



**HAL**  
open science

# Détection portale des nutriments et contrôle de l'homéostasie énergétique par l'axe nerveux intestin-cerveau

Filipe de Vadder

► **To cite this version:**

Filipe de Vadder. Détection portale des nutriments et contrôle de l'homéostasie énergétique par l'axe nerveux intestin-cerveau. Endocrinologie et métabolisme. Université Claude Bernard - Lyon I, 2014. Français. NNT : 2014LYO10113 . tel-01058661

**HAL Id: tel-01058661**

**<https://theses.hal.science/tel-01058661v1>**

Submitted on 27 Aug 2014

**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.

N° d'ordre 113-2014

Année 2014

THESE DE L'UNIVERSITE DE LYON

Délivrée par

L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1

ECOLE DOCTORALE BMIC

DIPLOME DE DOCTORAT

(arrêté du 7 août 2006)

soutenue publiquement le 30 juin 2014

par

M. DE VADDER Filipe

TITRE :

**Détection portale des nutriments et contrôle de l'homéostasie énergétique par l'axe nerveux intestin-cerveau**

Directeur de thèse : M. Gilles MITHIEUX

JURY : Mme Agnès BERNET, présidente du jury  
M. Christophe MAGNAN, rapporteur  
M. Hervé BLOTTIÈRE, rapporteur  
M. Patrice CANI, examinateur  
M. François LEULIER, examinateur  
M. Gilles MITHIEUX, directeur de thèse



# UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

## Président de l'Université

Vice-président du Conseil d'Administration

Vice-président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire

Vice-président du Conseil Scientifique

Directeur Général des Services

**M. François-Noël GILLY**

M. le Professeur Hamda BEN HADID

M. le Professeur Philippe LALLE

M. le Professeur Germain GILLET

M. Alain HELLEU

## ***COMPOSANTES SANTE***

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard

Directeur : M. le Professeur J. ETIENNE

Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles Mérieux

Directeur : Mme la Professeure C. BURILLON

Faculté d'Odontologie

Directeur : M. le Professeur D. BOURGEOIS

Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Directeur : Mme la Professeure C. VINCIGUERRA

Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation

Directeur : M. le Professeur Y. MATILLON

Département de formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine

Directeur : M. le Professeur P. FARGE

## ***COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE***

Faculté des Sciences et Technologies

Directeur : M. le Professeur F. DE MARCHI

Département Biologie

Directeur : M. le Professeur F. FLEURY

Département Chimie Biochimie

Directeur : Mme le Professeur H. PARROT

Département GEP

Directeur : M. N. SIAUVE

Département Informatique

Directeur : M. le Professeur S. AKKOUCHE

Département Mathématiques

Directeur : M. le Professeur A. GOLDMAN

Département Mécanique

Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID

Département Physique

Directeur : Mme S. FLECK

Département Sciences de la Terre

Directeur : Mme la Professeure I. DANIEL

UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives

Directeur : M. C. COLLIGNON

Observatoire des Sciences de l'Univers de Lyon

Directeur : M. B. GUIDERDONI

Polytech Lyon

Directeur : M. P. FOURNIER

Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique

Directeur : M. G. PIGNAULT

Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1

Directeur : M. C. VITON

Institut Universitaire de Formation des Maîtres

Directeur : M. A. MOUGNIOTTE

Institut de Science Financière et d'Assurances

Administrateur provisoire : M. N. LEBOISNE



« La science, mon garçon, est faite d'erreurs, mais d'erreurs qu'il est bon de commettre, car  
elles mènent peu à peu à la vérité. »  
Jules Verne, *Voyage au centre de la Terre*

« Le gras, c'est la vie ! »  
Karadoc de Vannes



## Remerciements

Tout d'abord, je souhaite remercier Gilles Mithieux, qui m'a accueilli dans son unité, ce qui a démarré une très belle histoire scientifique et humaine. Je garderai toujours le souvenir des entretiens interminables dans le bureau, des discussions parfois animées (vive les souris axéniques !), mais également des moments partagés autour d'une mousse, qui nous ont fait rigoler plus d'une fois (cher congrès de Heidelberg).

Ma gratitude va également à Agnès Bernet, Hervé Blotière, Christophe Magnan, Patrice Cani et François Leulier, pour avoir accepté de juger cette thèse. En particulier, je remercie Patrice Cani et Agnès Bernet pour avoir suivi mon travail lors des comités de suivi de thèse. Je remercie de même Gabriel Lepousez et Cécile Viollet, qui m'ont offert ma première opportunité de me confronter à la science dans un laboratoire et m'ont formé dans les techniques de neurosciences, ainsi qu'à Hans-Rudi Berthoud, chez qui j'ai fait un stage scientifiquement très enrichissant.

