circuitry in normal, anorectic, and monosodium glutamate-treated mice." *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95(25): 15043-8.
67. **Broberger, C., M. Landry, H. Wong et al.** (1997). "Subtypes Y1 and Y2 of the neuropeptide Y receptor are respectively expressed in pro-opiomelanocortin- and neuropeptide-Y-containing neurons of the rat hypothalamic arcuate nucleus." *Neuroendocrinology.* 66(6): 393-408.

68. **Buraczewski, S., J. W. Porter, B. A. Rolls et al.** (1971). "The course of digestion of different food proteins in the rat. 2. The effect of feeding carbohydrate with proteins." *Br J Nutr.* 25(2): 299-306.
69. **Burdakov, D., S. M. Luckman and A. Verkhratsky** (2005). "Glucose-sensing neurons of the hypothalamus." *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 360(1464): 2227-35.
70. **Burton-Freeman, B., D. W. Gietzen and B. O. Schneeman** (1997). "Meal pattern analysis to investigate the satiating potential of fat, carbohydrate, and protein in rats." *Am J Physiol.* 273(6 Pt 2): R1916-22.
71. **Calbet, J. A. and D. A. MacLean** (1997). "Role of caloric content on gastric emptying in humans." *J Physiol.* 498 (Pt 2): 553-9.
72. **Campfield, L. A., F. J. Smith, Y. Guisez et al.** (1995). "Recombinant mouse OB protein: evidence for a peripheral signal linking adiposity and central neural networks." *Science.* 269(5223): 546-9.
73. **Chelikani, P. K., A. C. Haver and R. D. Reidelberger** (2005). "Intravenous infusion of glucagon-like peptide-1 potently inhibits food intake, sham feeding, and gastric emptying in rats." *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 288(6): R1695-706.
74. **Cheung, C. C., D. K. Clifton and R. A. Steiner** (1997). "Proopiomelanocortin neurons are direct targets for leptin in the hypothalamus." *Endocrinology.* 138(10): 4489-92.
75. **Choi, Y. H., N. Chang and G. H. Anderson** (1999). "An intragastric amino acid mixture influences extracellular amino acid profiles in the lateral hypothalamic area of freely moving rats." *Can J Physiol Pharmacol.* 77(11): 827-34.
76. **Choi, Y. H., N. Chang, P. J. Fletcher et al.** (2000). "Dietary protein content affects the profiles of extracellular amino acids in the medial preoptic area of freely moving rats." *Life Sci.* 66(12): 1105-18.
77. **Choi, Y. H., P. J. Fletcher and G. H. Anderson** (2001). "Extracellular amino acid profiles in the paraventricular nucleus of the rat hypothalamus are influenced by diet composition." *Brain Res.* 892(2): 320-8.
78. **Cone, R. D.** (1999). "The Central Melanocortin System and Energy Homeostasis." *Trends Endocrinol Metab.* 10(6): 211-216.
79. **Cone, R. D.** (2005). "Anatomy and regulation of the central melanocortin system." *Nat Neurosci.* 8(5): 571-8.
80. **Cone, R. D., M. A. Cowley, A. A. Butler et al.** (2001). "The arcuate nucleus as a conduit for diverse signals relevant to energy homeostasis." *Int J Obes Relat Metab Disord.* 25 Suppl 5: S63-7.
81. **Connolly, H. M., J. L. Crary, M. D. McGoon et al.** (1997). "Valvular heart disease associated with fenfluramine-phentermine." *N Engl J Med.* 337(9): 581-8.
82. **Cota, D., K. Proulx, K. A. Smith et al.** (2006). "Hypothalamic mTOR signaling regulates food intake." *Science.* 312(5775): 927-30.
83. **Cowley, M. A.** (2003). "Hypothalamic melanocortin neurons integrate signals of energy state." *Eur J Pharmacol.* 480(1-3): 3-11.
84. **Cowley, M. A., N. Pronchuk, W. Fan et al.** (1999). "Integration of NPY, AGRP, and melanocortin signals in the hypothalamic paraventricular nucleus: evidence of a cellular basis for the adipostat." *Neuron.* 24(1): 155-63.
85. **Cowley, M. A., J. L. Smart, M. Rubinstein et al.** (2001). "Leptin activates anorexigenic POMC neurons through a neural network in the arcuate nucleus." *Nature.* 411(6836): 480-4.
86. **Cowley, M. A., R. G. Smith, S. Diano et al.** (2003). "The distribution and mechanism of action of ghrelin in the CNS demonstrates a novel hypothalamic circuit regulating energy homeostasis." *Neuron.* 37(4): 649-61.
87. **Cunningham, E. T., Jr., M. C. Bohn and P. E. Sawchenko** (1990). "Organization of adrenergic inputs to the paraventricular and supraoptic nuclei of the hypothalamus in the rat." *J Comp Neurol.* 292(4): 651-67.
88. **Cunningham, E. T., Jr., R. R. Miselis and P. E. Sawchenko** (1994). "The relationship of efferent projections from the area postrema to vagal motor and brain stem catecholamine-containing cell groups: an axonal transport and immunohistochemical study in the rat." *Neuroscience.* 58(3): 635-48.
89. **Cunningham, E. T., Jr. and P. E. Sawchenko** (1988). "Anatomical specificity of noradrenergic inputs to the paraventricular and supraoptic nuclei of the rat hypothalamus." *J Comp Neurol.* 274(1): 60-76.

90. **Currie, P. J., N. Chang, S. Luo et al.** (1995). "Microdialysis as a tool to measure dietary and regional effects on the complete profile of extracellular amino acids in the hypothalamus of rats." *Life Sci.* 57(21): 1911-23.
91. **Darcel, N., G. Fromentin, H. E. Raybould et al.** (2005a). "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(6): 1486-90.
92. **Darcel, N. P., A. P. Liou, D. Tome et al.** (2005b). "Activation of vagal afferents in the rat duodenum by protein digests requires PepT1." *J Nutr.* 135(6): 1491-5.
93. **Date, Y., M. Kojima, H. Hosoda et al.** (2000). "Ghrelin, a novel growth hormone-releasing acylated peptide, is synthesized in a distinct endocrine cell type in the gastrointestinal tracts of rats and humans." *Endocrinology.* 141(11): 4255-61.
94. **Date, Y., N. Murakami, K. Toshinai et al.** (2002). "The role of the gastric afferent vagal nerve in ghrelin-induced feeding and growth hormone secretion in rats." *Gastroenterology.* 123(4): 1120-8.
95. **Date, Y., T. Shimbara, S. Koda et al.** (2006). "Peripheral ghrelin transmits orexigenic signals through the noradrenergic pathway from the hindbrain to the hypothalamus." *Cell Metab.* 4(4): 323-31.
96. **Date, Y., Y. Ueta, H. Yamashita et al.** (1999). "Orexins, orexigenic hypothalamic peptides, interact with autonomic, neuroendocrine and neuroregulatory systems." *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96(2): 748-53.
97. **Delgado, J. M. and B. K. Anand** (1953). "Increase of food intake induced by electrical stimulation of the lateral hypothalamus." *Am J Physiol.* 172(1): 162-8.
98. **Dimicco, J. A. and D. V. Zaretsky** (2007). "The dorsomedial hypothalamus: a new player in thermoregulation." *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 292(1): R47-63.
99. **Edwards, S. and R. Stevens** (1991). "Peripherally administered 5-hydroxytryptamine elicits the full behavioural sequence of satiety." *Physiol Behav.* 50(5): 1075-7.
100. **Eisen, S., J. D. Davis, E. Rauhofer et al.** (2001). "Gastric negative feedback produced by volume and nutrient during a meal in rats." *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 281(4): R1201-14.
101. **Elias, C. F., C. Aschkenasi, C. Lee et al.** (1999). "Leptin differentially regulates NPY and POMC neurons projecting to the lateral hypothalamic area." *Neuron.* 23(4): 775-86.
102. **Elias, C. F., C. Lee, J. Kelly et al.** (1998a). "Leptin activates hypothalamic CART neurons projecting to the spinal cord." *Neuron.* 21(6): 1375-85.
103. **Elias, C. F., C. B. Saper, E. Maratos-Flier et al.** (1998b). "Chemically defined projections linking the mediobasal hypothalamus and the lateral hypothalamic area." *J Comp Neurol.* 402(4): 442-59.
104. **Ellacott, K. L. and R. D. Cone** (2004). "The central melanocortin system and the integration of short- and long-term regulators of energy homeostasis." *Recent Prog Horm Res.* 59: 395-408.
105. **Ellacott, K. L. and R. D. Cone** (2006). "The role of the central melanocortin system in the regulation of food intake and energy homeostasis: lessons from mouse models." *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 361(1471): 1265-74.
106. **Ellacott, K. L., I. G. Halatchev and R. D. Cone** (2006a). "Characterization of leptin-responsive neurons in the caudal brainstem." *Endocrinology.* 147(7): 3190-5.
107. **Ellacott, K. L., I. G. Halatchev and R. D. Cone** (2006b). "Interactions between gut peptides and the central melanocortin system in the regulation of energy homeostasis." *Peptides.* 27(2): 340-9.
108. **Elmquist, J. K.** (2001). "Hypothalamic pathways underlying the endocrine, autonomic, and behavioral effects of leptin." *Physiol Behav.* 74(4-5): 703-8.
109. **Elmquist, J. K., R. S. Ahima, C. F. Elias et al.** (1998). "Leptin activates distinct projections from the dorsomedial and ventromedial hypothalamic nuclei." *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95(2): 741-6.
110. **Elmquist, J. K., R. Coppari, N. Balthasar et al.** (2005). "Identifying hypothalamic pathways controlling food intake, body weight, and glucose homeostasis." *J Comp Neurol.* 493(1): 63-71.
111. **Elmquist, J. K., C. F. Elias and C. B. Saper** (1999). "From lesions to leptin: hypothalamic control of food intake and body weight." *Neuron.* 22(2): 221-32.
112. **Emond, M., E. E. Ladenheim, G. J. Schwartz et al.** (2001a). "Leptin amplifies the feeding inhibition and neural activation arising from a gastric nutrient preload." *Physiol Behav.* 72(1-2): 123-8.

113. **Emond, M., G. J. Schwartz, E. E. Ladenheim et al.** (1999). "Central leptin modulates behavioral and neural responsivity to CCK." *Am J Physiol.* 276(5 Pt 2): R1545-9.
114. **Emond, M., G. J. Schwartz and T. H. Moran** (2001b). "Meal-related stimuli differentially induce c-Fos activation in the nucleus of the solitary tract." *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 280(5): R1315-21.
115. **Enriori, P. J., A. E. Evans, P. Sinnayah et al.** (2006). "Leptin resistance and obesity." *Obesity (Silver Spring)*. 14 Suppl 5: 254S-258S.
116. **Enriori, P. J., A. E. Evans, P. Sinnayah et al.** (2007). "Diet-induced obesity causes severe but reversible leptin resistance in arcuate melanocortin neurons." *Cell Metab.* 5(3): 181-94.
117. **Everitt, B. J., T. Hokfelt, L. Terenius et al.** (1984). "Differential co-existence of neuropeptide Y (NPY)-like immunoreactivity with catecholamines in the central nervous system of the rat." *Neuroscience.* 11(2): 443-62.
118. **Fan, W., K. L. Ellacott, I. G. Halatchev et al.** (2004). "Cholecystokinin-mediated suppression of feeding involves the brainstem melanocortin system." *Nat Neurosci.* 7(4): 335-6.
119. **FAO/WHO** (1990). "Report of a joint FAO/WHO/ Expert Consultation on protein quality evaluation." in. ed. F. a. A. O. o. t. U. Nations. Rome.
120. **Faulconbridge, L. F., H. J. Grill and J. M. Kaplan** (2005). "Distinct forebrain and caudal brainstem contributions to the neuropeptide Y mediation of ghrelin hyperphagia." *Diabetes.* 54(7): 1985-93.
121. **Fekete, C., G. Legradi, E. Mihaly et al.** (2000a). "alpha-Melanocyte-stimulating hormone is contained in nerve terminals innervating thyrotropin-releasing hormone-synthesizing neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus and prevents fasting-induced suppression of prothyrotropin-releasing hormone gene expression." *J Neurosci.* 20(4): 1550-8.
122. **Fekete, C., G. Legradi, E. Mihaly et al.** (2000b). "alpha-Melanocyte stimulating hormone prevents fasting-induced suppression of corticotropin-releasing hormone gene expression in the rat hypothalamic paraventricular nucleus." *Neurosci Lett.* 289(2): 152-6.
123. **Feurte, S., S. Nicolaidis and K. C. Berridge** (2000). "Conditioned taste aversion in rats for a threonine-deficient diet: demonstration by the taste reactivity test." *Physiol Behav.* 68(3): 423-9.
124. **Feurte, S., D. Tome, D. W. Gietzen et al.** (2002). "Feeding patterns and meal microstructure during development of a taste aversion to a threonine devoid diet." *Nutr Neurosci.* 5(4): 269-78.
125. **Fioramonti, X., S. Contie, Z. Song et al.** (2007). "Characterization of glucosensing neuron subpopulations in the arcuate nucleus: integration in neuropeptide Y and pro-opio melanocortin networks?" *Diabetes.* 56(5): 1219-27.
126. **Flynn, F. W. and H. J. Grill** (1983). "Insulin elicits ingestion in decerebrate rats." *Science.* 221(4606): 188-90.
127. **Frederich, R. C., A. Hamann, S. Anderson et al.** (1995). "Leptin levels reflect body lipid content in mice: evidence for diet-induced resistance to leptin action." *Nat Med.* 1(12): 1311-4.
128. **French, J., C. Wainwright, D. Booth et al.** (1992). "Effects of meat species and particle size on postprandial satiety." *Proc Nutr Soc.* 51: 51-7.
129. **Fromentin, G., S. Feurte and S. Nicolaidis** (1998). "Spatial cues are relevant for learned preference/aversion shifts due to amino-acid deficiencies." *Appetite.* 30(2): 223-34.
130. **Fromentin, G., S. Feurte, S. Nicolaidis et al.** (2000). "Parabrachial lesions disrupt responses of rats to amino acid devoid diets, to protein-free diets, but not to high-protein diets." *Physiol Behav.* 70(3-4): 381-9.
131. **Fromentin, G., D. W. Gietzen and S. Nicolaidis** (1997). "Aversion-preference patterns in amino acid- or protein-deficient rats: a comparison with previously reported responses to thiamin-deficient diets." *Br J Nutr.* 77(2): 299-314.
132. **Fromentin, G. and S. Nicolaidis** (1996). "Rebalancing essential amino acids intake by self-selection in the rat." *Br J Nutr.* 75(5): 669-82.
133. **Fulton, S., B. Woodside and P. Shizgal** (2000). "Modulation of brain reward circuitry by leptin." *Science.* 287(5450): 125-8.
134. **Geliebter, A. A.** (1979). "Effects of equicaloric loads of protein, fat, and carbohydrate on food intake in the rat and man." *Physiol Behav.* 22(2): 267-73.

135. **Gerstein, D. E., G. Woodward-Lopez, A. E. Evans et al.** (2004). "Clarifying concepts about macronutrients' effects on satiation and satiety." *J Am Diet Assoc.* 104(7): 1151-3.
136. **Ghamari-Langroudi, M., W. F. Colmers and R. D. Cone** (2005). "PYY3-36 inhibits the action potential firing activity of POMC neurons of arcuate nucleus through postsynaptic Y2 receptors." *Cell Metab.* 2(3): 191-9.
137. **Gibbs, J., R. C. Young and G. P. Smith** (1973a). "Cholecystokinin decreases food intake in rats." *J Comp Physiol Psychol.* 84(3): 488-95.
138. **Gibbs, J., R. C. Young and G. P. Smith** (1973b). "Cholecystokinin elicits satiety in rats with open gastric fistulas." *Nature.* 245(5424): 323-5.
139. **Gibson, E. L., C. J. Wainwright and D. A. Booth** (1995). "Disguised protein in lunch after low-protein breakfast conditions food-flavor preferences dependent on recent lack of protein intake." *Physiol Behav.* 58(2): 363-71.
140. **Gietzen, D. W.** (1993). "Neural mechanisms in the responses to amino acid deficiency." *J Nutr.* 123(4): 610-25.
141. **Gietzen, D. W.** (2000). "Amino acid recognition in the central nervous system." in *Neural and Metabolic Control of Macronutrient Intake.* ed. H. Berthoud and R. Seeley. pp. 339-57. New York. CRC Press
142. **Gietzen, D. W., L. F. Erecius and Q. R. Rogers** (1998). "Neurochemical changes after imbalanced diets suggest a brain circuit mediating anorectic responses to amino acid deficiency in rats." *J Nutr.* 128(4): 771-81.
143. **Gietzen, D. W., S. Hao and T. G. Anthony** (2007). "Mechanisms of Food Intake Repression in Indispensable Amino Acid Deficiency." *Annu Rev Nutr.*
144. **Gietzen, D. W., P. M. Leung, T. W. Castonguay et al.** (1986). "Time course of food intake and plasma and brain amino acid concentrations in rats fed amino acid-imbalanced or -deficient diets." in *Interactions of the Chemical Senses with Nutrition.* ed. M. Kare and J. Brand. pp. 415-59. Philadelphia, PA. Academic Press
145. **Gietzen, D. W. and Q. R. Rogers** (2006). "Nutritional homeostasis and indispensable amino acid sensing: a new solution to an old puzzle." *Trends Neurosci.* 29(2): 91-9.
146. **Gietzen, D. W., C. M. Ross, S. Hao et al.** (2004). "Phosphorylation of eIF2alpha is involved in the signaling of indispensable amino acid deficiency in the anterior piriform cortex of the brain in rats." *J Nutr.* 134(4): 717-23.
147. **Glatzle, J., M. E. Kreis, K. Kawano et al.** (2001). "Postprandial neuronal activation in the nucleus of the solitary tract is partly mediated by CCK-A receptors." *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 281(1): R222-9.
148. **Goke, R., P. J. Larsen, J. D. Mikkelsen et al.** (1995). "Distribution of GLP-1 binding sites in the rat brain: evidence that exendin-4 is a ligand of brain GLP-1 binding sites." *Eur J Neurosci.* 7(11): 2294-300.
149. **Gold, R. M.** (1973). "Hypothalamic obesity: the myth of the ventromedial nucleus." *Science.* 182(4111): 488-90.
150. **Gold, R. M., A. P. Jones and P. E. Sawchenko** (1977). "Paraventricular area: critical focus of a longitudinal neurocircuitry mediating food intake." *Physiol Behav.* 18(6): 1111-9.
151. **Gottfried, J. A., R. Deichmann, J. S. Winston et al.** (2002). "Functional heterogeneity in human olfactory cortex: an event-related functional magnetic resonance imaging study." *J Neurosci.* 22(24): 10819-28.
152. **Grigson, P. S., S. Reilly, T. Shimura et al.** (1998). "Ibotenic acid lesions of the parabrachial nucleus and conditioned taste aversion: further evidence for an associative deficit in rats." *Behav Neurosci.* 112(1): 160-71.
153. **Grigson, P. S., T. Shimura and R. Norgren** (1997). "Brainstem lesions and gustatory function: III. The role of the nucleus of the solitary tract and the parabrachial nucleus in retention of a conditioned taste aversion in rats." *Behav Neurosci.* 111(1): 180-7.
154. **Grill, H. J., J. S. Carmody, L. Amanda Sadacca et al.** (2004). "Attenuation of lipopolysaccharide anorexia by antagonism of caudal brain stem but not forebrain GLP-1-R." *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 287(5): R1190-3.

155. **Grill, H. J., A. B. Ginsberg, R. J. Seeley et al.** (1998). "Brainstem application of melanocortin receptor ligands produces long-lasting effects on feeding and body weight." *J Neurosci.* 18(23): 10128-35.
156. **Grill, H. J. and J. M. Kaplan** (1992). "Sham feeding in intact and chronic decerebrate rats." *Am J Physiol.* 262(6 Pt 2): R1070-4.
157. **Grill, H. J. and J. M. Kaplan** (2001). "Interoceptive and integrative contributions of forebrain and brainstem to energy balance control." *Int J Obes Relat Metab Disord.* 25 Suppl 5: S73-7.
158. **Grill, H. J. and J. M. Kaplan** (2002). "The neuroanatomical axis for control of energy balance." *Front Neuroendocrinol.* 23(1): 2-40.
159. **Grill, H. J. and G. P. Smith** (1988). "Cholecystokinin decreases sucrose intake in chronic decerebrate rats." *Am J Physiol.* 254(6 Pt 2): R853-6.
160. **Gropp, E., M. Shanabrough, E. Borok et al.** (2005). "Agouti-related peptide-expressing neurons are mandatory for feeding." *Nat Neurosci.* 8(10): 1289-91.
161. **Guan, X. M., H. Yu, O. C. Palyha et al.** (1997). "Distribution of mRNA encoding the growth hormone secretagogue receptor in brain and peripheral tissues." *Brain Res Mol Brain Res.* 48(1): 23-9.
162. **Haberly, L. B.** (2001). "Parallel-distributed processing in olfactory cortex: new insights from morphological and physiological analysis of neuronal circuitry." *Chem Senses.* 26(5): 551-76.
163. **Haberly, L. B. and J. L. Price** (1978). "Association and commissural fiber systems of the olfactory cortex of the rat. II. Systems originating in the olfactory peduncle." *J Comp Neurol.* 181(4): 781-807.
164. **Hakansson, M. L., H. Brown, N. Ghilardi et al.** (1998). "Leptin receptor immunoreactivity in chemically defined target neurons of the hypothalamus." *J Neurosci.* 18(1): 559-72.
165. **Halaas, J. L., K. S. Gajiwala, M. Maffei et al.** (1995). "Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene." *Science.* 269(5223): 543-6.
166. **Halatchev, I. G. and R. D. Cone** (2005). "Peripheral administration of PYY(3-36) produces conditioned taste aversion in mice." *Cell Metab.* 1(3): 159-68.
167. **Halatchev, I. G., K. L. Ellacott, W. Fan et al.** (2004). "Peptide YY3-36 inhibits food intake in mice through a melanocortin-4 receptor-independent mechanism." *Endocrinology.* 145(6): 2585-90.
168. **Hall, W. L., D. J. Millward, S. J. Long et al.** (2003). "Casein and whey exert different effects on plasma amino acid profiles, gastrointestinal hormone secretion and appetite." *Br J Nutr.* 89(2): 239-48.
169. **Hanada, R., M. Nakazato, S. Matsukura et al.** (2000). "Differential regulation of melanin-concentrating hormone and orexin genes in the agouti-related protein/melanocortin-4 receptor system." *Biochem Biophys Res Commun.* 268(1): 88-91.
170. **Hannah, J. S., A. K. Dubey and B. C. Hansen** (1990). "Postingestional effects of a high-protein diet on the regulation of food intake in monkeys." *Am J Clin Nutr.* 52(2): 320-5.
171. **Hao, S., J. W. Sharp, C. M. Ross-Inta et al.** (2005). "Uncharged tRNA and sensing of amino acid deficiency in mammalian piriform cortex." *Science.* 307(5716): 1776-8.
172. **Hara, Y. and V. M. Pickel** (2005). "Overlapping intracellular and differential synaptic distributions of dopamine D1 and glutamate N-methyl-D-aspartate receptors in rat nucleus accumbens." *J Comp Neurol.* 492(4): 442-55.
173. **Harper, A. E., N. J. Benevenga and R. M. Wohlhueter** (1970). "Effects of ingestion of disproportionate amounts of amino acids." *Physiol Rev.* 50(3): 428-558.
174. **Harper, A. E. and J. C. Peters** (1989). "Protein intake, brain amino acid and serotonin concentrations and protein self-selection." *J Nutr.* 119(5): 677-89.
175. **Heaney, R. P.** (1998). "Excess dietary protein may not adversely affect bone." *J Nutr.* 128(6): 1054-7.
176. **Heisler, L. K., M. A. Cowley, L. H. Tecott et al.** (2002). "Activation of central melanocortin pathways by fenfluramine." *Science.* 297(5581): 609-11.
177. **Heisler, L. K., E. E. Jobst, G. M. Sutton et al.** (2006). "Serotonin reciprocally regulates melanocortin neurons to modulate food intake." *Neuron.* 51(2): 239-49.
178. **Herbert, H., M. M. Moga and C. B. Saper** (1990). "Connections of the parabrachial nucleus with the nucleus of the solitary tract and the medullary reticular formation in the rat." *J Comp Neurol.* 293(4): 540-80.