Je voudrais également remercier Fredrik Bäckhed et Petia Kovatcheva, dont le travail en collaboration a permis la publication de mon deuxième article. *Tack* à Fredrik de m'accueillir désormais dans son laboratoire en Suède pour poursuivre ma carrière scientifique.

Merci également à Chantal Watrin, Jérôme Honnorat, Armelle Paquet et Nicolas Gadot, qui ont toujours mis à ma disposition le matériel nécessaire à mes expériences.

Je souhaite également remercier les membres de l'unité 855, pour leur accueil, aide, rires, discussions scientifiques et bons moments lors de ces années. Merci à Carine « chirurgien du tonnerre » et Adeline « toujours dispo pour aider », avec qui j'ai partagé mon bureau et qui m'ont aidé à acquérir mes (quasi-inexistantes) capacités de chirurgien. Merci à mes co-thésardes Jennifer « je ne sais pas contenir mon rire », Daisy « il est fou ce type », Aude « plus fort que moi tu meurs », Julie « brune mais blonde », Sylvie « la poisse », et Flore « oh le pauvre », ainsi qu'à mon seul co-thésard Julien « bande de PQ » pour les moments passés avec vous dans la rigolade ; moments partagés avec Blandine « je ris presque aussi fort qu'Aude », Anne « Titanne », Fanny « j'ai une théorie différente sur ce film », Nicolas « 86 », dont les post-it immortels ornent désormais nos bureaux. Merci aussi à Amandine « je râle mais sans me fâcher », qui a été bien plus qu'une collègue, à Fabienne « chocolate lover » et à Maud « je ne peux arrêter de courir ». Enfin, merci à tous ceux que j'ai cotoyés ces années : Marie-Ange, Anne Delorme et Anne Stefanutti, Armelle, Jean-André, Marta, Monika, Aya... La liste est longue !

Merci à tous les amis qui sont venus me voir à Lyon pendant la thèse : Diego, Pol, Agathe, Julien, Imen et Florent, Vincent. Merci également à tous ceux qui se sont déplacés pour la soutenance. Votre présence à des moments parfois difficiles a été précieuse. Et merci à Pinouz pour m'avoir montré qu'une vie de doctorant n'est pas une vie monacale, mais bien des années de moments légendaires (et de bars introuvables !).

Je voudrais témoigner tout mon amour et ma reconnaissance à ma famille : Maman, je te dois tout, plus que je ne pourrais écrire. *De todo corazón, muchas gracias por haber sido y seguir siendo la mejor*. Shonke, merci d'être un frère exceptionnel et les mots me manquent pour le dire. Votre présence (malgré la distance) et votre éducation m'ont permis d'atteindre ce point. Je vous suis reconnaissant à jamais.

Enfin, je ne peux conclure sans remercier Amandine, qui a été à mes côtés pendant cette thèse. Merci de me soutenir sans faille, même dans les décisions difficiles impliquant ma carrière et notre futur. Il est difficile de dire en quelques lignes toute ma gratitude. Merci tout simplement d'avoir toujours été là pour moi.





## Abréviations

ACTH : *Adrenocorticotropic hormone*, hormone corticotrope

AGCC : Acide gras à chaîne courte

AgRP : *Agouti-related peptide*

AMPK : *AMP-activated protein kinase*, kinase activée par l'AMP

Angptl4 : *Angiopoietin-like protein 4*

AP : *Area postrema*

ARC : *Arcuate nucleus*, noyau arqué

CART : *Cocaine- and amphetamine-regulated transcript*, transcrit régulé par la cocaïne et les amphétamines

CCK : Cholécystokinine

DMN : *Dorsal medial nucleus*, noyau dorso-médian

dmnX : Noyau moteur du nerf vague

DVC : *Dorsal vagal complex*, complexe dorsal vagal

FFAR : *Free fatty acid receptor*, récepteur des acides gras libres

FXR : *Farnesoid X Receptor*

F-1,6-BPase : Fructose-1,6-bisphosphatase

GIP : *Glucose-dependent insulintropic peptide*, peptide insulinothrique dépendant du glucose

GLP-1 : *Glucagon-like peptide 1*

GLP-2 : *Glucagon-like peptide 2*

GHS-R : *Growth-hormone-secretagogue receptor*, récepteur au sécrétagogue de l'hormone de croissance

G6Pase : Glucose-6-phosphatase

IMC : Indice de masse corporelle

LPL : Lipoprotéine lipase

MOR : *Mu-opioid receptor*, récepteur  $\mu$ -opioïde

MSH : *Melanocyte-stimulating hormone*, hormone mélanotrope

mTOR : *Mammalian target of rapamycin*

LHA : *Lateral hypothalamic area*, hypothalamus latéral

NAcc : Noyau accumbens

NGI : Néoglucogénèse intestinale

NO : Monoxyde d'azote

NPY : Neuropeptide Y



NTS : *Nucleus of the solitary tract*, noyau du tractus solitaire  
OLETF : Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty  
OMS : Organisation Mondiale de la Santé  
PBN : *Parabrachial nucleus*, noyau parabrachial  
PEG : Production endogène de glucose  
PEPCK : Phosphoénolpyruvate carboxykinase  
P<sub>i</sub> : Phosphate inorganique  
PIG : Production intestinale de glucose  
POMC : Pro-opiomélanocortine  
PVN : *Paraventricular nucleus*, noyau paraventriculaire  
PYY : Peptide YY  
SGLT3 : *Sodium/glucose transporter 3*, transporteur de glucose et de sodium 3  
SNP : Système nerveux périphérique  
TMA : Triméthylamine  
TMAO : Triméthylamine-*N*-oxyde  
VIP : *Vasoactive intestinal peptide*, peptide vasoactif intestinal  
VLDL : *Very low-density lipoprotein*, lipoprotéine à très faible densité  
VMN : *Ventral medial nucleus*, noyau ventro-médian  
VTA : *Ventral tegmental area*, aire tegmentaire ventrale  
5-HT : 5-hydroxytryptamine (sérotonine)



## Table des matières

<b>AVANT-PROPOS</b> .....	<b>7</b>
<b>DONNÉES BIBLIOGRAPHIQUES</b> .....	<b>10</b>
<b>1. LA PRODUCTION ENDOGÈNE DE GLUCOSE</b> .....	<b>11</b>
1.1 Les voies métaboliques de production .....	11
1.1.1 La glycogénolyse .....	11
1.1.2 La néoglucogenèse .....	12
1.2 Rôles complémentaires des organes producteurs de glucose dans l'homéostasie glucidique .....	13
1.2.1 Le foie .....	13
1.2.2 Le rein .....	13
1.2.3 L'intestin .....	14
<b>2. L'AXE INTESTIN-CERVEAU ET LE CONTRÔLE DE LA PRISE ALIMENTAIRE</b> ..	<b>15</b>
2.1 Innervation de l'intestin par le système nerveux périphérique (SNP) .....	15
2.1.1 L'innervation vagale .....	15
2.1.2 L'innervation sympathique .....	16
2.1.3 Le système nerveux entérique .....	16
2.2 Les hormones gastro-intestinales et la régulation de l'homéostasie énergétique .....	17
2.2.1 La ghréline .....	18
2.2.2 La cholécystokinine .....	18
2.2.3 Le peptide YY .....	19
2.2.4 Le glucagon-like peptide-1 (GLP-1) .....	20
2.2.5 Le glucose-dependent insulintropic peptide (GIP) .....	21
2.2.6 La sérotonine .....	21
2.3 La détection des nutriments et le contrôle de la prise alimentaire par le système nerveux hépato-portal .....	22
2.3.1 La détection des nutriments .....	22
2.3.2 Le glucose portal et la sensation de satiété .....	23
2.3.3 Mécanismes moléculaires de détection du glucose portal .....	23
2.4 Contrôle central de la prise alimentaire .....	24
2.4.1 Intégration des signaux par l'hypothalamus et le tronc cérébral .....	24
2.4.2 L'hypothalamus .....	25
2.4.2.1 Les noyaux impliqués dans la prise alimentaire .....	25
2.4.2.2 Les neurotransmetteurs associés .....	26
2.4.3 Le tronc cérébral .....	27
2.4.3.1 Le complexe dorsal vagal .....	27
2.4.3.2 Le noyau parabrachial .....	28
2.4.4 Le choix alimentaire : la récompense et l'aversion .....	28
2.4.4.1 La récompense .....	29
2.4.4.2 L'aversion .....	30
<b>3. LES RÉGIMES RICHES EN PROTÉINES ET LE RÔLE DES RÉCEPTEURS <math>\mu</math>-OPIOÏDES DANS LA SATIÉTÉ</b> .....	<b>31</b>
3.1 Les effets métaboliques des régimes riches en protéines .....	31
3.1.1 Satiété et induction de la thermogenèse .....	31
3.1.2 Contrôle de l'homéostasie glucidique .....	32
3.1.3 Mécanismes centraux activés par les régimes hyperprotéiques .....	33
3.2 La régulation de la balance énergétique par les récepteurs $\mu$ -opioïdes (MOR) .....	33
3.2.1 Les récepteurs $\mu$ -opioïdes centraux .....	33
3.2.2 Les récepteurs $\mu$ -opioïdes périphériques .....	34
3.3 Les peptides opioïdes .....	34
3.3.1 Les opioïdes endogènes .....	34
3.3.2 Les opioïdes provenant de la protéolyse : une connexion entre la digestion protéique et les MOR ? .....	35
3.4 La néoglucogenèse intestinale, lien entre digestion protéique et satiété .....	36
<b>4. INTERACTIONS FONCTIONNELLES ENTRE LE MICROBIOTE INTESTINAL ET LE MÉTABOLISME DE L'HÔTE LORS DES RÉGIMES RICHES EN FIBRES SOLUBLES</b> .....	<b>37</b>
4.1 Microbiote intestinal et nutrition .....	37
4.1.1 Développement et composition du microbiote intestinal .....	37