179. **Hernandez, E. J., D. C. Whitcomb, S. R. Vigna et al.** (1994). "Saturable binding of circulating peptide YY in the dorsal vagal complex of rats." *Am J Physiol.* 266(3 Pt 1): G511-6.
180. **Herrero, M. C., N. Angles, X. Remesar et al.** (1994). "Splanchnic ammonia management in genetic and dietary obesity in the rat." *Int J Obes Relat Metab Disord.* 18(4): 255-61.
181. **Hill, J. O., H. Drougas and J. C. Peters** (1993). "Obesity treatment: can diet composition play a role?" *Ann Intern Med.* 119(7 Pt 2): 694-7.
182. **Horvath, T. L., I. Bechmann, F. Naftolin et al.** (1997). "Heterogeneity in the neuropeptide Y-containing neurons of the rat arcuate nucleus: GABAergic and non-GABAergic subpopulations." *Brain Res.* 756(1-2): 283-6.
183. **Hrupka, B. J., Y. M. Lin, D. W. Gietzen et al.** (1997). "Small changes in essential amino acid concentrations alter diet selection in amino acid-deficient rats." *J Nutr.* 127(5): 777-84.
184. **Hudson, B. and S. Ritter** (2004). "Hindbrain catecholamine neurons mediate consummatory responses to glucoprivation." *Physiol Behav.* 82(2-3): 241-50.
185. **Hunt, J. N. and D. F. Stubbs** (1975). "The volume and energy content of meals as determinants of gastric emptying." *J Physiol.* 245(1): 209-25.
186. **Huo, L., H. J. Grill and C. Bjorbaek** (2006). "Divergent regulation of proopiomelanocortin neurons by leptin in the nucleus of the solitary tract and in the arcuate hypothalamic nucleus." *Diabetes.* 55(3): 567-73.
187. **Ibrahim, N., M. A. Bosch, J. L. Smart et al.** (2003). "Hypothalamic proopiomelanocortin neurons are glucose responsive and express K(ATP) channels." *Endocrinology.* 144(4): 1331-40.
188. **Illig, K. R. and L. B. Haberly** (2003). "Odor-evoked activity is spatially distributed in piriform cortex." *J Comp Neurol.* 457(4): 361-73.
189. **Inglis, W. L. and K. Semba** (1997). "Discriminable excitotoxic effects of ibotenic acid, AMPA, NMDA and quinolinic acid in the rat laterodorsal tegmental nucleus." *Brain Res.* 755(1): 17-27.
190. **Ishii, Y., J. E. Blundell, J. C. Halford et al.** (2003). "Palatability, food intake and the behavioural satiety sequence in male rats." *Physiol Behav.* 80(1): 37-47.
191. **Ishii, Y., J. E. Blundell, J. C. Halford et al.** (2004). "Differential effects of the selective orexin-1 receptor antagonist SB-334867 and lithium chloride on the behavioural satiety sequence in rats." *Physiol Behav.* 81(1): 129-40.
192. **Jacobowitz, D. M. and T. L. O'Donohue** (1978). "alpha-Melanocyte stimulating hormone: immunohistochemical identification and mapping in neurons of rat brain." *Proc Natl Acad Sci U S A.* 75(12): 6300-4.
193. **Jarrard, L.** (1991). "Use of ibotenic acid to selectively lesion brain structures." in *Methods in Neurosciences Volume 7*, ed. pp. 58-70. Philadelphia, PA. Academic Press
194. **Jean, C., S. Rome, V. Mathe et al.** (2001). "Metabolic evidence for adaptation to a high protein diet in rats." *J Nutr.* 131(1): 91-8.
195. **Jeanningros, R.** (1982). "Vagal unitary responses to intestinal amino acid infusions in the anesthetized cat: a putative signal for protein induced satiety." *Physiol Behav.* 28(1): 9-21.
196. **Jia, H. G., Z. R. Rao and J. W. Shi** (1994). "An indirect projection from the nucleus of the solitary tract to the central nucleus of the amygdala via the parabrachial nucleus in the rat: a light and electron microscopic study." *Brain Res.* 663(2): 181-90.
197. **Jobst, E. E., P. J. Enriori and M. A. Cowley** (2004). "The electrophysiology of feeding circuits." *Trends Endocrinol Metab.* 15(10): 488-99.
198. **Johanson, C. E., R. L. Balster and K. Bonese** (1976). "Self-administration of psychomotor stimulant drugs: the effects of unlimited access." *Pharmacol Biochem Behav.* 4(1): 45-51.
199. **Johnson, D. M., K. R. Illig, M. Behan et al.** (2000). "New features of connectivity in piriform cortex visualized by intracellular injection of pyramidal cells suggest that "primary" olfactory cortex functions like "association" cortex in other sensory systems." *J Neurosci.* 20(18): 6974-82.
200. **Joseph, S. A., W. H. Pilcher and C. Bennett-Clarke** (1983). "Immunocytochemical localization of ACTH perikarya in nucleus tractus solitarius: evidence for a second opiocortin neuronal system." *Neurosci Lett.* 38(3): 221-5.
201. **Kalogeris, T. J., R. D. Reidelberger and V. E. Mendel** (1983). "Effect of nutrient density and composition of liquid meals on gastric emptying in feeding rats." *Am J Physiol.* 244(6): R865-71.

202. **Kaplan, J. M., R. J. Seeley and H. J. Grill** (1993). "Daily caloric intake in intact and chronic decerebrate rats." *Behav Neurosci.* 107(5): 876-81.
203. **Kaplan, J. M., A. C. Spector and H. J. Grill** (1992). "Dynamics of gastric emptying during and after stomach fill." *Am J Physiol.* 263(4 Pt 2): R813-9.
204. **Keire, D. A., P. Mannon, M. Kobayashi et al.** (2000). "Primary structures of PYY, [Pro(34)]PYY, and PYY-(3-36) confer different conformations and receptor selectivity." *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 279(1): G126-31.
205. **Kelley, A. E.** (2004). "Ventral striatal control of appetitive motivation: role in ingestive behavior and reward-related learning." *Neurosci Biobehav Rev.* 27(8): 765-76.
206. **Kelley, A. E., V. P. Bakshi, S. N. Haber et al.** (2002). "Opioid modulation of taste hedonics within the ventral striatum." *Physiol Behav.* 76(3): 365-77.
207. **Kelley, A. E. and K. C. Berridge** (2002). "The neuroscience of natural rewards: relevance to addictive drugs." *J Neurosci.* 22(9): 3306-11.
208. **Kieffer, T. J. and J. F. Habener** (1999). "The glucagon-like peptides." *Endocr Rev.* 20(6): 876-913.
209. **Kim, E. M., J. G. Quinn, A. S. Levine et al.** (2004). "A bi-directional mu-opioid-opioid connection between the nucleus of the accumbens shell and the central nucleus of the amygdala in the rat." *Brain Res.* 1029(1): 135-9.
210. **King, B. M.** (2006). "The rise, fall, and resurrection of the ventromedial hypothalamus in the regulation of feeding behavior and body weight." *Physiol Behav.* 87(2): 221-44.
211. **Kinzig, K. P., D. A. D'Alessio, J. P. Herman et al.** (2003). "CNS glucagon-like peptide-1 receptors mediate endocrine and anxiety responses to interoceptive and psychogenic stressors." *J Neurosci.* 23(15): 6163-70.
212. **Kinzig, K. P., D. A. D'Alessio and R. J. Seeley** (2002). "The diverse roles of specific GLP-1 receptors in the control of food intake and the response to visceral illness." *J Neurosci.* 22(23): 10470-6.
213. **Kirouac, G. J. and P. K. Ganguly** (1995). "Topographical organization in the nucleus accumbens of afferents from the basolateral amygdala and efferents to the lateral hypothalamus." *Neuroscience.* 67(3): 625-30.
214. **Kishi, T., C. J. Aschkenasi, C. E. Lee et al.** (2003). "Expression of melanocortin 4 receptor mRNA in the central nervous system of the rat." *J Comp Neurol.* 457(3): 213-35.
215. **Kiyatkin, E. A.** (2002). "Dopamine in the nucleus accumbens: cellular actions, drug- and behavior-associated fluctuations, and a possible role in an organism's adaptive activity." *Behav Brain Res.* 137(1-2): 27-46.
216. **Koda, S., Y. Date, N. Murakami et al.** (2005). "The role of the vagal nerve in peripheral PYY3-36-induced feeding reduction in rats." *Endocrinology.* 146(5): 2369-75.
217. **Koehnle, T. J., M. C. Russell and D. W. Gietzen** (2003). "Rats rapidly reject diets deficient in essential amino acids." *J Nutr.* 133(7): 2331-5.
218. **Koehnle, T. J., M. C. Russell, A. S. Morin et al.** (2004). "Diets deficient in indispensable amino acids rapidly decrease the concentration of the limiting amino acid in the anterior piriform cortex of rats." *J Nutr.* 134(9): 2365-71.
219. **Kojima, M., H. Hosoda, Y. Date et al.** (1999). "Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach." *Nature.* 402(6762): 656-60.
220. **Kokoeva, M. V., H. Yin and J. S. Flier** (2005). "Neurogenesis in the hypothalamus of adult mice: potential role in energy balance." *Science.* 310(5748): 679-83.
221. **Krebs, M., A. Brehm, M. Krssak et al.** (2003). "Direct and indirect effects of amino acids on hepatic glucose metabolism in humans." *Diabetologia.* 46(7): 917-25.
222. **Kreymann, B., G. Williams, M. A. Ghatei et al.** (1987). "Glucagon-like peptide-1 7-36: a physiological incretin in man." *Lancet.* 2(8571): 1300-4.
223. **Kristensen, P., M. E. Judge, L. Thim et al.** (1998). "Hypothalamic CART is a new anorectic peptide regulated by leptin." *Nature.* 393(6680): 72-6.
224. **L'Heureux-Bouron, D., D. Tome, A. Bensaid et al.** (2004a). "A very high 70%-protein diet does not induce conditioned taste aversion in rats." *J Nutr.* 134(6): 1512-5.

225. **L'Heureux-Bouron, D., D. Tome, A. Bensaid et al.** (2004b). "Preabsorptive factors are not the main determinants of intake depression induced by a high-protein diet in the rat." *Physiol Behav.* 81(3): 499-504.
226. **L'Heureux-Bouron, D., D. Tome, O. Rampin et al.** (2003). "Total subdiaphragmatic vagotomy does not suppress high protein diet-induced food intake depression in rats." *J Nutr.* 133(8): 2639-42.
227. **Lal, S., J. McLaughlin, J. Barlow et al.** (2004). "Cholecystokinin pathways modulate sensations induced by gastric distension in humans." *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 287(1): G72-9.
228. **Lam, T. K., G. J. Schwartz and L. Rossetti** (2005). "Hypothalamic sensing of fatty acids." *Nat Neurosci.* 8(5): 579-84.
229. **Landsberg, L., M. E. Saville and J. B. Young** (1984). "Sympathoadrenal system and regulation of thermogenesis." *Am J Physiol.* 247(2 Pt 1): E181-9.
230. **Lang, V., F. Bellisle, J. M. Oppert et al.** (1998). "Satiating effect of proteins in healthy subjects: a comparison of egg albumin, casein, gelatin, soy protein, pea protein, and wheat gluten." *Am J Clin Nutr.* 67(6): 1197-204.
231. **Larsen, P. J., M. Tang-Christensen, J. J. Holst et al.** (1997). "Distribution of glucagon-like peptide-1 and other preproglucagon-derived peptides in the rat hypothalamus and brainstem." *Neuroscience.* 77(1): 257-70.
232. **Latham, C. J. and J. E. Blundell** (1979). "Evidence for the effect of tryptophan on the pattern of food consumption in free feeding and food deprived rats." *Life Sci.* 24(21): 1971-8.
233. **Laugerette, F., P. Passilly-Degrace, B. Patris et al.** (2005). "CD36 involvement in orosensory detection of dietary lipids, spontaneous fat preference, and digestive secretions." *J Clin Invest.* 115(11): 3177-84.
234. **Laviano, A., M. M. Meguid, A. Inui et al.** (2006). "Role of leucine in regulating food intake." *Science.* 313(5791): 1236-8; author reply 1236-8.
235. **Layman, D. K.** (2003). "The role of leucine in weight loss diets and glucose homeostasis." *J Nutr.* 133(1): 261S-267S.
236. **Le Magnen, J.** (1999). "Role of dietary odour in the short-term control of intake in the white rat (first published in French in 1956)." *Appetite.* 33(1): 30-2.
237. **Legrady, G. and R. M. Lechan** (1998). "The arcuate nucleus is the major source for neuropeptide Y-innervation of thyrotropin-releasing hormone neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus." *Endocrinology.* 139(7): 3262-70.
238. **Leung, P. M., D. M. Larson and Q. R. Rogers** (1972). "Food intake and preference of olfactory bulbectomized rats fed amino acid imbalanced or deficient diets." *Physiol Behav.* 9(4): 553-7.
239. **Leung, P. M. and Q. R. Rogers** (1971). "Importance of prepyriform cortex in food-intake response of rats to amino acids." *Am J Physiol.* 221(3): 929-35.
240. **Leung, P. M., Q. R. Rogers and A. E. Harper** (1968). "Effect of amino acid imbalance on plasma and tissue free amino acids in the rat." *J Nutr.* 96(3): 303-18.
241. **Levine, A. S., D. C. Jewett, J. P. Cleary et al.** (2004a). "Our journey with neuropeptide Y: effects on ingestive behaviors and energy expenditure." *Peptides.* 25(3): 505-10.
242. **Levine, A. S., P. K. Olszewski, M. A. Mullett et al.** (2004b). "Intra-amygdalar injection of DAMGO: effects on c-Fos levels in brain sites associated with feeding behavior." *Brain Res.* 1015(1-2): 9-14.
243. **Liddle, R. A.** (1995). "Regulation of cholecystokinin secretion by intraluminal releasing factors." *Am J Physiol.* 269(3 Pt 1): G319-27.
244. **Liu, X. H., R. Morris, D. Spiller et al.** (2001). "Orexin a preferentially excites glucose-sensitive neurons in the lateral hypothalamus of the rat in vitro." *Diabetes.* 50(11): 2431-7.
245. **Long, S. J., A. R. Jeffcoat and D. J. Millward** (2000). "Effect of habitual dietary-protein intake on appetite and satiety." *Appetite.* 35(1): 79-88.
246. **Loscher, W., H. Lehmann and U. Ebert** (1998). "Differences in the distribution of GABA- and GAD-immunoreactive neurons in the anterior and posterior piriform cortex of rats." *Brain Res.* 800(1): 21-31.
247. **Ma, X., L. Zubcevic, J. C. Bruning et al.** (2007). "Electrical inhibition of identified anorexigenic POMC neurons by orexin/hypocretin." *J Neurosci.* 27(7): 1529-33.

248. **MacDonald, A. F., C. J. Billington and A. S. Levine** (2004). "Alterations in food intake by opioid and dopamine signaling pathways between the ventral tegmental area and the shell of the nucleus accumbens." *Brain Res.* 1018(1): 78-85.
249. **Maerz, L. L., H. Sankaran, S. J. Scharpf et al.** (1994). "Effect of caloric content and composition of a liquid meal on gastric emptying in the rat." *Am J Physiol.* 267(5 Pt 2): R1163-7.
250. **Marmonier, C., D. Chapelot and J. Louis-Sylvestre** (2000). "Effects of macronutrient content and energy density of snacks consumed in a satiety state on the onset of the next meal." *Appetite.* 34(2): 161-8.
251. **Massey, L. K.** (1998). "Does excess dietary protein adversely affect bone? Symposium overview." *J Nutr.* 128(6): 1048-50.
252. **Mathis, C., T. H. Moran and G. J. Schwartz** (1998). "Load-sensitive rat gastric vagal afferents encode volume but not gastric nutrients." *Am J Physiol.* 274(2 Pt 2): R280-6.
253. **McArthur, L. H., W. F. Kelly, D. W. Gietzen et al.** (1993). "The role of palatability in the food intake response of rats fed high-protein diets." *Appetite.* 20(3): 181-96.
254. **McCann, M. J., J. G. Verbalis and E. M. Stricker** (1989). "LiCl and CCK inhibit gastric emptying and feeding and stimulate OT secretion in rats." *Am J Physiol.* 256(2 Pt 2): R463-8.
255. **McKinley, M. J., R. M. McAllen, P. Davern et al.** (2003). "The sensory circumventricular organs of the mammalian brain." *Adv Anat Embryol Cell Biol.* 172: III-XII, 1-122, back cover.
256. **McMahon, L. R. and P. J. Wellman** (1998). "PVN infusion of GLP-1-(7-36) amide suppresses feeding but does not induce aversion or alter locomotion in rats." *Am J Physiol.* 274(1 Pt 2): R23-9.
257. **Mellinkoff, S. M., M. Frankland, D. Boyle et al.** (1956). "Relationship between serum amino acid concentration and fluctuations in appetite." *J Appl Physiol.* 8(5): 535-8.
258. **Mercer, L. P., S. J. Dodds, M. D. Weber et al.** (1990). "Histidine, histamine, and the neuroregulation of food intake: a review and hypothesis." *Nutrition.* 6(4): 273-7.
259. **Mogenson, G. J., D. L. Jones and C. Y. Yim** (1980). "From motivation to action: functional interface between the limbic system and the motor system." *Prog Neurobiol.* 14(2-3): 69-97.
260. **Mojsov, S., G. C. Weir and J. F. Habener** (1987). "Insulintropin: glucagon-like peptide I (7-37) co-encoded in the glucagon gene is a potent stimulator of insulin release in the perfused rat pancreas." *J Clin Invest.* 79(2): 616-9.
261. **Monda, M., A. Sullo, V. De Luca et al.** (1997). "L-threonine injection into PPC modifies food intake, lateral hypothalamic activity, and sympathetic discharge." *Am J Physiol.* 273(2 Pt 2): R554-9.
262. **Morens, C., C. Gaudichon, G. Fromentin et al.** (2001). "Daily delivery of dietary nitrogen to the periphery is stable in rats adapted to increased protein intake." *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 281(4): E826-36.
263. **Morens, C., C. Gaudichon, C. C. Metges et al.** (2000). "A high-protein meal exceeds anabolic and catabolic capacities in rats adapted to a normal protein diet." *J Nutr.* 130(9): 2312-21.
264. **Morgan, J. I. and T. Curran** (1991). "Stimulus-transcription coupling in the nervous system: involvement of the inducible proto-oncogenes fos and jun." *Annu Rev Neurosci.* 14: 421-51.
265. **Mountjoy, K. G., M. T. Mortrud, M. J. Low et al.** (1994). "Localization of the melanocortin-4 receptor (MC4-R) in neuroendocrine and autonomic control circuits in the brain." *Mol Endocrinol.* 8(10): 1298-308.
266. **Mucha, R. F. and S. D. Iversen** (1986). "Increased food intake after opioid microinjections into nucleus accumbens and ventral tegmental area of rat." *Brain Res.* 397(2): 214-24.
267. **Munzberg, H., M. Bjornholm, S. H. Bates et al.** (2005). "Leptin receptor action and mechanisms of leptin resistance." *Cell Mol Life Sci.* 62(6): 642-52.
268. **Munzberg, H., J. S. Flier and C. Bjorbaek** (2004). "Region-specific leptin resistance within the hypothalamus of diet-induced obese mice." *Endocrinology.* 145(11): 4880-9.
269. **Munzberg, H., L. Huo, E. A. Nillni et al.** (2003). "Role of signal transducer and activator of transcription 3 in regulation of hypothalamic proopiomelanocortin gene expression by leptin." *Endocrinology.* 144(5): 2121-31.
270. **Munzberg, H. and M. G. Myers, Jr.** (2005). "Molecular and anatomical determinants of central leptin resistance." *Nat Neurosci.* 8(5): 566-70.