4.1.2.	Modulation de la composition du microbiote par l'alimentation.....	38
4.2	Métabolisme bactérien dans l'intestin.....	39
4.2.1.	Contrôle microbien du métabolisme des acides biliaires.....	39
4.2.2.	Métabolisme microbien de la choline.....	40
4.2.3.	Métabolisme microbien des polysaccharides.....	41
4.2.3.1.	Les polysaccharides non solubles.....	41
4.2.3.2.	L'utilisation de substrats provenant de l'hôte.....	41
4.2.3.3.	Le métabolisme des acides gras à chaîne courte (AGCC).....	42
4.3	Le microbiote intestinal et le métabolisme de l'hôte.....	44
4.3.1.	Microbiote et obésité.....	44
4.3.2.	Le microbiote intestinal et la récolte d'énergie.....	45
4.3.3.	Microbiote intestinal et lipogenèse de novo.....	46
4.4	Les AGCC et leurs effets bénéfiques lors des régimes riches en fibres.....	46
4.4.1.	Les régimes riches en fibres.....	46
4.4.2.	Les AGCC et leur rôle sur le métabolisme.....	47
4.4.3.	Les récepteurs des AGCC et leur rôle dans le métabolisme.....	49
<b>RÉSULTATS</b>	.....	<b>51</b>
	Duraffourd, C., De Vadder, F., et al. (2012) <i>Cell</i> 150, 377-388.....	52
	De Vadder, F., et al. (2014) <i>Cell</i> 156, 84-96.....	74
	De Vadder, F., et al. <i>En préparation</i> .....	96
<b>DISCUSSION GÉNÉRALE</b>	.....	<b>109</b>
<b>TRAVAUX PERSONNELS</b>	.....	<b>115</b>
<b>RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b>	.....	<b>118</b>





## **AVANT-PROPOS**



L'obésité correspond, selon la définition de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), à une « accumulation excessive de graisses présentant un risque potentiel pour la santé ». Une personne ayant un indice de masse corporelle (IMC) supérieur ou égal à 30 est considérée comme obèse, alors que le surpoids est défini par un IMC supérieur à 25. Considérée comme un phénomène épidémique par l'OMS depuis 1997, on estimait en 2008 qu'il existait plus d'1,4 milliard d'adultes en surpoids, parmi lesquels 500 millions étaient obèses. L'obésité résulte d'une dérégulation entre dépenses et apports énergétiques, avec la balance penchant nettement vers ces derniers.

Chaque année, 2,8 millions de personnes au moins meurent des conséquences du surpoids ou de l'obésité, avec une prévalence presque doublée entre 1980 et 2008. Problème autrefois réservé aux pays à revenu élevé, l'obésité existe aussi désormais dans les pays à revenu faible ou intermédiaire. À l'échelle mondiale, 44% du diabète, 23% des cardiopathies ischémiques et 7 à 41% de certains cancers peuvent être imputés au surpoids et à l'obésité. La complication majoritaire associée à l'obésité est le diabète de type 2, défini par une glycémie à jeun supérieure ou égale à 126 mg/dL (soit 7,0 mmol/L) et/ou une hémoglobine glyquée (HbA1c) supérieure à 6,5%. Cette maladie s'instaure par le développement d'une résistance à l'action hypoglycémique de l'insuline, compensée dans un premier temps par une hyperinsulinémie permettant le maintien d'une glycémie normale (Martin et al., 1992; Warram et al., 1990). Le passage à l'état diabétique est caractérisé par une diminution de la sécrétion d'insuline par le pancréas et une augmentation de la production hépatique de glucose (Clore et al., 2000; Magnusson et al., 1992).