271. **Nakazato, M., N. Murakami, Y. Date et al.** (2001). "A role for ghrelin in the central regulation of feeding." *Nature*. 409(6817): 194-8.
272. **Nauck, M. A., U. Niedereichholz, R. Ettler et al.** (1997). "Glucagon-like peptide 1 inhibition of gastric emptying outweighs its insulinotropic effects in healthy humans." *Am J Physiol*. 273(5 Pt 1): E981-8.
273. **Nelson, G., J. Chandrashekar, M. A. Hoon et al.** (2002). "An amino-acid taste receptor." *Nature*. 416(6877): 199-202.
274. **Niswender, K. D. and M. W. Schwartz** (2003). "Insulin and leptin revisited: adiposity signals with overlapping physiological and intracellular signaling capabilities." *Front Neuroendocrinol*. 24(1): 1-10.
275. **Nonaka, N., S. Shioda, M. L. Niehoff et al.** (2003). "Characterization of blood-brain barrier permeability to PYY3-36 in the mouse." *J Pharmacol Exp Ther*. 306(3): 948-53.
276. **Norgren, R. and G. P. Smith** (1988). "Central distribution of subdiaphragmatic vagal branches in the rat." *J Comp Neurol*. 273(2): 207-23.
277. **Ollmann, M. M., B. D. Wilson, Y. K. Yang et al.** (1997). "Antagonism of central melanocortin receptors in vitro and in vivo by agouti-related protein." *Science*. 278(5335): 135-8.
278. **Olszewski, P. K., D. Li, M. K. Grace et al.** (2003). "Neural basis of orexigenic effects of ghrelin acting within lateral hypothalamus." *Peptides*. 24(4): 597-602.
279. **Pannemans, D. L., G. Schaafsma and K. R. Westerterp** (1997). "Calcium excretion, apparent calcium absorption and calcium balance in young and elderly subjects: influence of protein intake." *Br J Nutr*. 77(5): 721-9.
280. **Pecina, S. and K. C. Berridge** (2000). "Opioid site in nucleus accumbens shell mediates eating and hedonic 'liking' for food: map based on microinjection Fos plumes." *Brain Res*. 863(1-2): 71-86.
281. **Pecina, S. and K. C. Berridge** (2005). "Hedonic hot spot in nucleus accumbens shell: where do mu-opioids cause increased hedonic impact of sweetness?" *J Neurosci*. 25(50): 11777-86.
282. **Pecina, S., B. Cagniard, K. C. Berridge et al.** (2003). "Hyperdopaminergic mutant mice have higher "wanting" but not "liking" for sweet rewards." *J Neurosci*. 23(28): 9395-402.
283. **Pedersen-Bjergaard, U., U. Host, H. Kelbaek et al.** (1996). "Influence of meal composition on postprandial peripheral plasma concentrations of vasoactive peptides in man." *Scand J Clin Lab Invest*. 56(6): 497-503.
284. **Peraino, C., Q. R. Rogers, M. Yoshida et al.** (1959). "Observations on protein digestion in vivo. II. Dietary factors affecting the rate of disappearance of casein from the gastrointestinal tract." *Can J Biochem Physiol*. 37: 1475-91.
285. **Perello, M., R. C. Stuart and E. A. Nilni** (2007). "Differential Effects of Fasting and Leptin on Pro-Opiomelanocortin Peptides in the Arcuate Nucleus and in the Nucleus of the Solitary Tract." *Am J Physiol Endocrinol Metab*.
286. **Peret, J., A. C. Bach, B. Delhomme et al.** (1984). "Metabolic effects of high-protein diets in Zucker rats." *Metabolism*. 33(3): 200-7.
287. **Peruzzo, B., F. E. Pastor, J. L. Blazquez et al.** (2000). "A second look at the barriers of the medial basal hypothalamus." *Exp Brain Res*. 132(1): 10-26.
288. **Peters, J. C. and A. E. Harper** (1985). "Adaptation of rats to diets containing different levels of protein: effects on food intake, plasma and brain amino acid concentrations and brain neurotransmitter metabolism." *J Nutr*. 115(3): 382-98.
289. **Peters, J. C. and A. E. Harper** (1987). "Acute effects of dietary protein on food intake, tissue amino acids, and brain serotonin." *Am J Physiol*. 252(5 Pt 2): R902-14.
290. **Peyron, C., D. K. Tighe, A. N. van den Pol et al.** (1998). "Neurons containing hypocretin (orexin) project to multiple neuronal systems." *J Neurosci*. 18(23): 9996-10015.
291. **Phifer, C. B. and H. R. Berthoud** (1998). "Duodenal nutrient infusions differentially affect sham feeding and Fos expression in rat brain stem." *Am J Physiol*. 274(6 Pt 2): R1725-33.
292. **Phillips, R. J., E. A. Baronowsky and T. L. Powley** (1997). "Afferent innervation of gastrointestinal tract smooth muscle by the hepatic branch of the vagus." *J Comp Neurol*. 384(2): 248-70.

293. **Phillips, R. J. and T. L. Powley** (1996). "Gastric volume rather than nutrient content inhibits food intake." *Am J Physiol.* 271(3 Pt 2): R766-9.
294. **Phillips, R. J. and T. L. Powley** (1998). "Gastric volume detection after selective vagotomies in rats." *Am J Physiol.* 274(6 Pt 2): R1626-38.
295. **Poppitt, S. D., D. McCormack and R. Buffenstein** (1998). "Short-term effects of macronutrient preloads on appetite and energy intake in lean women." *Physiol Behav.* 64(3): 279-85.
296. **Porrini, M., A. Santangelo, R. Croveti et al.** (1997). "Weight, protein, fat, and timing of preloads affect food intake." *Physiol Behav.* 62(3): 563-70.
297. **Powley, T. L. and R. J. Phillips** (2004). "Gastric satiation is volumetric, intestinal satiation is nutritive." *Physiol Behav.* 82(1): 69-74.
298. **Pupovac, J. and G. H. Anderson** (2002). "Dietary peptides induce satiety via cholecystokinin-A and peripheral opioid receptors in rats." *J Nutr.* 132(9): 2775-80.
299. **Qu, D., D. S. Ludwig, S. Gammeltoft et al.** (1996). "A role for melanin-concentrating hormone in the central regulation of feeding behaviour." *Nature.* 380(6571): 243-7.
300. **Raybould, H. E.** (1991). "Capsaicin-sensitive vagal afferents and CCK in inhibition of gastric motor function induced by intestinal nutrients." *Peptides.* 12(6): 1279-83.
301. **Raybould, H. E. and H. Holzer** (1992). "Dual capsaicin-sensitive afferent pathways mediate inhibition of gastric emptying in rat induced by intestinal carbohydrate." *Neurosci Lett.* 141(2): 236-8.
302. **Reid, M. and M. Hetherington** (1997). "Relative effects of carbohydrates and protein on satiety - a review of methodology." *Neurosci Biobehav Rev.* 21(3): 295-308.
303. **Reidelberger, R. D., D. Heimann, L. Kelsey et al.** (2003). "Effects of peripheral CCK receptor blockade on feeding responses to duodenal nutrient infusions in rats." *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 284(2): R389-98.
304. **Reidelberger, R. D., J. Hernandez, B. Fritzsche et al.** (2004). "Abdominal vagal mediation of the satiety effects of CCK in rats." *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 286(6): R1005-12.
305. **Richelle, M.** (1968). "[The integration of behavior as a variable in psychopharmacological research]." *J Physiol (Paris).* 60 Suppl 1: 149-203.
306. **Rinaman, L.** (1999a). "A functional role for central glucagon-like peptide-1 receptors in lithium chloride-induced anorexia." *Am J Physiol.* 277(5 Pt 2): R1537-40.
307. **Rinaman, L.** (1999b). "Interoceptive stress activates glucagon-like peptide-1 neurons that project to the hypothalamus." *Am J Physiol.* 277(2 Pt 2): R582-90.
308. **Rinaman, L.** (2003). "Hindbrain noradrenergic lesions attenuate anorexia and alter central cFos expression in rats after gastric viscerosensory stimulation." *J Neurosci.* 23(31): 10084-92.
309. **Rinaman, L.** (2004). "Hindbrain contributions to anorexia." *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 287(5): R1035-6.
310. **Rinaman, L., E. A. Baker, G. E. Hoffman et al.** (1998). "Medullary c-Fos activation in rats after ingestion of a satiating meal." *Am J Physiol.* 275(1 Pt 2): R262-8.
311. **Ritter, R. C.** (2004). "Gastrointestinal mechanisms of satiation for food." *Physiol Behav.* 81(2): 249-73.
312. **Ritter, S., K. Bugarith and T. T. Dinh** (2001). "Immunotoxic destruction of distinct catecholamine subgroups produces selective impairment of glucoregulatory responses and neuronal activation." *J Comp Neurol.* 432(2): 197-216.
313. **Ritter, S., T. T. Dinh and Y. Zhang** (2000). "Localization of hindbrain glucoreceptive sites controlling food intake and blood glucose." *Brain Res.* 856(1-2): 37-47.
314. **Ritter, S., I. Llewellyn-Smith and T. T. Dinh** (1998). "Subgroups of hindbrain catecholamine neurons are selectively activated by 2-deoxy-D-glucose induced metabolic challenge." *Brain Res.* 805(1-2): 41-54.
315. **Rodgers, R. J., J. C. Halford, R. L. Nunes de Souza et al.** (2000). "Dose-response effects of orexin-A on food intake and the behavioural satiety sequence in rats." *Regul Pept.* 96(1-2): 71-84.
316. **Rogers, O. R., M. L. Chen, C. Peraino et al.** (1960). "Observations on protein digestion in vivo. III. Recovery of nitrogen from the stomach and small intestine at intervals after feeding diets containing different proteins." *J Nutr.* 72: 331-9.

317. **Rogers, R. C., R. A. Travagli and G. E. Hermann** (2003). "Noradrenergic neurons in the rat solitary nucleus participate in the esophageal-gastric relaxation reflex." *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 285(2): R479-89.
318. **Rolls, B. A., J. W. Porter and D. R. Westgarth** (1972). "The course of digestion of different food proteins in the rat. 3. The absorption of proteins given alone and with supplements of their limiting amino acids." *Br J Nutr.* 28(3): 283-93.
319. **Rolls, B. J., M. Hetherington and V. J. Burley** (1988). "The specificity of satiety: the influence of foods of different macronutrient content on the development of satiety." *Physiol Behav.* 43(2): 145-53.
320. **Rolls, E. T.** (2005). "Taste, olfactory, and food texture processing in the brain, and the control of food intake." *Physiol Behav.* 85(1): 45-56.
321. **Rolls, E. T., M. L. Kringelbach and I. E. de Araujo** (2003). "Different representations of pleasant and unpleasant odours in the human brain." *Eur J Neurosci.* 18(3): 695-703.
322. **Rosenthal, S. and E. S. Nasset** (1958). "Gastric emptying and intestinal absorption of carbohydrate and protein as influenced by the nature of the test meal." *J Nutr.* 66(1): 91-103.
323. **Routh, V. H.** (2003). "Glucosensing neurons in the ventromedial hypothalamic nucleus (VMN) and hypoglycemia-associated autonomic failure (HAAF)." *Diabetes Metab Res Rev.* 19(5): 348-56.
324. **Rudman, D.** (1988). "Kidney senescence: a model for aging." *Nutr Rev.* 46(6): 209-14.
325. **Sabatini, D. M., H. Erdjument-Bromage, M. Lui et al.** (1994). "RAFT1: a mammalian protein that binds to FKBP12 in a rapamycin-dependent fashion and is homologous to yeast TORs." *Cell.* 78(1): 35-43.
326. **Sahu, A.** (2002). "Interactions of neuropeptide Y, hypocretin-I (orexin A) and melanin-concentrating hormone on feeding in rats." *Brain Res.* 944(1-2): 232-8.
327. **Sakurai, T., A. Amemiya, M. Ishii et al.** (1998). "Orexins and orexin receptors: a family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior." *Cell.* 92(5): 1 page following 696.
328. **Samson, W. K., M. M. Taylor, M. Follwell et al.** (2002). "Orexin actions in hypothalamic paraventricular nucleus: physiological consequences and cellular correlates." *Regul Pept.* 104(1-3): 97-103.
329. **Sato, I., H. Arima, N. Ozaki et al.** (2005). "Insulin inhibits neuropeptide Y gene expression in the arcuate nucleus through GABAergic systems." *J Neurosci.* 25(38): 8657-64.
330. **Sawchenko, P. E. and L. W. Swanson** (1981). "Central noradrenergic pathways for the integration of hypothalamic neuroendocrine and autonomic responses." *Science.* 214(4521): 685-7.
331. **Sawchenko, P. E. and L. W. Swanson** (1982a). "Immunohistochemical identification of neurons in the paraventricular nucleus of the hypothalamus that project to the medulla or to the spinal cord in the rat." *J Comp Neurol.* 205(3): 260-72.
332. **Sawchenko, P. E. and L. W. Swanson** (1982b). "The organization of noradrenergic pathways from the brainstem to the paraventricular and supraoptic nuclei in the rat." *Brain Res.* 257(3): 275-325.
333. **Sawchenko, P. E., L. W. Swanson, R. Grzanna et al.** (1985). "Colocalization of neuropeptide Y immunoreactivity in brainstem catecholaminergic neurons that project to the paraventricular nucleus of the hypothalamus." *J Comp Neurol.* 241(2): 138-53.
334. **Schmelzle, T. and M. N. Hall** (2000). "TOR, a central controller of cell growth." *Cell.* 103(2): 253-62.
335. **Schultz, W.** (2002). "Getting formal with dopamine and reward." *Neuron.* 36(2): 241-63.
336. **Schwarcz, R., T. Hokfelt, K. Fuxe et al.** (1979). "Ibotenic acid-induced neuronal degeneration: a morphological and neurochemical study." *Exp Brain Res.* 37(2): 199-216.
337. **Schwartz, G. J.** (2006). "Integrative capacity of the caudal brainstem in the control of food intake." *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 361(1471): 1275-80.
338. **Schwartz, G. J., G. Berkow, P. R. McHugh et al.** (1993). "Gastric branch vagotomy blocks nutrient and cholecystokinin-induced suppression of gastric emptying." *Am J Physiol.* 264(3 Pt 2): R630-7.
339. **Schwartz, G. J., P. R. McHugh and T. H. Moran** (1991). "Integration of vagal afferent responses to gastric loads and cholecystokinin in rats." *Am J Physiol.* 261(1 Pt 2): R64-9.

340. **Schwartz, G. J. and T. H. Moran** (1998). "Duodenal nutrient exposure elicits nutrient-specific gut motility and vagal afferent signals in rat." *Am J Physiol.* 274(5 Pt 2): R1236-42.
341. **Schwartz, G. J., C. F. Salorio, C. Skoglund et al.** (1999). "Gut vagal afferent lesions increase meal size but do not block gastric preload-induced feeding suppression." *Am J Physiol.* 276(6 Pt 2): R1623-9.
342. **Schwartz, M. W., R. J. Seeley, S. C. Woods et al.** (1997). "Leptin increases hypothalamic pro-opiomelanocortin mRNA expression in the rostral arcuate nucleus." *Diabetes.* 46(12): 2119-23.
343. **Schwartz, M. W., S. C. Woods, D. Porte, Jr. et al.** (2000). "Central nervous system control of food intake." *Nature.* 404(6778): 661-71.
344. **Schwartz, M. W., S. C. Woods, R. J. Seeley et al.** (2003). "Is the energy homeostasis system inherently biased toward weight gain?" *Diabetes.* 52(2): 232-8.
345. **Sclafani, A., K. Ackroff and G. J. Schwartz** (2003). "Selective effects of vagal deafferentation and celiac-superior mesenteric ganglionectomy on the reinforcing and satiating action of intestinal nutrients." *Physiol Behav.* 78(2): 285-94.
346. **Sclafani, A., A. V. Azzara, K. Touzani et al.** (2001). "Parabrachial nucleus lesions block taste and attenuate flavor preference and aversion conditioning in rats." *Behav Neurosci.* 115(4): 920-33.
347. **Scott, E. M. and E. Quint** (1946). "Self Selection of Diet: II. The Effect of Flavor." *J Nutr.* 32: 113-119.
348. **Seeley, R. J., K. Blake, P. A. Rushing et al.** (2000). "The role of CNS glucagon-like peptide-1 (7-36) amide receptors in mediating the visceral illness effects of lithium chloride." *J Neurosci.* 20(4): 1616-21.
349. **Segal-Lieberman, G., R. L. Bradley, E. Kokkotou et al.** (2003). "Melanin-concentrating hormone is a critical mediator of the leptin-deficient phenotype." *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100(17): 10085-90.
350. **Semon, B. A., P. M. Leung, Q. R. Rogers et al.** (1987). "Effect of type of protein on food intake of rats fed high protein diets." *Physiol Behav.* 41(5): 451-8.
351. **Semon, B. A., P. M. Leung, Q. R. Rogers et al.** (1988). "Increase in plasma ammonia and amino acids when rats are fed a 44% casein diet." *Physiol Behav.* 43(5): 631-6.
352. **Semon, B. A., P. M. Leung, Q. R. Rogers et al.** (1989). "Plasma and brain ammonia and amino acids in rats measured after feeding 75% casein or 28% egg white." *J Nutr.* 119(11): 1583-92.
353. **Shalev, U., J. Yap and Y. Shaham** (2001). "Leptin attenuates acute food deprivation-induced relapse to heroin seeking." *J Neurosci.* 21(4): RC129.
354. **Sharp, J. W., C. M. Ross-Inta, S. Hao et al.** (2006). "Co-localization of phosphorylated extracellular signal-regulated protein kinases 1/2 (ERK1/2) and phosphorylated eukaryotic initiation factor 2alpha (eIF2alpha) in response to a threonine-devoid diet." *J Comp Neurol.* 494(3): 485-94.
355. **Sharp, J. W., C. M. Ross, T. J. Koehnle et al.** (2004). "Phosphorylation of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase type ii and the alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionate (ampa) receptor in response to a threonine-devoid diet." *Neuroscience.* 126(4): 1053-62.
356. **Shiraishi, T., Y. Oomura, K. Sasaki et al.** (2000). "Effects of leptin and orexin-A on food intake and feeding related hypothalamic neurons." *Physiol Behav.* 71(3-4): 251-61.
357. **Simansky, K. J.** (1996). "Serotonergic control of the organization of feeding and satiety." *Behav Brain Res.* 73(1-2): 37-42.
358. **Simson, P. C. and D. A. Booth** (1974). "Dietary aversion established by a deficient load: specificity to the amino acid omitted from a balanced mixture." *Pharmacol Biochem Behav.* 2(4): 481-5.
359. **Smedh, U. and T. H. Moran** (2003). "Peptides that regulate food intake: separable mechanisms for dorsal hindbrain CART peptide to inhibit gastric emptying and food intake." *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 284(6): R1418-26.
360. **Smith, G. P.** (1996). "The direct and indirect controls of meal size." *Neurosci Biobehav Rev.* 20(1): 41-6.
361. **Smith, K. S. and K. C. Berridge** (2005). "The ventral pallidum and hedonic reward: neurochemical maps of sucrose "liking" and food intake." *J Neurosci.* 25(38): 8637-49.

362. **Smith, K. S. and K. C. Berridge** (2007). "Opioid limbic circuit for reward: interaction between hedonic hotspots of nucleus accumbens and ventral pallidum." *J Neurosci.* 27(7): 1594-605.
363. **Spencer, C. M. and T. A. Houpt** (2001). "Dynamics of c-fos and ICER mRNA expression in rat forebrain following lithium chloride injection." *Brain Res Mol Brain Res.* 93(2): 113-26.
364. **Stratford, T. R.** (2005). "Activation of feeding-related neural circuitry after unilateral injections of muscimol into the nucleus accumbens shell." *Brain Res.* 1048(1-2): 241-50.
365. **Stratford, T. R. and A. E. Kelley** (1997). "GABA in the nucleus accumbens shell participates in the central regulation of feeding behavior." *J Neurosci.* 17(11): 4434-40.
366. **Stratford, T. R. and A. E. Kelley** (1999). "Evidence of a functional relationship between the nucleus accumbens shell and lateral hypothalamus subserving the control of feeding behavior." *J Neurosci.* 19(24): 11040-8.
367. **Stubbs, R. J., L. M. O'Reilly, A. M. Johnstone et al.** (1999). "Description and evaluation of an experimental model to examine changes in selection between high-protein, high-carbohydrate and high-fat foods in humans." *Eur J Clin Nutr.* 53(1): 13-21.
368. **Suzuki, R., H. Shimojima, H. Funahashi et al.** (2002). "Orexin-1 receptor immunoreactivity in chemically identified target neurons in the rat hypothalamus." *Neurosci Lett.* 324(1): 5-8.
369. **Swanson, L. W. and P. E. Sawchenko** (1980). "Paraventricular nucleus: a site for the integration of neuroendocrine and autonomic mechanisms." *Neuroendocrinology.* 31(6): 410-7.
370. **Swanson, L. W. and P. E. Sawchenko** (1983). "Hypothalamic integration: organization of the paraventricular and supraoptic nuclei." *Annu Rev Neurosci.* 6: 269-324.
371. **Swanson, L. W., P. E. Sawchenko, A. Berod et al.** (1981). "An immunohistochemical study of the organization of catecholaminergic cells and terminal fields in the paraventricular and supraoptic nuclei of the hypothalamus." *J Comp Neurol.* 196(2): 271-85.
372. **Tartaglia, L. A.** (1997). "The leptin receptor." *J Biol Chem.* 272(10): 6093-6.
373. **Teff, K. L., S. N. Young and J. E. Blundell** (1989). "The effect of protein or carbohydrate breakfasts on subsequent plasma amino acid levels, satiety and nutrient selection in normal males." *Pharmacol Biochem Behav.* 34(4): 829-37.
374. **Ter Horst, G. J., P. de Boer, P. G. Luiten et al.** (1989). "Ascending projections from the solitary tract nucleus to the hypothalamus. A Phaseolus vulgaris lectin tracing study in the rat." *Neuroscience.* 31(3): 785-97.
375. **Tews, J. K., J. J. Repa and A. E. Harper** (1992). "Protein selection by rats adapted to high or moderately low levels of dietary protein." *Physiol Behav.* 51(4): 699-712.
376. **Tews, J. K., Q. R. Rogers, J. G. Morris et al.** (1984). "Effect of dietary protein and GABA on food intake, growth and tissue amino acids in cats." *Physiol Behav.* 32(2): 301-8.
377. **Thiele, T. E., G. Van Dijk, L. A. Campfield et al.** (1997). "Central infusion of GLP-1, but not leptin, produces conditioned taste aversions in rats." *Am J Physiol.* 272(2 Pt 2): R726-30.
378. **Traub, R. J., J. N. Sengupta and G. F. Gebhart** (1996). "Differential c-fos expression in the nucleus of the solitary tract and spinal cord following noxious gastric distention in the rat." *Neuroscience.* 74(3): 873-84.
379. **Travagli, R. A., G. E. Hermann, K. N. Browning et al.** (2003). "Musings on the wanderer: what's new in our understanding of vago-vagal reflexes? III. Activity-dependent plasticity in vago-vagal reflexes controlling the stomach." *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 284(2): G180-7.
380. **Trigazis, L., A. Ortmann and G. H. Anderson** (1997). "Effect of a cholecystokinin-A receptor blocker on protein-induced food intake suppression in rats." *Am J Physiol.* 272(6 Pt 2): R1826-33.
381. **Tucker, D. C., C. B. Saper, D. A. Ruggiero et al.** (1987). "Organization of central adrenergic pathways: I. Relationships of ventrolateral medullary projections to the hypothalamus and spinal cord." *J Comp Neurol.* 259(4): 591-603.
382. **Turnbull, W. H., J. Walton and A. R. Leeds** (1993). "Acute effects of mycoprotein on subsequent energy intake and appetite variables." *Am J Clin Nutr.* 58(4): 507-12.
383. **Turton, M. D., D. O'Shea, I. Gunn et al.** (1996). "A role for glucagon-like peptide-1 in the central regulation of feeding." *Nature.* 379(6560): 69-72.
384. **Uhe, A. M., G. R. Collier and K. O'Dea** (1992). "A comparison of the effects of beef, chicken and fish protein on satiety and amino acid profiles in lean male subjects." *J Nutr.* 122(3): 467-72.

385. **van den Top, M., K. Lee, A. D. Whymant et al.** (2004). "Orexigen-sensitive NPY/AgRP pacemaker neurons in the hypothalamic arcuate nucleus." *Nat Neurosci.* 7(5): 493-4.
386. **van der Velde, P., I. Koslowsky and H. S. Koopmans** (1999). "Measurement of gastric emptying during and between meal intake in free-feeding Lewis rats." *Am J Physiol.* 276(2 Pt 2): R597-605.
387. **Verdich, C., A. Flint, J. P. Gutzwiller et al.** (2001). "A meta-analysis of the effect of glucagon-like peptide-1 (7-36) amide on ad libitum energy intake in humans." *J Clin Endocrinol Metab.* 86(9): 4382-9.
388. **Volkow, N. D. and R. A. Wise** (2005). "How can drug addiction help us understand obesity?" *Nat Neurosci.* 8(5): 555-60.
389. **Vrang, N., C. B. Phifer, M. M. Corkern et al.** (2003). "Gastric distension induces c-Fos in medullary GLP-1/2-containing neurons." *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 285(2): R470-8.
390. **Vrang, N., M. Tang-Christensen, P. J. Larsen et al.** (1999). "Recombinant CART peptide induces c-Fos expression in central areas involved in control of feeding behaviour." *Brain Res.* 818(2): 499-509.
391. **Wang, G. J., N. D. Volkow, J. Logan et al.** (2001). "Brain dopamine and obesity." *Lancet.* 357(9253): 354-7.
392. **Wang, L., S. Cardin, V. Martinez et al.** (1999). "Duodenal loading with glucose induces fos expression in rat brain: selective blockade by devazepide." *Am J Physiol.* 277(3 Pt 2): R667-74.
393. **Wang, Y., S. L. Cummings and D. W. Gietzen** (1996a). "Temporal-spatial pattern of c-fos expression in the rat brain in response to indispensable amino acid deficiency. I. The initial recognition phase." *Brain Res Mol Brain Res.* 40(1): 27-34.
394. **Wang, Y., S. L. Cummings and D. W. Gietzen** (1996b). "Temporal-spatial pattern of c-Fos expression in the rat brain in response to indispensable amino acid deficiency. II. The learned taste aversion." *Brain Res Mol Brain Res.* 40(1): 35-41.
395. **Will, M. J., E. B. Franzblau and A. E. Kelley** (2003). "Nucleus accumbens mu-opioids regulate intake of a high-fat diet via activation of a distributed brain network." *J Neurosci.* 23(7): 2882-8.
396. **Willesen, M. G., P. Kristensen and J. Romer** (1999). "Co-localization of growth hormone secretagogue receptor and NPY mRNA in the arcuate nucleus of the rat." *Neuroendocrinology.* 70(5): 306-16.
397. **Williams, D. L., J. M. Kaplan and H. J. Grill** (2000). "The role of the dorsal vagal complex and the vagus nerve in feeding effects of melanocortin-3/4 receptor stimulation." *Endocrinology.* 141(4): 1332-7.
398. **Williams, G., X. J. Cai, J. C. Elliott et al.** (2004). "Anabolic neuropeptides." *Physiol Behav.* 81(2): 211-22.
399. **Williamson, D. A., P. J. Geiselman, J. Lovejoy et al.** (2006). "Effects of consuming mycoprotein, tofu or chicken upon subsequent eating behaviour, hunger and safety." *Appetite.* 46(1): 41-8.
400. **Willing, A. E. and H. R. Berthoud** (1997). "Gastric distension-induced c-fos expression in catecholaminergic neurons of rat dorsal vagal complex." *Am J Physiol.* 272(1 Pt 2): R59-67.
401. **Winn, P.** (1991). "Excitotoxins as tools for producing brain lesions." in *Methods in Neurosciences Volume 7*. ed. pp. 16-27. Philadelphia, PA. Academic Press
402. **Woods, S. C., R. J. Seeley, D. G. Baskin et al.** (2003). "Insulin and the blood-brain barrier." *Curr Pharm Des.* 9(10): 795-800.
403. **Woods, S. C., R. J. Seeley, D. Porte, Jr. et al.** (1998). "Signals that regulate food intake and energy homeostasis." *Science.* 280(5368): 1378-83.
404. **Wyvell, C. L. and K. C. Berridge** (2000). "Intra-accumbens amphetamine increases the conditioned incentive salience of sucrose reward: enhancement of reward "wanting" without enhanced "liking" or response reinforcement." *J Neurosci.* 20(21): 8122-30.
405. **Yamamoto, T. and K. Sawa** (2000a). "c-Fos-like immunoreactivity in the brainstem following gastric loads of various chemical solutions in rats." *Brain Res.* 866(1-2): 135-43.
406. **Yamamoto, T. and K. Sawa** (2000b). "Comparison of c-fos-like immunoreactivity in the brainstem following intraoral and intragastric infusions of chemical solutions in rats." *Brain Res.* 866(1-2): 144-51.

407. **Yamamoto, T., T. Shimura, N. Sako et al.** (1992). "C-fos expression in the rat brain after intraperitoneal injection of lithium chloride." *Neuroreport*. 3(12): 1049-52.
408. **Yamanaka, A., C. T. Beuckmann, J. T. Willie et al.** (2003). "Hypothalamic orexin neurons regulate arousal according to energy balance in mice." *Neuron*. 38(5): 701-13.
409. **Yamazoe, M., S. Shiosaka, A. Yagura et al.** (1984). "The distribution of alpha-melanocyte stimulating hormone (alpha-MSH) in the central nervous system of the rat: an immunohistochemical study. II. Lower brain stem." *Peptides*. 5(4): 721-7.
410. **Yoshimatsu, H., S. Chiba, D. Tajima et al.** (2002). "Histidine suppresses food intake through its conversion into neuronal histamine." *Exp Biol Med (Maywood)*. 227(1): 63-8.
411. **Yox, D. P., H. Stokesberry and R. C. Ritter** (1991). "Vagotomy attenuates suppression of sham feeding induced by intestinal nutrients." *Am J Physiol*. 260(3 Pt 2): R503-8.
412. **Zelano, C., M. Bensafi, J. Porter et al.** (2005). "Attentional modulation in human primary olfactory cortex." *Nat Neurosci*. 8(1): 114-20.
413. **Zhang, M., B. A. Gosnell and A. E. Kelley** (1998). "Intake of high-fat food is selectively enhanced by mu opioid receptor stimulation within the nucleus accumbens." *J Pharmacol Exp Ther*. 285(2): 908-14.
414. **Zhang, M. and A. E. Kelley** (1997). "Opiate agonists microinjected into the nucleus accumbens enhance sucrose drinking in rats." *Psychopharmacology (Berl)*. 132(4): 350-60.
415. **Zhang, M. and A. E. Kelley** (2000). "Enhanced intake of high-fat food following striatal mu-opioid stimulation: microinjection mapping and fos expression." *Neuroscience*. 99(2): 267-77.
416. **Zhao, X. T., M. A. McCamish, R. H. Miller et al.** (1997). "Intestinal transit and absorption of soy protein in dogs depend on load and degree of protein hydrolysis." *J Nutr*. 127(12): 2350-6.
417. **Zheng, H., M. Corkern, I. Stoyanova et al.** (2003). "Peptides that regulate food intake: appetite-inducing accumbens manipulation activates hypothalamic orexin neurons and inhibits POMC neurons." *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 284(6): R1436-44.
418. **Zheng, H., L. M. Patterson, C. B. Phifer et al.** (2005). "Brain stem melanocortinergic modulation of meal size and identification of hypothalamic POMC projections." *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 289(1): R247-58.
419. **Zhou, L., T. Williams, J. L. Lachey et al.** (2005). "Serotonergic pathways converge upon central melanocortin systems to regulate energy balance." *Peptides*. 26(10): 1728-32.
420. **Zittel, T. T., R. De Giorgio, C. Sternini et al.** (1994). "Fos protein expression in the nucleus of the solitary tract in response to intestinal nutrients in awake rats." *Brain Res*. 663(2): 266-70.
421. **Zittel, T. T., J. Glatzle, M. E. Kreis et al.** (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): 1-11.

ANNEXES

ANNEXE 1 : PRESENTATION DU GROUPE LESAFFRE

Groupe Lesaffre



Présentation générale

Le **Groupe LESAFFRE** est un groupe industriel français, implanté dans le monde entier.

Il a **développé**, à partir de son métier principal, la production de levure, **un ensemble de savoir-faire en matière de biotechnologies**.

Il propose des produits destinés à l'alimentation et des services aux industriels de l'agroalimentaire.



Lesaffre aujourd'hui



- Est spécialisé dans certains **produits de fermentation**
- S'adresse essentiellement aux **professionnels**, mais aussi au **grand public**.
- Occupe une **position de leader** dans ses principaux métiers.
- Est **implanté** industriellement sur les **5 continents**.
- Emploie plus de **7000 collaborateurs** dans le monde.



Chiffres clefs



- **≈ 100 sociétés** réparties dans **36 pays**.
- **Commercialement présent** dans le **monde entier**.
- **≈ 50 sites de production** répartis dans **26 pays** :
 - ➔ Une trentaine de levureries
 - ➔ 4 unités de production d'extraits de levure
 - ➔ 7 malteries
- Positions sur les marchés :
 - ➔ Levure et ingrédients de panification : n° 1 mondial
 - ➔ Extraits de levure : n° 1 mondial
 - ➔ Malt : n° 5 mondial



2 centres de recherche



Marcq-en-Baroeul - LENT / RD

- Site de Marcq-en-Baroeul
= **100 chercheurs**
- Site de Maisons-Alfort
= **20 chercheurs**



Maisons-Alfort - BS

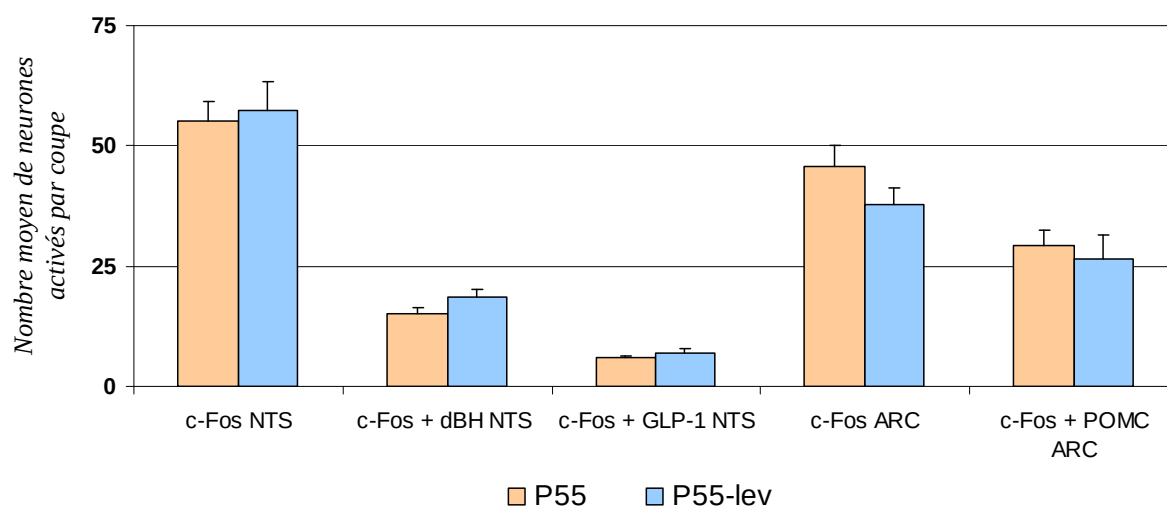
12 millions €

{ CA ≈ 1% CA
 Taux de croissance = + 15%

± 60 collaborations internationales

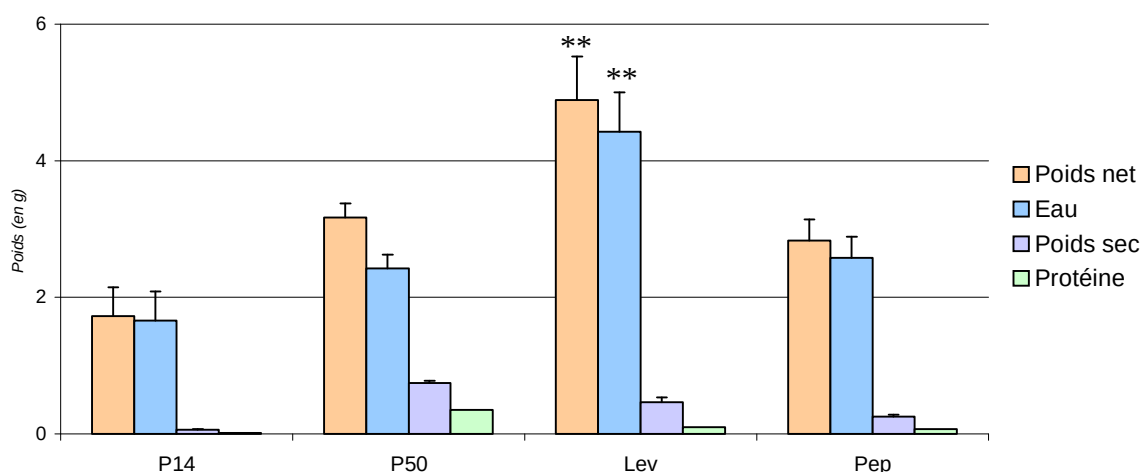


ANNEXE 2 : RESULTATS ANNEXES DES PROTEINES ET PEPTIDES DE LEVURE.



Activation des réseaux centraux par une charge hyperprotéique de levure.

Une charge hyperprotéique de levure (P55-lev) n'induit de différence statistique d'activation dans aucune des régions étudiées (NTS, ARC) par rapport à une charge hyperprotéique de lait (P55) malgré des différences de propriétés satiétogènes importantes.



Mesure du contenu gastrique 1h après la fin de l'ingestion d'une charge.

Le poids/volume total de l'estomac est beaucoup plus élevé après une charge hyperprotéique de levure qu'avec les autres charges testées. En particulier, les paramètres gastriques sont très différents entre protéines et peptides de levure. Ces derniers n'entraînent pas de profils différents par rapport aux charges normo- et hyperprotéiques de lait.

** $p > 0.01$ Lev vs autres charges.

ANNEXE 3 : REMARQUE METHODOLOGIQUE : INVESTIGATION DE L'IMPLICATION D'UNE REGION OU D'UN GROUPE DE NEURONES DANS LE COMPORTEMENT ALIMENTAIRE.

Lésions / Modèle génétiquement modifié

Le cerveau est un organe très complexe qui est indispensable à de nombreuses fonctions vitales et qui par essence intègre de nombreuses informations de nature souvent très variée. La méthode la plus simple mais aussi la plus limitée pour étudier l'implication d'une région du cerveau sur un comportement est historiquement l'emploi de lésions, mécanique (ablation d'une partie du cerveau ou destruction par « coup de couteau ») et plus tard électrolytique (formant une zone de coagulation dans le cerveau dans laquelle tous les neurones sont détruits). Ces techniques ont permis de mettre en évidence le rôle de certaines régions dans des fonctions globales et dans notre cas, ont par exemple permis d'identifier deux régions de l'hypothalamus, respectivement le noyau ventro-médian et l'aire latérale, comme les centres de la satiété et de la faim car une lésion de ces régions entraînait la suppression des comportements correspondants.

Ces méthodes ont cependant montré leurs limites. Tout d'abord, et cela semble assez évident, à moins d'accident, il est difficile d'employer cette méthode chez l'être humain. Les résultats obtenus ne sont donc valables que sur modèle animal. De plus, ces méthodes lèsent généralement une part importante du cerveau qui ne se limite pas strictement à la zone ciblée, ou au contraire dans le cas des zones très étendues, manquent une partie de la zone considérée. Plus important, ces lésions ne détruisent pas seulement les corps cellulaires des neurones de la zone en jeu mais également toutes les fibres passant par cette zone, et donc toutes les connections entre deux régions qui peuvent être totalement différentes de la région étudiée.

Pour remédier à cette lacune méthodologique, ces lésions ont été largement remplacées par des lésions chimiques, tout d'abord en utilisant des molécules excitatrices du système nerveux (en général des agonistes du glutamate) comme l'acide iboténique ou kainique (voire du glutamate lui-même en excès) qui en surexcitant les neurones entraînent la mort des corps cellulaires, mais épargnent les fibres de passage (Schwarcz *et al.*, 1979, Jarrard, 1991, Winn, 1991, Inglis & Semba, 1997). Ces lésions sont plus fines que des lésions électrolytiques mais sont relativement peu spécifiques, or il est souvent utile d'étudier l'implication d'un phénotype donné de neurones dans un comportement. C'est pourquoi ont été développées des toxines

(généralement des saporines), qui couplées avec des anticorps spécifiques, lèsent précisément des neurones donnés dans une région. L'efficacité de la lésion est ensuite facilement vérifiable par immunohistochimie ou par dosage du neuromédiateur visé.

Une alternative plus moderne à la lésion est l'utilisation de souris génétiquement modifiées, qui entraîne cependant une restriction du modèle encore plus importante. L'utilisation de souris knock-out (k-o) pour un récepteur ou un neuromédiateur donné mime en effet de manière encore plus fine, et sans les traumatismes associés aux opérations, les lésions précédemment décrites. L'inconvénient majeur de cette technique se pose dans le cas de molécules ou de récepteurs impliqués dans de nombreuses fonctions et/ou différentes parties du cerveau. Il devient alors difficile de discriminer l'implication de chaque gène dans tels ou tels comportements. Pour remédier à ce problème, des études très récentes pratiquent une transfection des neurones visés avec un phage porteur d'une séquence terminatrice pour le gène et développent des lignées k-o pour le gène mais uniquement dans la région étudiée (Balthasar *et al.*, 2005).

Les méthodes de lésions, dans leur ensemble, présentent cependant un inconvénient méthodologique important : elles ne sont probantes que si le résultat est binaire et positif. Dans le cas contraire, l'implication de la zone ne peut être exclue, mais uniquement son caractère indispensable. Il devient alors nécessaire d'étudier les paramètres d'activation/inhibition des neurones considérés.

Activation/inhibition

Afin de suivre l'activation ou l'inhibition de neurones suite à un stimulus donné, il est tout d'abord possible d'enregistrer l'activité électrique du neurone. Cette technique nécessite l'isolement du neurone, soit *in vivo*, soit sur cellules en culture. Une fois le neurone isolé, un grand nombre de stimuli peuvent être testés, ce qui peut être très avantageux surtout pour rechercher des agonistes ou antagonistes spécifiques d'un récepteur. Cependant, l'identification du phénotype est généralement malaisée, surtout *in vivo*, sauf dans le cas de souris modifiées pour posséder une fluorescence associée au phénotype étudié (souris-GFP). Les études électrophysiologiques présentent en outre l'inconvénient de porter généralement sur très peu de neurones et d'être donc peu généralisables ainsi que peu évidentes en termes de localisation exacte car le plus souvent réalisées sur des cellules en culture.

Il est donc souhaitable de compléter ces études par le suivi de l'activation de zones dans le cerveau par immunohistochimie. Cette technique, très répandue depuis le début des années

90, utilise le marquage de facteurs de transcription, dont le plus couramment employé est la protéine Fos, afin de mettre en évidence l'activation d'un neurone. La protéine Fos est synthétisée suite à la dépolarisation du neurone (soit son activation) (Morgan & Curran, 1991). Elle migre ensuite dans le noyau où elle se complexe avec une autre protéine (Jun, qu'il est également possible d'utiliser comme marqueur) et le complexe joue alors son rôle de facteur de transcription, en particulier de neuromédiateurs, de récepteurs et de divers facteurs de signalisation intracellulaire. Le pic d'expression de la protéine Fos a lieu 90 minutes après le début de la stimulation (Zittel *et al.*, 1999).

La révélation de la protéine Fos (dite activation *c-fos*) permet donc de visualiser, dans un plan donné, l'ensemble des neurones activés suite à une stimulation. Couplée avec une révélation des phénotypes des neurones de la zone concernée (technique dite double ou triple marquage) elle permet donc d'identifier précisément l'activation de groupes de neurones phénotypiquement bien définis. Le marquage de la protéine Fos est nucléaire, là où le marquage phénotypique est cytoplasmique voire membranaire dans le cas de certains récepteurs. Il est également possible de coupler avec un marqueur rétrograde ou antérograde pour étudier les projections concernées.

La protéine Fos présente l'avantage d'être ubiquitaire dans le système nerveux, et permet donc l'étude de la réponse à n'importe quel type de stimulus. Cependant, le stimulus en question doit être assez ponctuel en raison de la latence importante entre la stimulation et la révélation. Dans le cas d'un stimulus trop long, ou de stress important de l'animal entre le stimulus et l'euthanasie, les activations seront plus difficiles à discriminer. L'autre inconvénient de cette méthode est que l'animal doit être sacrifié et que seul un stimulus peut donc être testé par animal.

Dans le cas de stimuli inhibiteurs, il est cependant plus difficile d'utiliser la protéine Fos car elle ne montrera pas de différence. Les études s'intéressent alors généralement aux teneurs en ARN messager du gène étudié et/ou réalisent une hybridation *in situ* si une localisation précise est recherchée.

Une autre méthode de visualisation de l'activité cérébrale utilise les techniques récentes d'imagerie cérébrale, en particulier l'IRM fonctionnelle (imagerie par résonance magnétique), qui permet de visualiser les variations de l'oxygénation de l'hémoglobine sanguine dans les différentes parties du cerveau. Cette technique présente l'avantage d'être totalement non invasive, ce qui la rend indispensable pour l'étude des mécanismes centraux chez l'être humain. Une autre technique, proche de l'IRM, est la tomographie par émission de positron

(PET-scan), qui consiste à injecter de l'oxygène 15 dans le sang. Ce dernier va émettre un positron au contact des tissus dont l'origine peut être visualisée. Cette technique, dont la résolution est plus faible, permet néanmoins de coupler le traceur avec par exemple un récepteur spécifique, là où l'IRM ne fournit aucune information sur la nature des neurones activés.

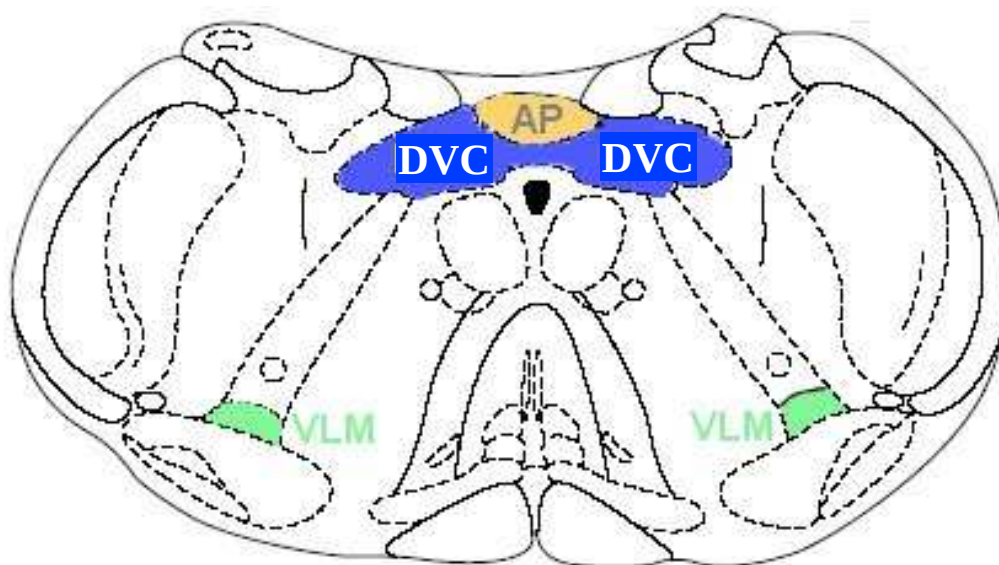


Figure 1 : Position du NTS, AP et VLM chez le rat.