Parmi les recommandations pour combattre l'épidémie, il a été convenu que la promotion d'une alimentation saine et de l'exercice physique reste la priorité pour les états membres de l'OMS (Plan d'action 2008-2013 pour la Stratégie mondiale de lutte contre les maladies non transmissibles). Dans ce contexte particulier, la relation à l'environnement alimentaire constitue une question d'étude essentielle. Chez l'Homme, cette relation implique des facteurs aussi bien externes (culturels, socio-économiques) qu'internes (physiologiques et psychologiques). Ceci multiplie les stratégies de recherche et d'action visant à réduire la prévalence de l'obésité, en particulier par l'éducation alimentaire. Le risque de devenir obèse est considérablement amoindri en diminuant les apports en lipides, en limitant la consommation de sucres rapides et en réduisant la teneur en sel des aliments. Il est



particulièrement recommandé de consommer davantage de fruits et légumes, ainsi que de légumineuses, de céréales complètes et de fruits secs.

Une amélioration de la qualité de l'alimentation constitue donc un moyen efficace de prévention et lutte contre l'obésité et les maladies métaboliques associées. Parmi les divers régimes reconnus pour leurs effets bénéfiques, nos études ont particulièrement porté sur les régimes riches en protéines et les régimes riches en fibres solubles. Ces régimes sont connus pour leurs effets bénéfiques chez l'Homme (Larsen et al., 2010; Mendeloff, 1977), mais les mécanismes associés à ces améliorations restaient jusqu'alors mal connus.

Dans la première partie de ce manuscrit figure une introduction bibliographique qui décrit tout d'abord la régulation de la production endogène de glucose dans les organes producteurs (foie, rein et intestin); ensuite sont présentés les mécanismes connus de communication entre l'intestin et le cerveau contrôlant la prise alimentaire. Les effets des régimes évoqués précédemment sont décrits par la suite à partir de données bibliographiques.