Coupe coronale (Bregma : -13.68 mm) d'un cerveau de rat représentant la position du complexe vagal dorsal (en bleu), de l'area postrema (en orange) et de la moelle ventro-latérale (en vert).

Adapté d'après l'atlas de Paxinos et Watson.

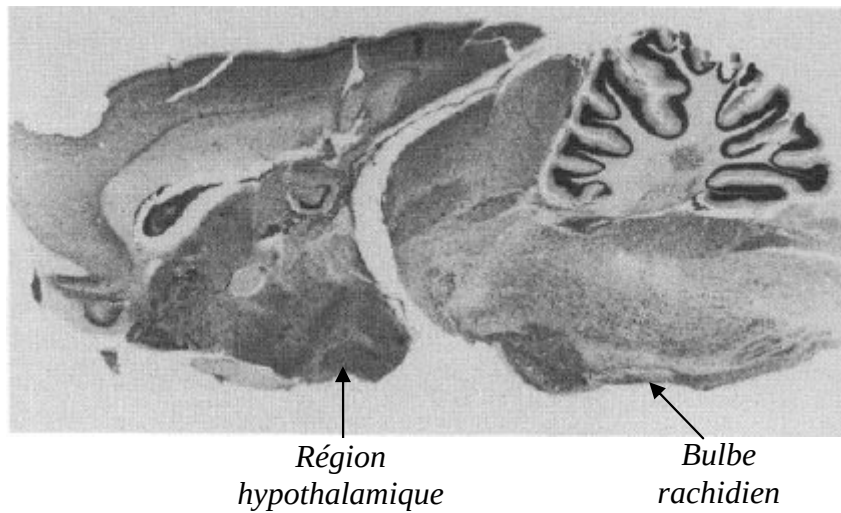


Figure 2 : Coupe sagittale d'un cerveau de rat décérébré.

Toute connexion autre qu'humorale est abolie entre les parties antérieures et postérieures du cerveau, et en particulier entre le bulbe rachidien et l'hypothalamus.

D'après Grill and Smith, 1988.

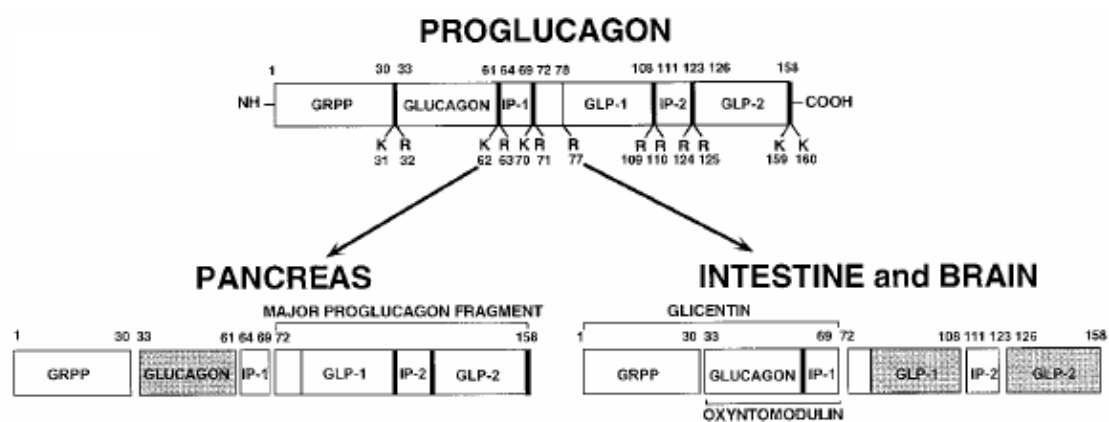


Figure 3 : Synthèse du GLP-1 à partir du proglucagon.
D'après Kieffer et Habener, 1999.

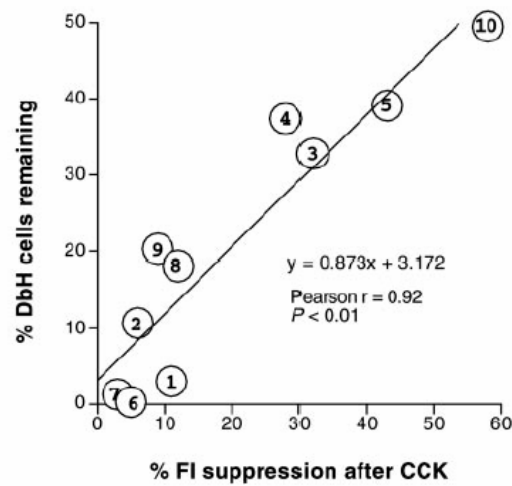


Figure 4 : Corrélation entre l'effet anorexigène de la CCK et le nombre de neurones noradrénergiques du NTS.

La lésion des neurones noradrénergiques du NTS entraîne une suppression de l'effet anorexigène de la CCK de manière proportionnelle au nombre de neurones noradrénergiques restant.

D'après Rinaman, 2003.

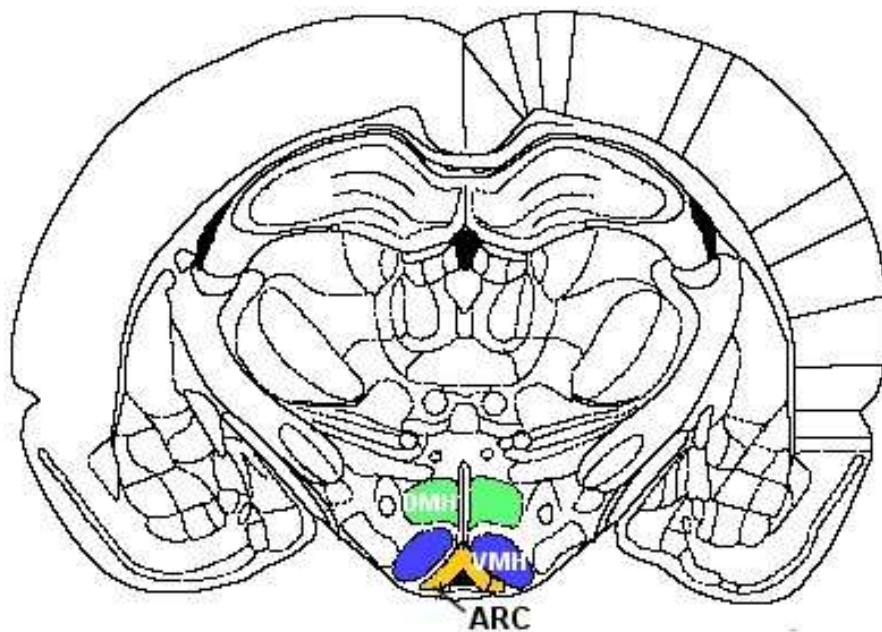


Figure 5 : Position des noyaux DMH, VMH et ARC chez le rat.

Coupe coronale (Bregma :-3.14 mm) d'un cerveau de rat représentant la position des noyaux dorso-médian (en bleu), ventro-médian (en vert) et arqué (en orange) de l'hypothalamus.

Adapté d'après l'atlas de Paxinos et Watson.

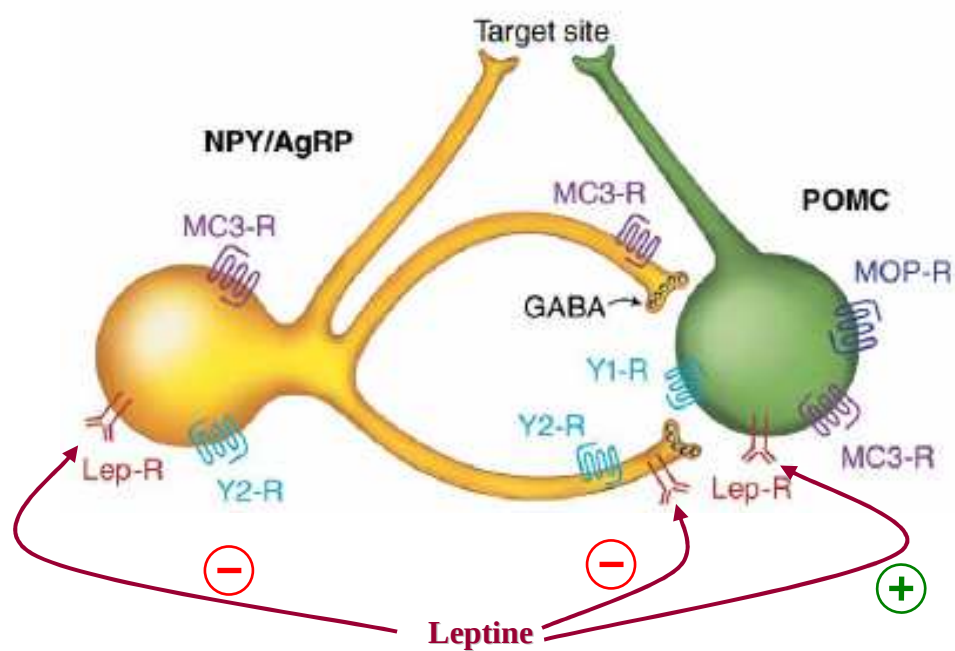


Figure 6 : Action de la leptine sur les neurones POMC et NPY.

La leptine interagit avec son récepteur pour activer les neurones POMC et inhiber les neurones NPY. La leptine inhibe en outre le tonus inhibiteur GABAergique des neurones NPY sur les neurones POMC.

Adapté d'après Cowley et al., 2001.

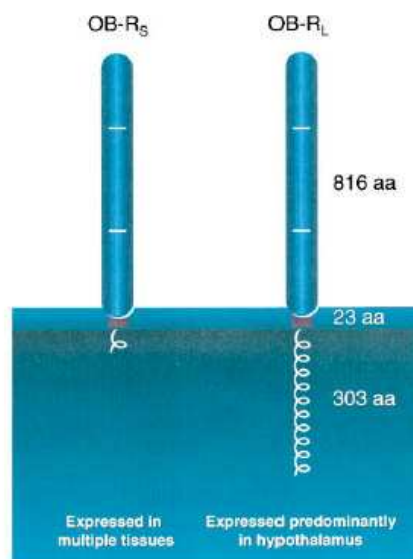


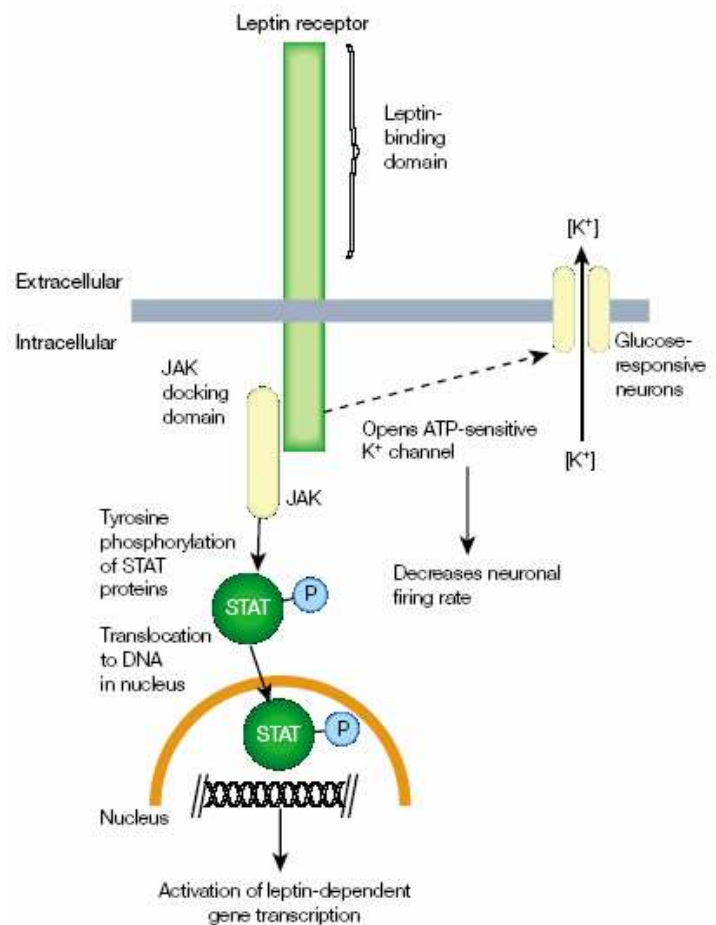
Figure 7 : Représentation des récepteurs court (OB-R_S) et long (OB-R_L) à la leptine.

Le récepteur long est présent sur les neurones POMC et NPY dans l'ARC.

Adapté d'après Tartaglia, 1997.

Figure 8 : Cascade de réactions suivant l'activation du récepteur à la leptine.

D'après Schwartz et al., 2000.



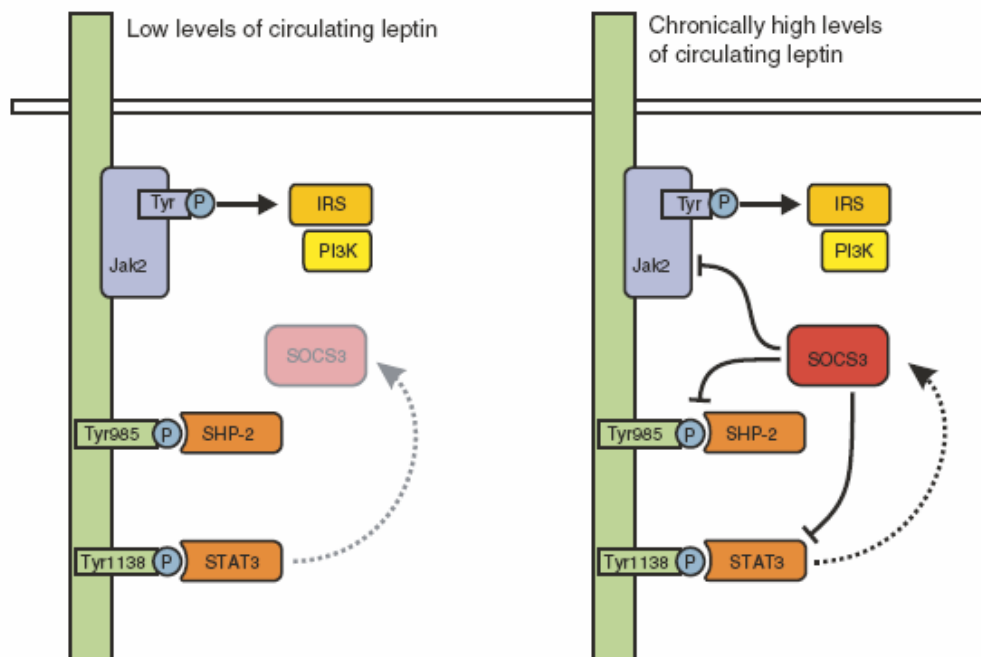


Figure 9 : Mécanisme intracellulaire de résistance à la leptine.

La leptine se fixe à son récepteur et entraîne la phosphorylation des tyrosines associées à Jak2. Une cascade de réactions mène à la phosphorylation de STAT3 (induisant la réponse du neurone à la leptine) mais également à la transcription de SOCS3, qui inhibe en retour la phosphorylation de STAT3.

Dans le cas de faible taux de leptine circulante, la transcription de SOCS3 reste faible et STAT3 peut être re-phosphorylé (la cellule reste activable). Si les taux de leptine sont chroniquement élevés, SOCS3 reste présent dans les neurones et STAT3 ne peut plus être phosphorylé. Le neurone est alors résistant à la leptine.

D'après Munzberg et Myers, 2005.

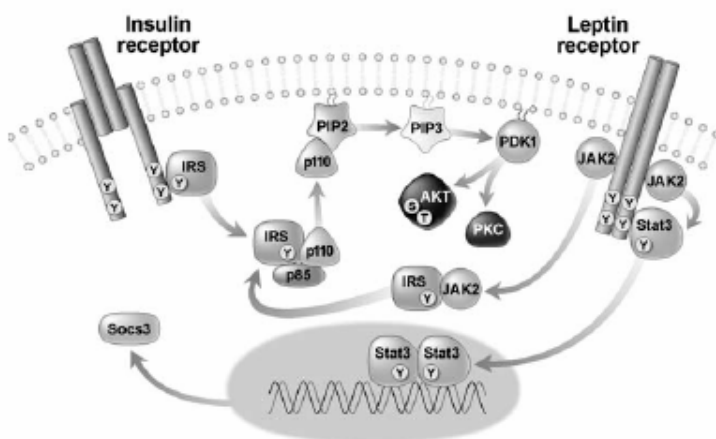


Figure 10 : Voies de signalisation intracellulaires suivant l'activation des récepteurs à la leptine et à l'insuline.

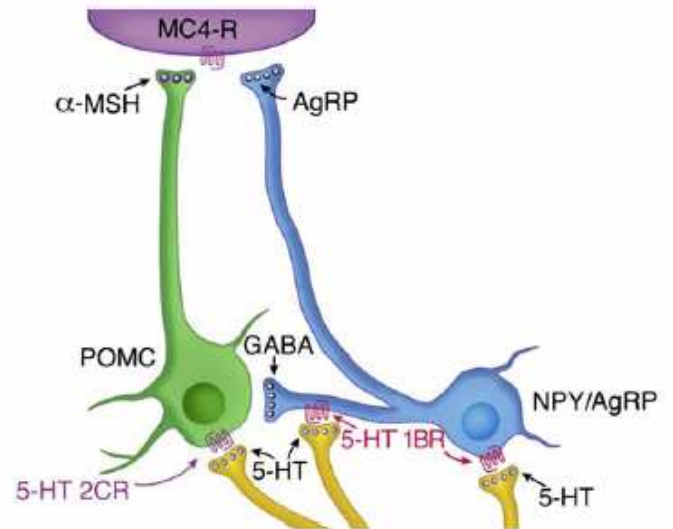
L'activation des récepteurs à la leptine et à l'insuline se traduit par la mobilisation de voies communes au niveau intracellulaire.

D'après Niswander et Schwartz, 2003.

Figure 11 : Modulation des neurones POMC et NPY par les afférences sérotoninergiques.

La sérotonine active triplement les neurones POMC : dépolarisation directe par le biais de récepteur membranaire, inhibition des neurones NPY et du tonus inhibiteur des neurones GABA sur les neurones POMC.

La sérotonine favorise donc la sécrétion d' α -MSH sur celle d'AgRP dans les régions de projections de ces neurones.
D'après Heisler et al., 2006.



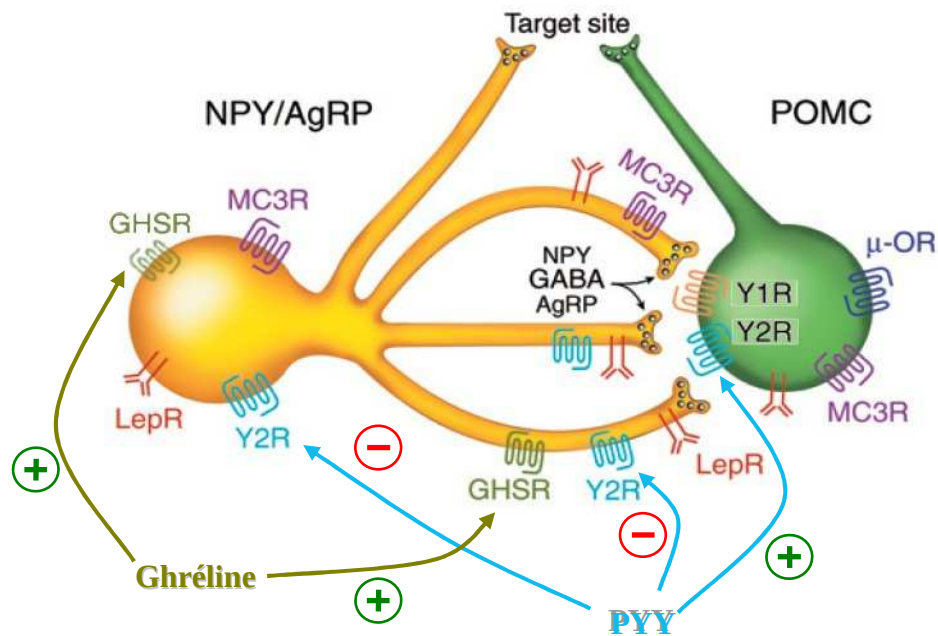


Figure 12 : Effets opposés de la ghréline et du PYY sur les neurones POMC et NPY.
 La ghréline active les neurones NPY et inhibe les neurones POMC par activation du tonus GABAergique. Le PYY a l'effet inverse : il inhibe les neurones NPY et le tonus GABAergique et active les neurones POMC.
Adapté d'après Cone, 2005.

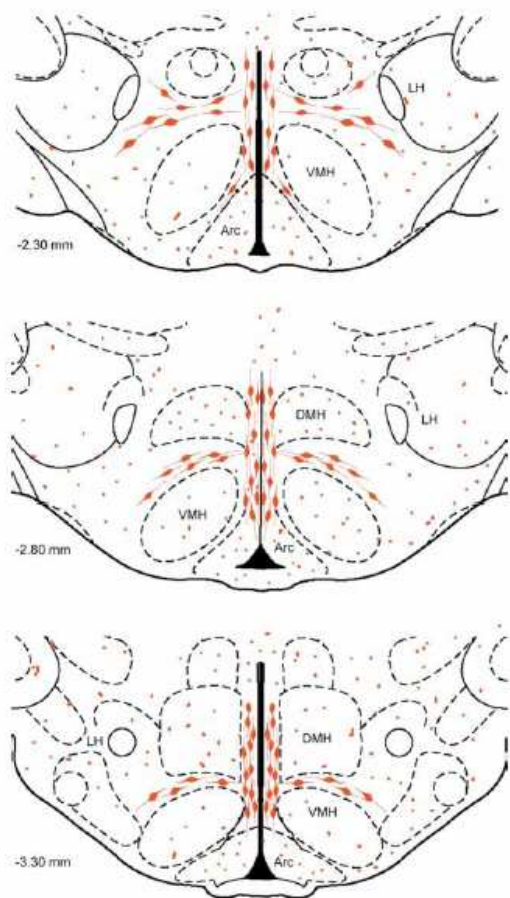


Figure 13 : Localisation des corps cellulaire des neurones ghréline dans l'hypothalamus.

Les neurones ghréline occupent une place originale dans l'hypothalamus puisqu'ils n'appartiennent à aucun noyau traditionnellement défini.

Ils occupent en effet les espaces entre les différents noyaux.

D'après Cowley et al., 2003.

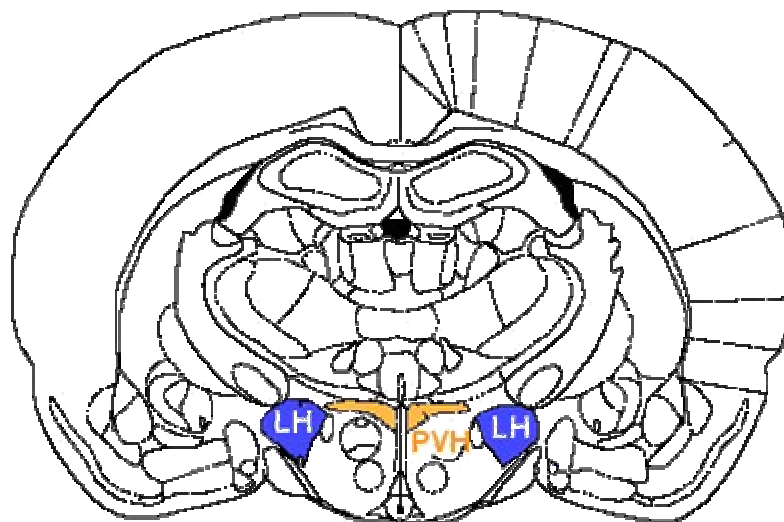


Figure 14 : Position du LH et du PVH chez le rat.

Coupe coronale (Bregma : - 2.12 mm) d'un cerveau de rat représentant la position de l'aire hypothalamique latérale (en bleu) et de l'hypothalamus paraventriculaire (en orange).

Adapté d'après l'atlas de Paxinos et Watson.

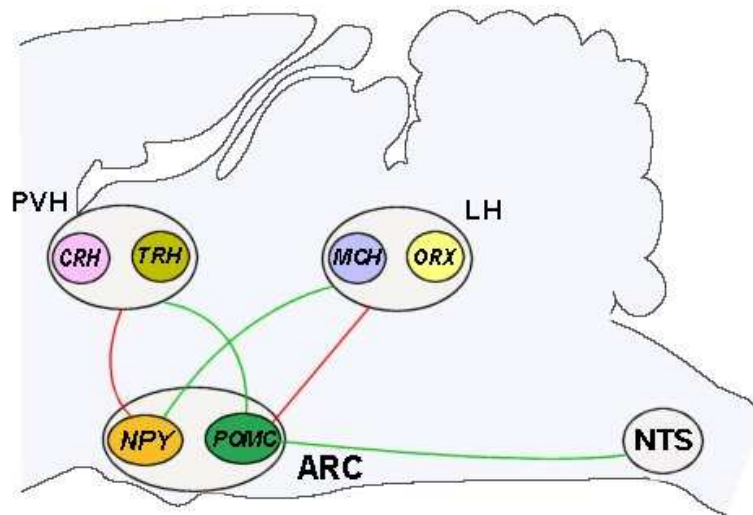


Figure 15 : Principales projections des neurones de l'ARC.

Les neurones NPY et POMC de l'ARC projettent vers différentes régions hypothalamiques ou extra-hypothalamiques, et **activent** (connecteur **vert**) ou **inhibent** (connecteur **rouge**) les neurones de ces régions.

Adapté d'après Jobst et al., 2004.

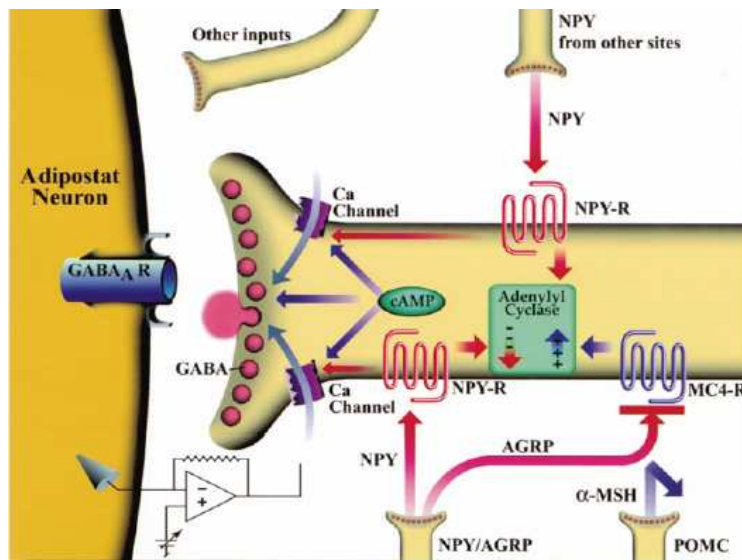


Figure 16 : Schéma illustrant la théorie de l'adipostat au sein du PVH.

Les neurones NPY et POMC projettent vers des interneurons GABAergiques du PVH, qui sont activés par le NPY et/ou l'AgRP et inhibés par l' α -MSH sécrété par les neurones POMC. La libération de GABA favorise alors la mise en réserve au niveau des adipocytes.

D'après Cowley et al., 1999.

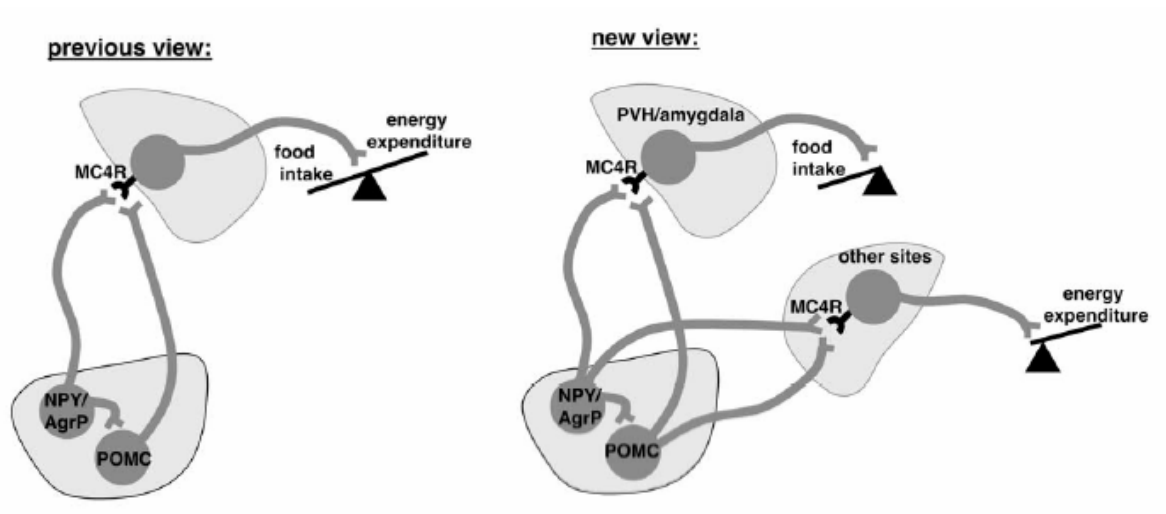


Figure 17 : Divergence des voies mélanocortiques concernant la prise alimentaire et la dépense énergétique.

Contrairement aux hypothèses précédemment formulées (figure 16) les neurones POMC ne régulent pas la dépense énergétique en modulant l'activité des neurones du PVH, mais d'autres régions qui n'ont pas encore été identifiées. L'activation du PVH ne concerne que la régulation anorexigène du comportement alimentaire.

D'après Balthasar et al., 2005.

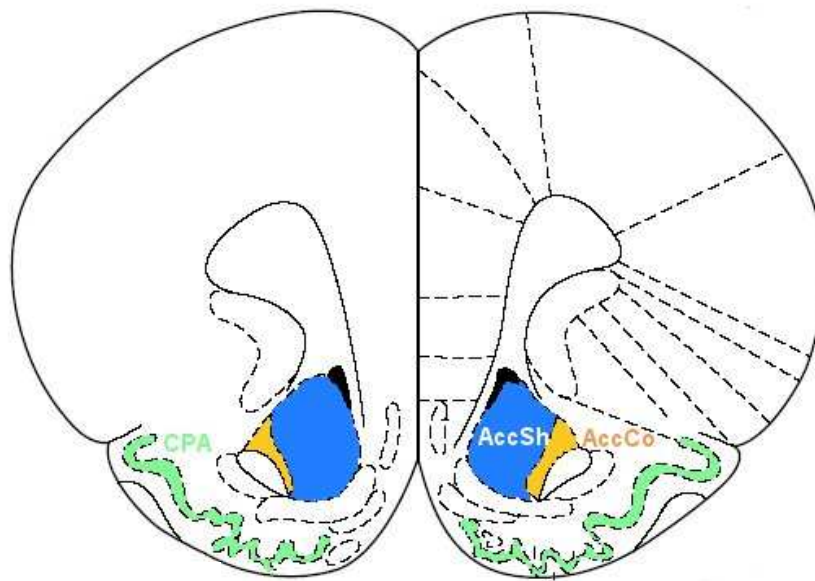


Figure 18 : Position des noyaux accumbens et du cortex pyriforme antérieur chez le rat.

Coupe coronale (Bregma : + 2.70 mm) d'un cerveau de rat représentant la position des noyaux shell (en bleu) et core (en orange) de l'accumbens ainsi que du cortex pyriforme antérieur (en vert).

Adapté d'après l'atlas de Paxinos et Watson.

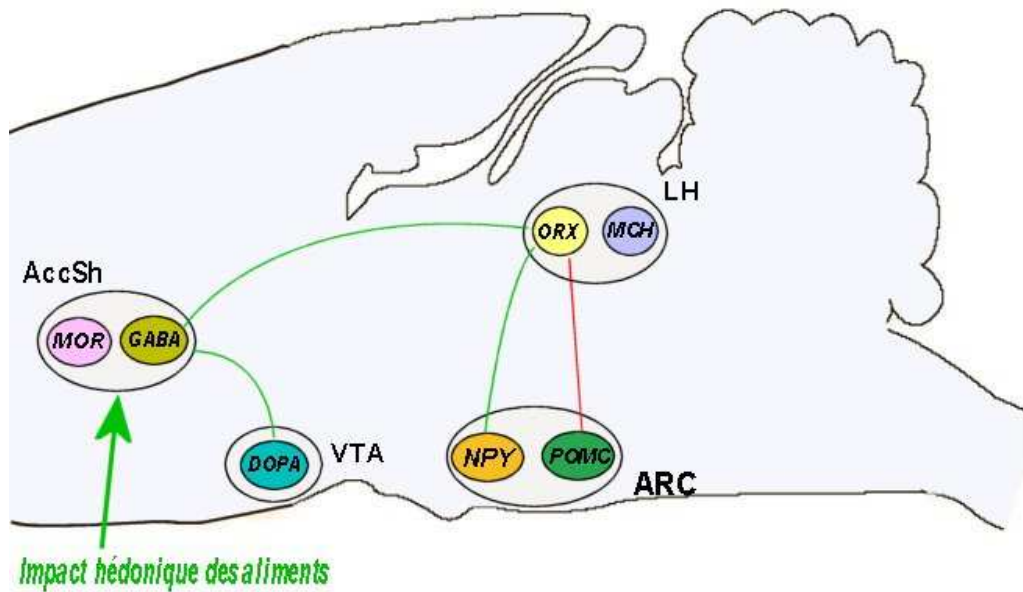


Figure 19 : Principaux circuits de l'hédonisme.

Les neurones de l'AccSh reçoivent des projections corticales ou des régions olfactives quant à la valeur hédonique des aliments relative au **liking**. Les neurones opioïdes (MOR) et GABA sont activés. Ils **activent** (connecteur **vert**) alors à leur tour les neurones orexines du LH qui **activent** les neurones NPY NPY et/ou **inhibent** (connecteur **rouge**) les neurones POMC de l'ARC.

Les neurones dopamine du VTA **activent** ces mêmes neurones de l'AccSh en réponse à la valeur de l'hédonisme relative au **wanting**. L'activation des neurones de l'AccSh entraîne la même réponse que dans le cas du **liking**.

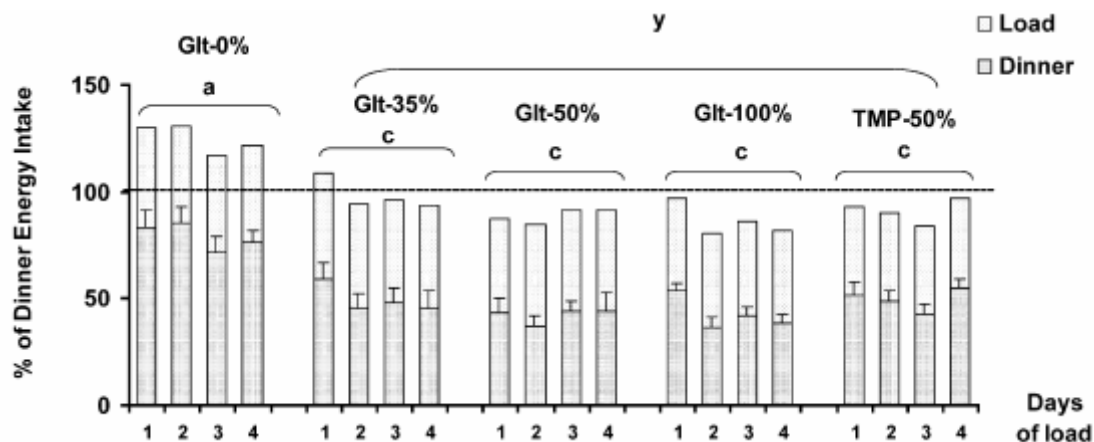


Figure 20 : Dépression de la prise alimentaire induite par une charge protéique par rapport à une charge glucidique.

Une charge hyperprotéique de gluten ou de protéines de lait (TMP-50%) est plus satiétogène qu'une charge d'amidon (Glt- 0%).

c : $P < 0.01$ vs. Glt-0%.

D'après Bensaid et al., 2002.

	No-Load	High-Protein Omelette		High-Fat Omelette	
		Large	Small	Large	Small
Preload energy intake (Kcal)	0	404	202	720	360
Test meal energy intake (Kcal)	1803 (61)†	1006 (140)	1218 (101)	1089 (80)	1330 (119)
Total energy intake (Kcal)	1803 (61)	1410 (140)*	1420 (101)*	1809 (80)	1690 (119)

Tableau 1 : Dépression de la prise alimentaire induite par un en-cas hyperprotéique par rapport à un en-cas hyperlipidique.

Un en-cas hyperprotéique entraîne une dépression de la prise alimentaire accrue par rapport à un en-cas hyperlipidique.

* $P < 0.01$ par rapport au high fat et au no-load

D'après Porrini et al., 1997.

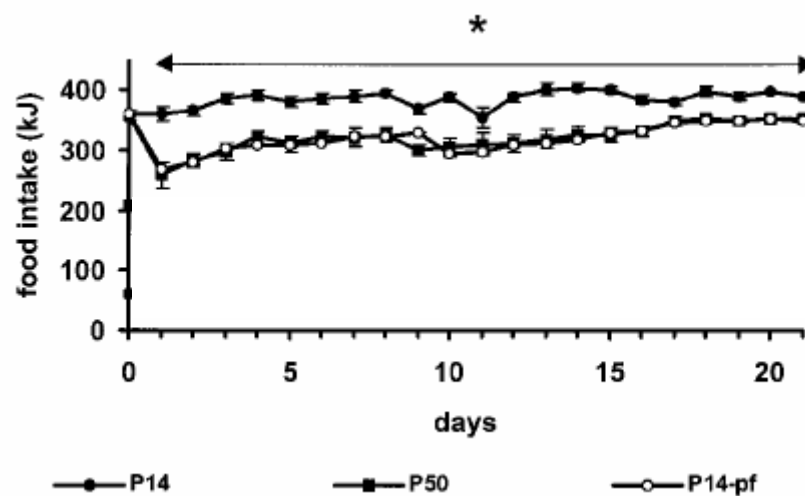


Figure 21 : Dépression de la prise alimentaire induite par un régime hyperprotéique.

Dès le premier jour, les animaux nourris avec un régime HP (P50) réduisent leur prise alimentaire. Cette dépression de la prise alimentaire s'atténue les jours suivant sans pour autant rattraper la consommation des animaux nourris en régime NP (P14).

(P14-pf : groupe nourris en P55 avec la même quantité d'énergie que le groupe P14)

D'après Jean et al., 2001.

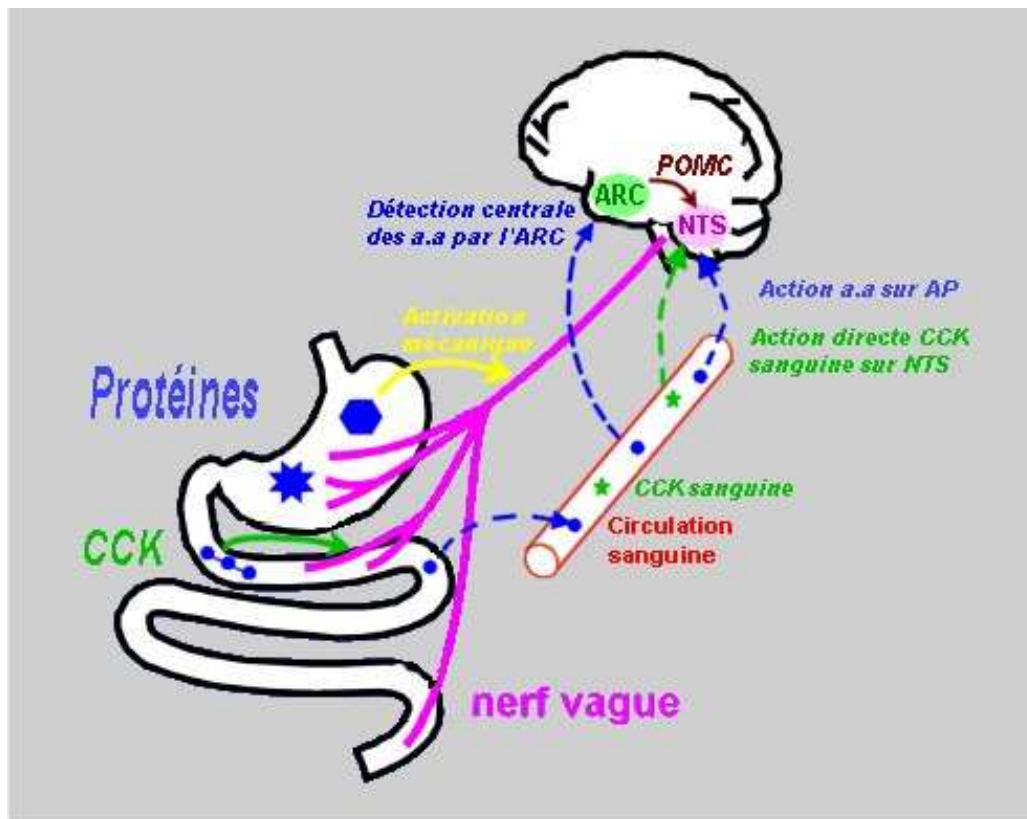


Figure 22 : Schéma résumé de l'action des protéines sur le NTS.

Les protéines activent le NTS par 4 voies :

- stimulation des mécanorécepteurs gastriques
- sécrétion de CCK qui active les afférences vagales et/ou active directement le NTS par voie sanguine
- action centrale directe des acides aminés sanguins (entrée par l'AP)
- voie descendante suite à l'activation des neurones POMC de l'ARC qui projettent vers le NTS

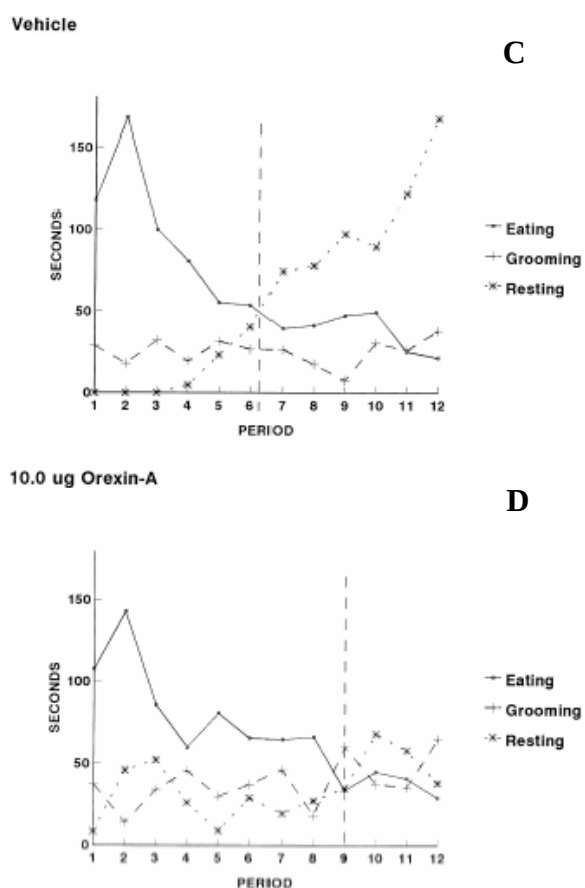
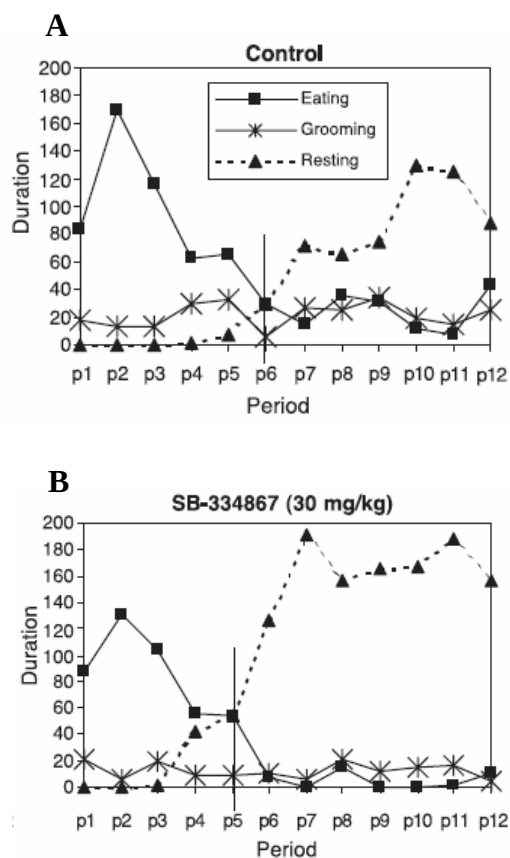


Figure 23 : Détermination de la vitesse de la séquence comportementale de satiété (BSS).

Un stimulus anorexigène (ici le SB-334867, antagoniste de l'orexine A) accélère la transition entre le repas et le repos (A et B), alors qu'un stimulus orexigène (injection d'orexine A) ralentit ce phénomène (C et D).

D'après Rodgers et al., 2000 et Ishii et al., 2004.

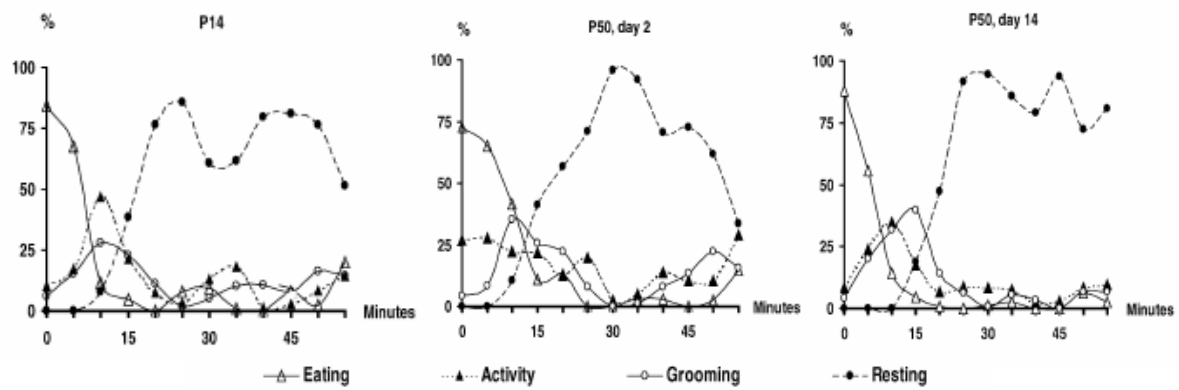


Figure 24 : Séquence comportementale de satiété sous régime hyperprotéique.

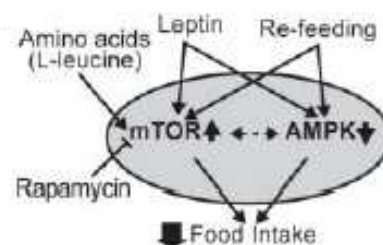
Dès le deuxième jour, les rats nourris en régime HP présentent une séquence comportementale de la satiété très similaire à celle de rats nourris en régime NP, montrant l'absence d'aversion gustative conditionnée.

D'après Bensaid et al., 2003.

Figure 25 : Interaction leucine/mTOR dans les neurones de l'ARC.

L'activation du mTOR par la hausse centrale des teneurs en leucine dans les neurones NPY et POMC de l'ARC est corrélée à une forte dépression de la prise alimentaire.

D'après Cota et al., 2006.



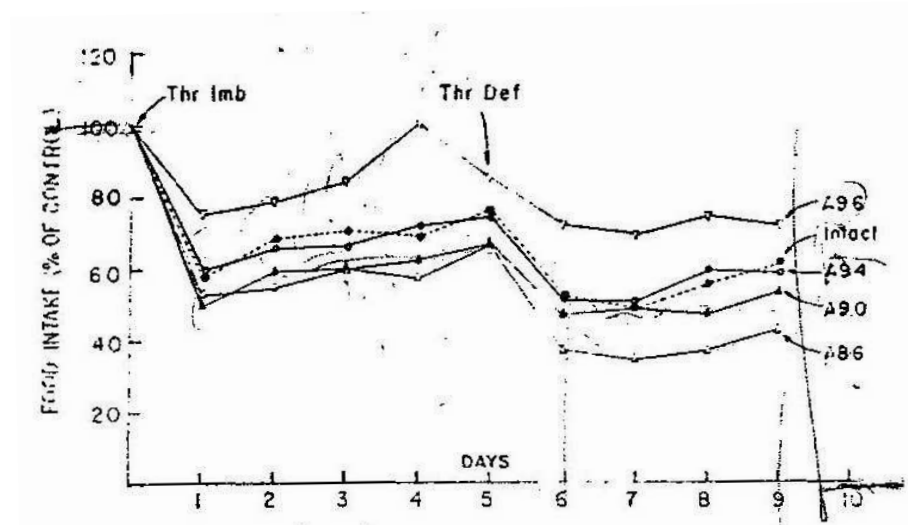


Figure 26 : Effet d'une lésion électrolytique du CPA sur la détection des régimes déficients en AAI.

Les rats lésés dans la partie la plus antérieure du CPA (A 9.6) consomment dès le premier jour une quantité plus importante d'un régime déficient en thréonine.
D'après Leung et Rodgers, 1971.

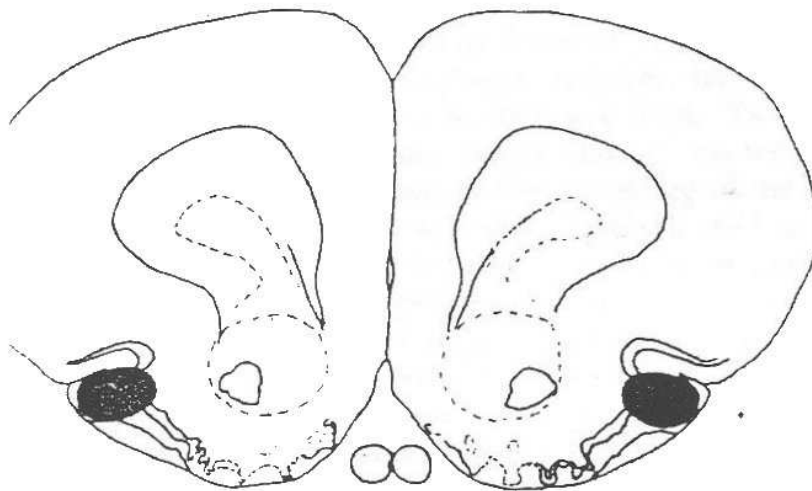


Figure 27 : Emplacement des lésions fonctionnelles du CPA chez le rat.

D'après Leung et Rodgers, 1971.

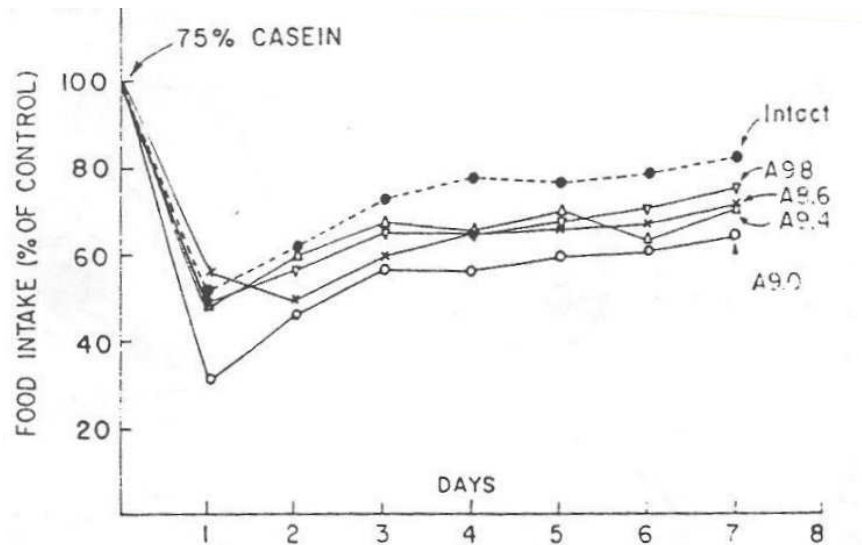


Figure 28 : Effet d'une lésion électrolytique du CPA sur la détection des régimes hyperprotéiques.

Les rats lésés au niveau du CPA n'augmentent pas leur prise alimentaire sous régime hyperprotéique par rapport aux rats non lésés.

D'après Leung et Rodgers, 1971.

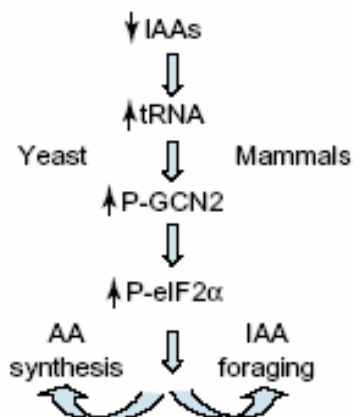


Figure 29 : Mécanisme intracellulaire de détection des carences en AAI.

La baisse des teneurs centrales en AAI provoque l'augmentation des concentrations des ARN de transfert non chargé (ARNt) correspondant à l'acide aminé déficient. S'en suit une série de phosphorylations qui aboutissent chez les mammifères, à l'activation des neurones du CPA. Ce mécanisme est conservé chez tous les eukaryotes

D'après Gietzen, 2006.

A

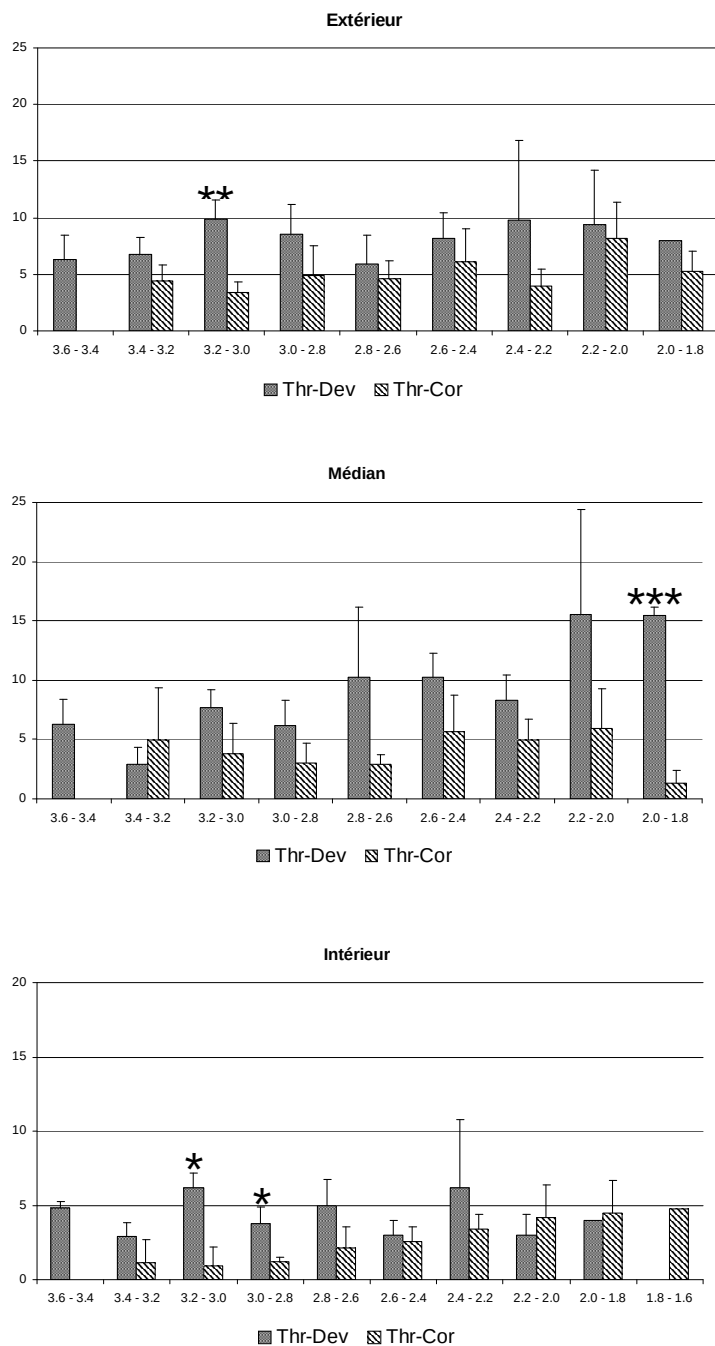


Figure 30 : Activation du CPA par un régime Thr-Dev.

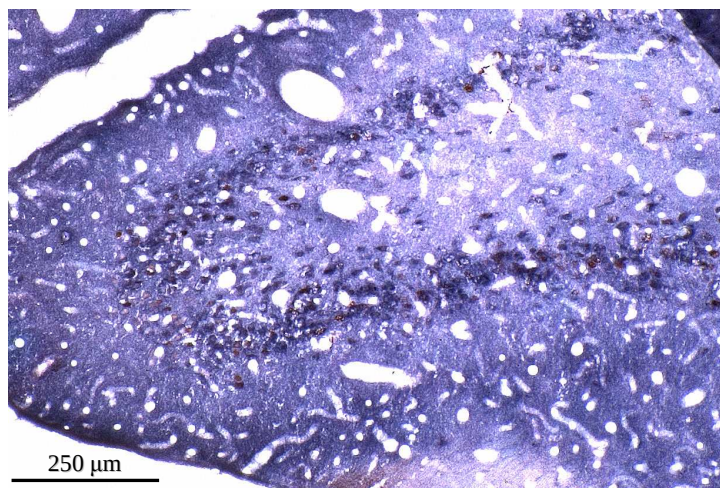
A : Un repas Thr-Dev active les neurones EAAC1 (transporteur du glutamate) dans différentes parties du CPA.

(cf Article 4 pour description des segmentations)

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$

B : Coupe coronale du CPA montrant la révélation des neurones c-fos (noyau marron) et EAAC1 (cytoplasme bleu).

B



	FOS	GABA	μ-MOR1
P14	++++	+++	++++
P55A	(+)	+	(+)
P55C	+	+	+

Tableau 2 : Activation des neurones GABA et μ-opioïdes de l'AccSh suite à un repas hyperprotéique.

Les repas hyperprotéiques diminuent l'activation des neurones GABA et μ-opioïdes (μ-MOR1) situé dans l'AccSh, ainsi que l'activation Fos de cette région.

Comptage qualitatif.

(+) : <5 neurones

+: 5-10 neurones

+++ : 20-50 neurones

++++ : > 50 neurones

Tableau 3 : Consommation d'eau pendant et avant l'ingestion d'une charge hyperprotéique de levure ou de lait.

Les rats ne présentent pas de différence significative de consommation d'eau pendant l'ingestion d'une charge pour les différents régimes testés.

Pour contrôle, ces consommations sont également similaires durant la période à jeun (6 heures) précédant le repas.

	Charge		
	P14	P55	P55lev
Consommation d'eau pendant la période à jeun précédant la charge (g)	2.3 $\pm$ 0.3	3.0 $\pm$ 0.8	3.5 $\pm$ 0.9
Consommation pendant l'ingestion de la charge (g)	1.0 $\pm$0.3	0.7 $\pm$0.2	1.3 $\pm$0.2

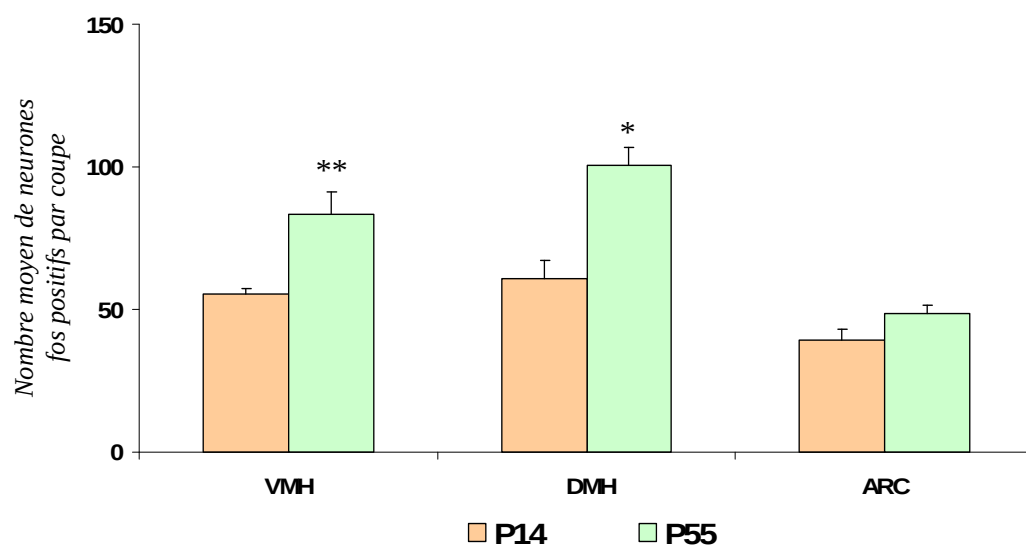


Figure 31 : Activation c-fos du VMH, du DMH et de l'ARC par un repas hyperprotéique.

* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$

Mémoire de DAA R. Faipoux.

	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	↑	↓	→

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

Figure 32 : Activation de différentes régions du CNS en régime hyperprotéique.
D'après Darcel et al., 2005.

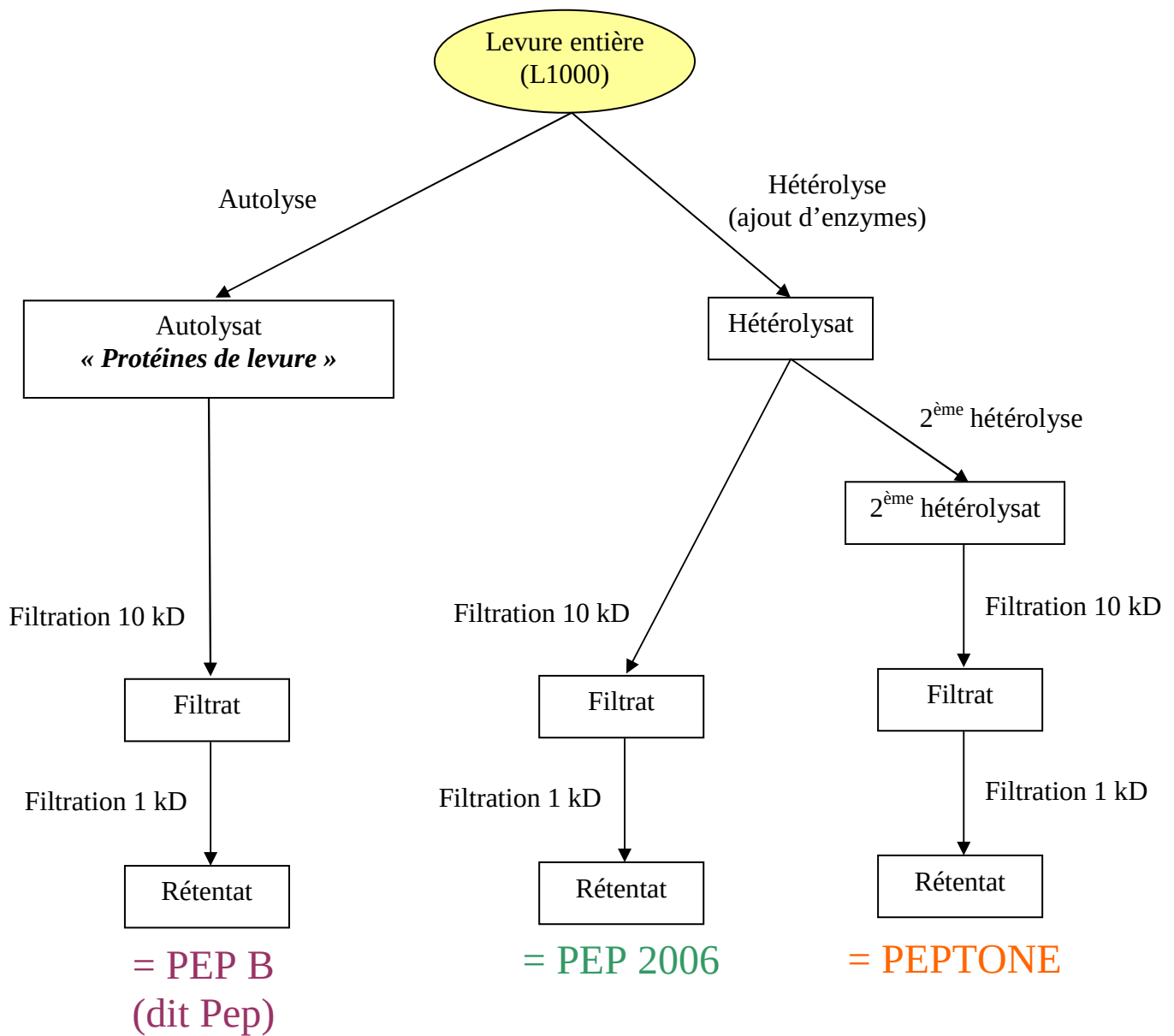


Figure 33 : Procédés d'obtention des trois fractions peptidiques à partir des protéines de levure.

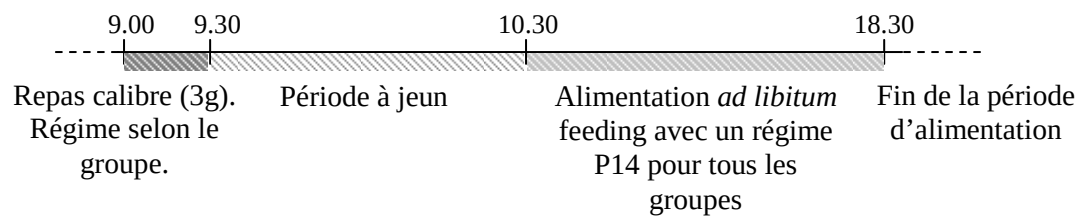


Figure 34 : Protocole alimentaire suivis par les animaux dans l'article 3.

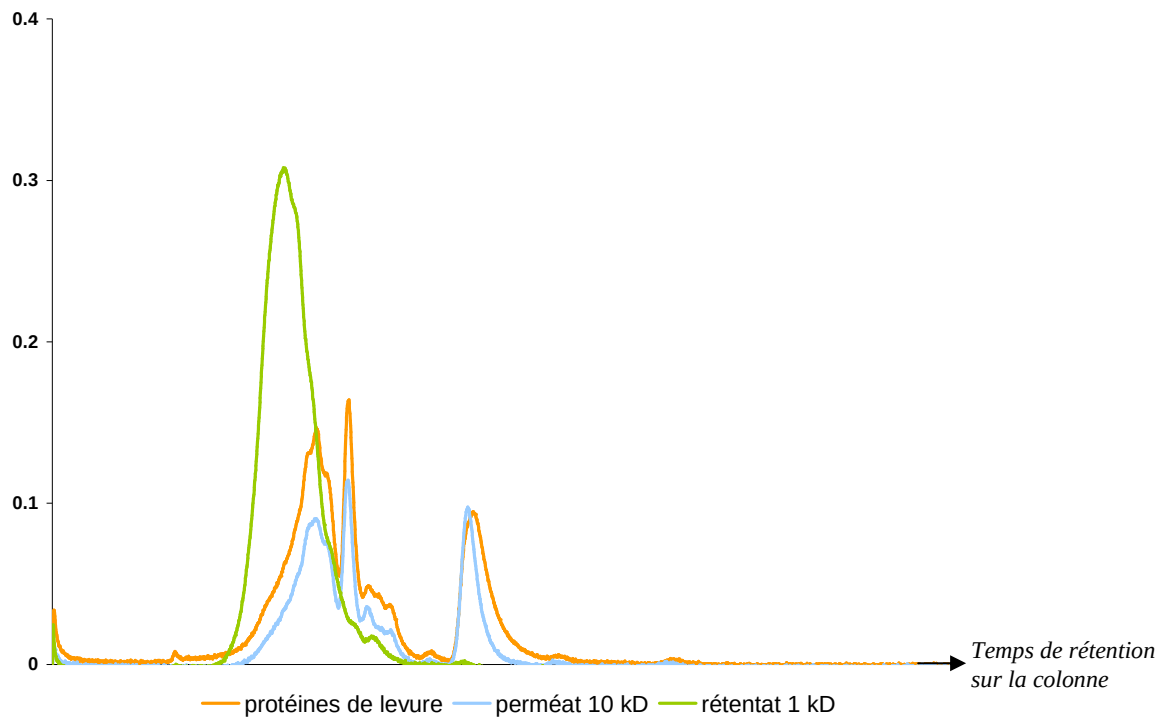


Figure 35 : Chromatogrammes des différentes étapes de purification des peptides.

Le perméat (en bleu) obtenu suite à la filtration à 10 kD de l'extrait initial de protéines de levure (en orange) ne contient plus les molécules de taille importante comme les glucides complexes. A l'issue de la seconde filtration, le rétentat (en vert) comprend un concentré des fractions peptidiques comprises entre 1 et 10 kD : *c'est la fraction appelée peptides de levure.*

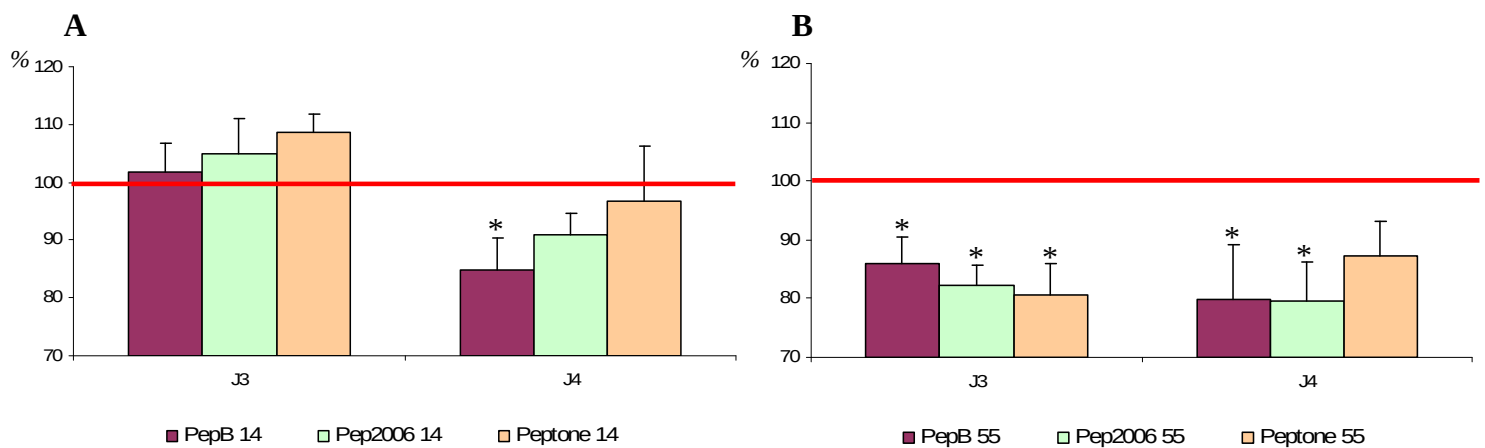


Figure 36 : Consommation relative une heure après l'ingestion de charges normo (A) ou hyperprotéiques (B) des différents peptides de levure testés.

* $p < 0.05$ (t-test vs 100%).

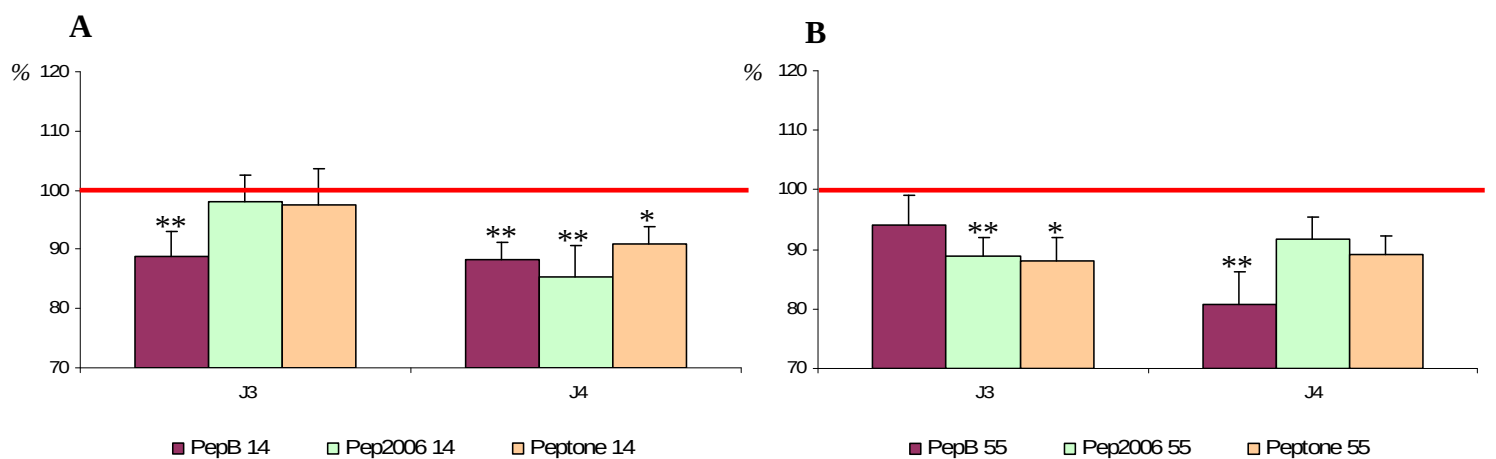


Figure 37 : Consommation relative trois heures après l'ingestion de charges normo (A) ou hyperprotéiques (B) des différents peptides de levure testés.

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ (t-test vs 100%).

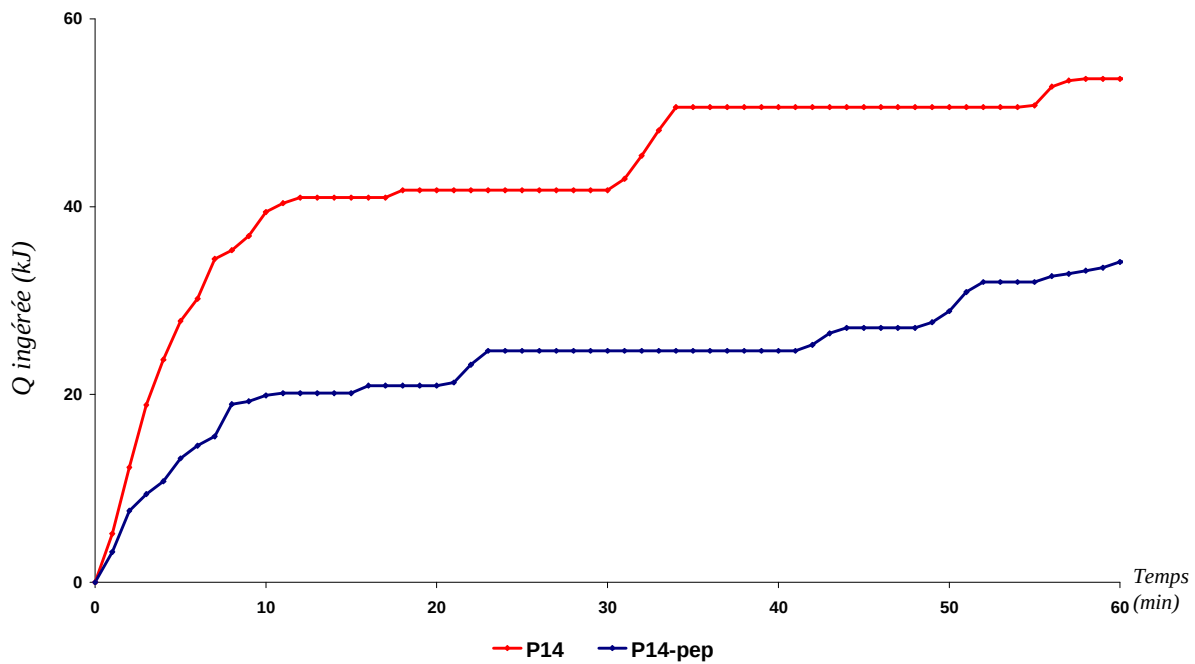


Figure 38 : Evolution de la consommation cumulée pendant la première heure suivant l'ingestion d'une charge de peptides de levure ou de protéines de lait.

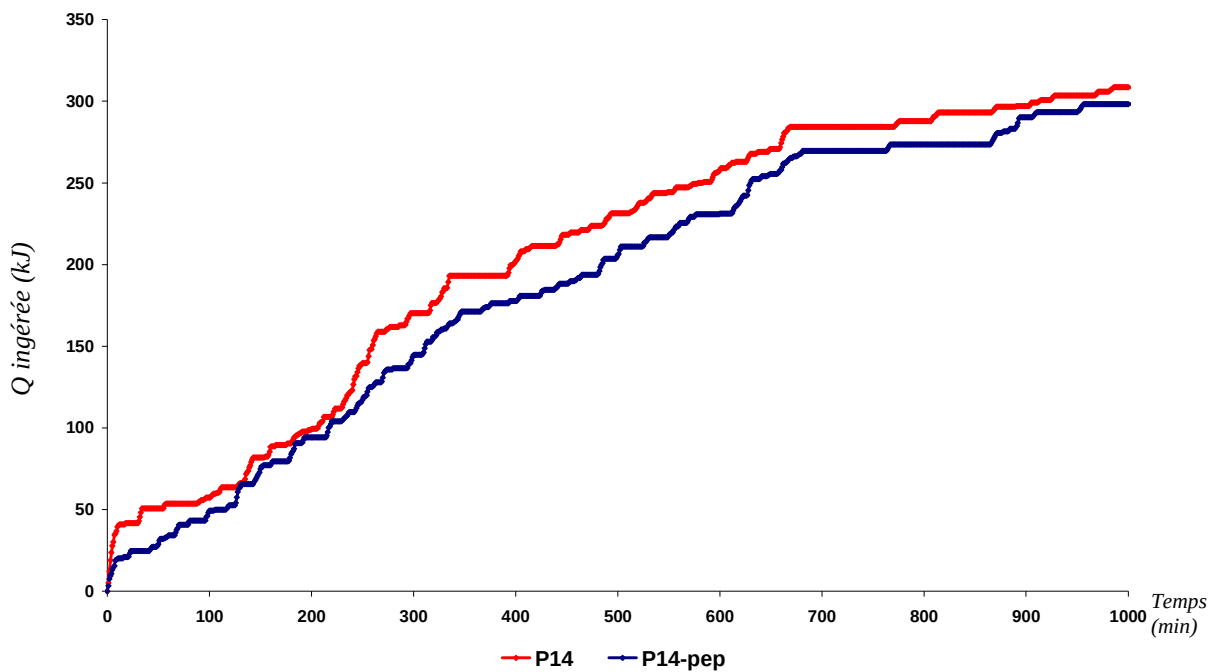


Figure 39 : Evolution de la consommation cumulée pendant toute la journée suivant l'ingestion d'une charge de peptides de levure ou de protéines de lait.

	P14	P14-pep
Nombre de bouffées	10.8 ± 1.2	6.5 ± 1.2 **
Durée de chaque bouffée (min)	0.3 ± 0.0	0.3 ± 0.0
Repas (kJ)	3.8 ± 0.4	3.4 ± 0.4
Vitesse d'ingestion (kJ/min)	15.6 ± 1.4	13.6 ± 1.4
Energie ingérée (kJ)	41.7 ± 6.1	21.5 ± 4.8 ***

Tableau 4 : Paramètres de consommation des 15 premières minutes suivant l'ingestion d'une charge de peptides de levure ou de protéines de lait.

** p<0.01 ; *** p<0.001.

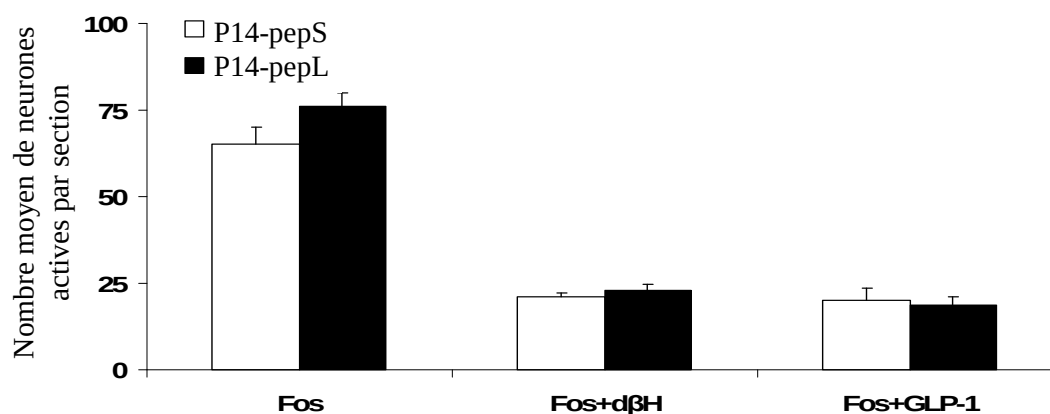


Figure 40 : Activation du NTS suivant un repas normoprotéique de levure.

Un repas de peptides de levure n'active pas le NTS en général, ni les neurones noradrénergiques ou GLP-1 de cette région.

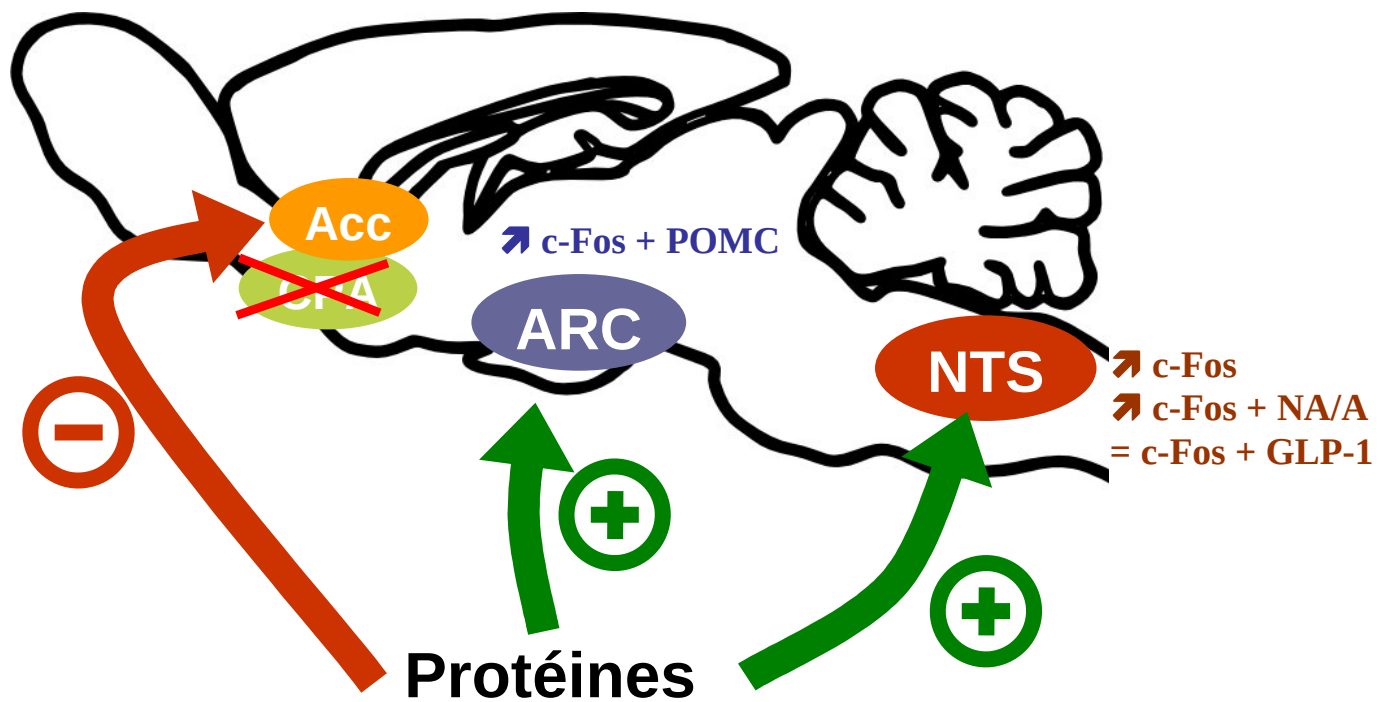


Figure 41 : Schéma récapitulatif de l'activation du CNS par un repas hyperprotéique.

Un repas hyperprotéique active conjointement le NTS et les neurones POMC de l'ARC, tout en inhibant le noyau accumbens, alors que le CPA n'est pas un point d'entrée de la signalisation centrale des protéines.

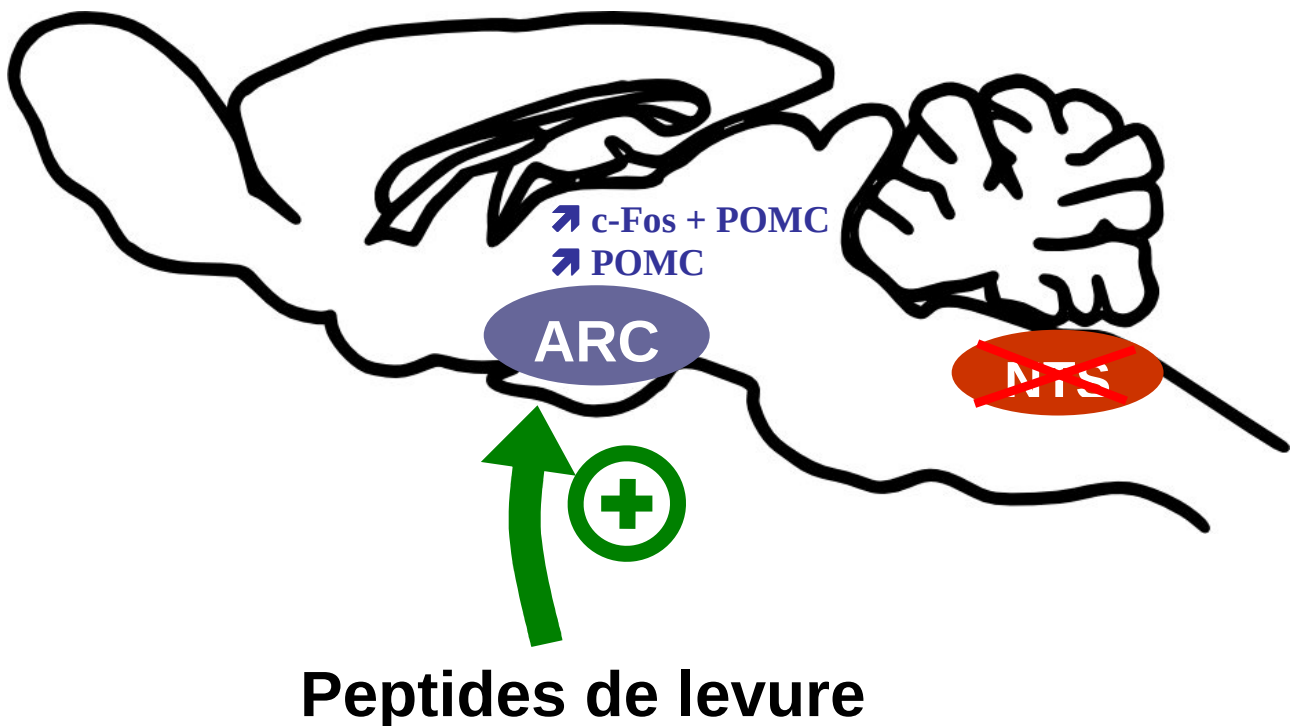


Figure 42 : Schéma récapitulatif de l'activation du CNS par un repas de peptides de levure.

Un repas de peptides de levure active les neurones POMC de l'ARC, alors que le NTS n'est pas un point d'entrée pour la signalisation centrale de ces extraits.

Titre : Caractérisation de l'effet satiétogène des protéines et mécanismes centraux impliqués.
Cas particulier des protéines et peptides de levure.

Résumé : Le rôle des protéines dans la prise alimentaire et en particulier la caractérisation de son effet satiétogène ont fait l'objet de nombreuses études ces dernières années. Si le caractère sur-satiétogène des protéines par rapport aux autres macronutriments est avéré, les mécanismes mis en jeu dans l'apparition de cet effet demeurent cependant incertains et sujet à débat. En outre, la modulation de l'effet satiétogène en fonction de la nature des protéines utilisées et son effet sur les mécanismes d'action demeurent controversés. L'objectif de ce travail est d'étudier dans un premier temps l'activation de certaines régions du système nerveux central connues pour être impliquées dans la régulation du comportement alimentaire suite à l'ingestion de protéines, après avoir fait état des données bibliographiques quant au rôle et au fonctionnement de ces régions. Dans un second temps, nous avons étudié l'effet satiétogène induit par des extraits de protéines de levure spécifiques, développés par la société Bio-Springer, ainsi que leur effet sur l'activation du système nerveux central. Nos résultats montrent que les protéines en général activent des régions contrôlant la prise alimentaire à court et à moyen terme, en particulier les neurones noradrénergiques du noyau du tractus solitaire, ainsi que les neurones mélanocortiques du noyau arqué de l'hypothalamus. Cette activation s'accompagnerait d'une relative inhibition des réseaux de l'hédonisme associés à la palatabilité des aliments. En outre, les protéines n'activent pas le cortex pyriforme antérieur, région capable de détecter les carences en acides aminés essentiels. Concernant les protéines et peptides de levure, ces extraits ont exprimé un pouvoir satiétogène supérieur à celui obtenu avec les sources protéiques traditionnellement utilisées, à la fois chez le rat et chez l'Homme. Dans le cas des peptides de levure, cette diminution de la prise alimentaire se poursuit même après habitude à moyen terme. Cet effet satiétogène va de pair avec une activation plus importante des réseaux mélanocortiques du noyau arqué de l'hypothalamus. Malgré des effets satiétogènes d'ampleur similaire, protéines et peptides de levure ont manifestement des mécanismes d'action différents.

Mots-clés : régime hyperprotéique, peptides de levure, système nerveux central, satiété.

Abstract: The involvement of proteins in regulation of energy intake and especially their potency in inducing satiety has been extensively studied lately. The fact that among macronutrients proteins are the most potent in reducing energy intake is widely acknowledged but mechanisms underlying this effect are mostly controversial or unknown. In addition, the impact of the nature of the proteins used on this effect remains unclear. The purpose of this work is to study in a first part the activation of brain areas known to be involved in regulation of energy intake, after describing the bibliographic data regarding these networks. In a second part, we studied the anorectic effect of yeast extracts developed by Bio-Springer and their action on central nervous system. Our results show that proteins activate areas that regulate short and mid-term energy intake and especially noradrenergic pathway in the nucleus of the solitary tract and melanocortin pathway in the arcuate nucleus of the hypothalamus. This effect would appear along with an inhibition of neuronal pathway linked to the hedonic value of the food, and specifically the palatability. Moreover, proteins do not trigger the anterior pyriform cortex, a brain area known to be able to detect amino acid deficiency. Regarding yeast proteins and peptides, we showed that these extracts induce a stronger anorectic response than other proteins both in rat and in Human, and yeast peptides reduce daily energy intake even after habituation. This anorectic effect occurs along with a stronger activation of melanocortin pathway in the arcuate nucleus of the hypothalamus. Despite similar anorectic effects, yeast proteins and peptides presumably have different mechanisms of action.

Key words: high protein diet, yeast peptides, central nervous system, satiety.