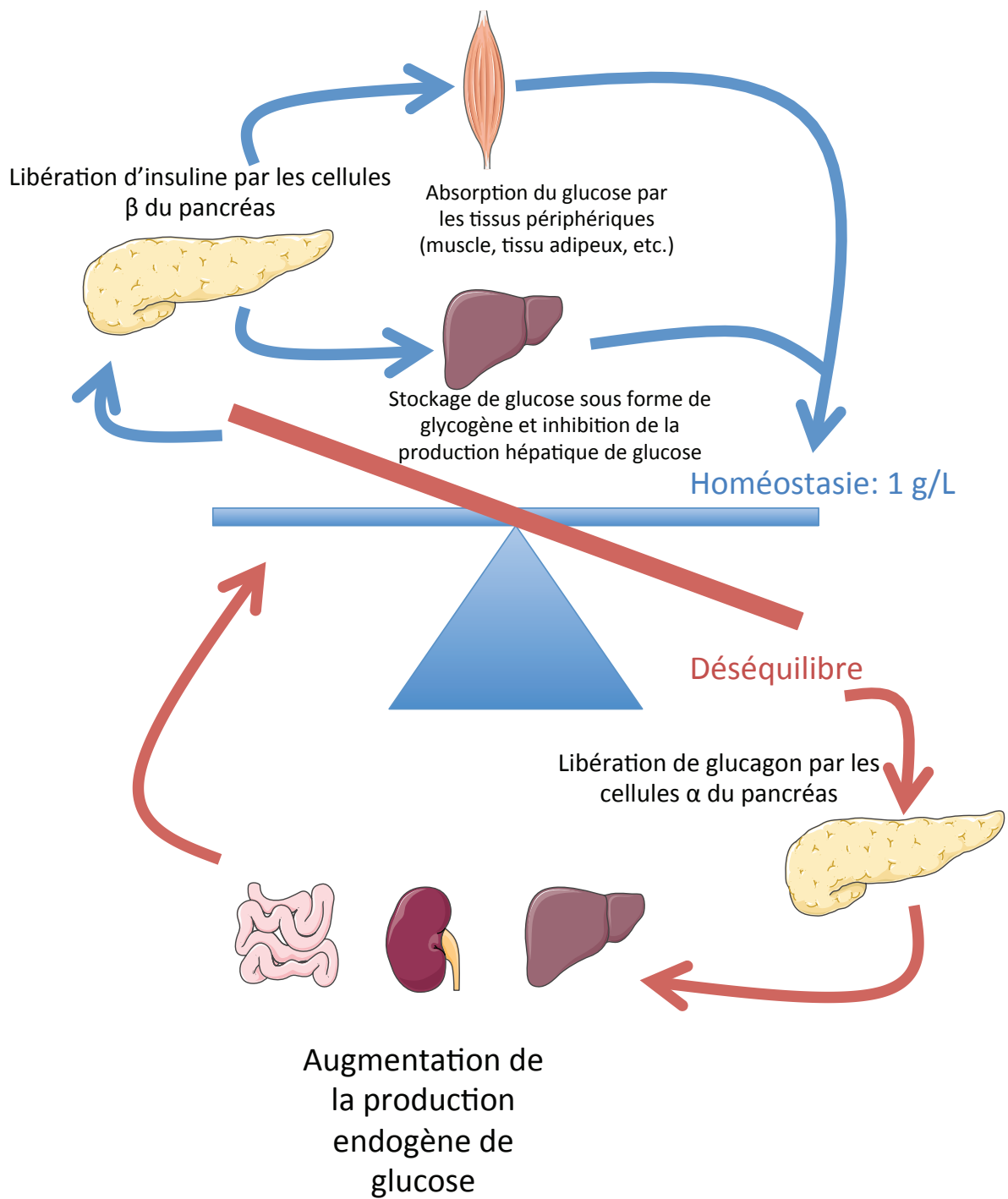
Dans la deuxième partie sont présentés les deux articles publiés pendant mon doctorat, qui proposent des mécanismes physiologiques rendant compte des améliorations métaboliques lors des régimes riches en protéines et en fibres solubles (Duraffourd et al., 2012; De Vadder et al., 2014). Ces études portent particulièrement sur le rôle clé de la production intestinale de glucose dans les améliorations observées. Un troisième article (soumis à ce jour) propose un mécanisme d'activation de la NCI par les neurones entériques lors des régimes précédemment évoqués.

Enfin, dans une troisième partie, une discussion générale analyse les résultats de ces articles en rapport avec d'autres données publiées et ouvre sur les possibilités de poursuite de ces études.



## **DONNÉES BIBLIOGRAPHIQUES**





**Figure 1. L'équilibre glycémique dans l'organisme.**

La glycémie est maintenue stable à une valeur autour de 1 g/L. Lors d'un déséquilibre (hypo- ou hyperglycémique), l'organisme adapte sa réponse, ramenant la glycémie vers l'équilibre.

*(Illustration réalisée avec l'aide de Servier Medical Art)*

# 1. LA PRODUCTION ENDOGÈNE DE GLUCOSE

La concentration plasmatique de glucose est finement régulée par l'organisme autour d'une valeur de 1 g/L (soit 5,56 mmol/L). Le glucose est la source principale d'énergie pour les cellules de l'organisme, permettant notamment le fonctionnement des hématies, du cerveau et des muscles à contraction rapide. L'équilibre glycémique (Figure 1) est notamment le résultat d'une balance entre :

- la consommation de glucose par les organes et le stockage énergétique sous forme de glycogène (glycogénogenèse) et de triglycérides (lipogenèse),
- les apports alimentaires de glucose et la production endogène de glucose d'autre part.

La production endogène de glucose (PEG) permet l'apport de glucose lors d'épisodes hypoglycémiques non compensés par un apport exogène. Elle est possible par deux voies métaboliques : la glycogénolyse dans le foie et la néoglucogenèse dans le foie, le rein et l'intestin (Croset et al., 2001; Rajas et al., 1999).

## 1.1 Les voies métaboliques de production

### 1.1.1. La glycogénolyse

La glycogénolyse (Figure 2) est le processus permettant la libération de glucose à partir des stocks de glycogène endogène. Alors que le muscle utilise son stock de glycogène pour un apport d'énergie *in situ*, le foie fournit le glucose nécessaire au fonctionnement de l'organisme.

La glycogène phosphorylase clive le glycogène par addition d'un phosphate ( $P_i$ ) pour former du glucose-1-phosphate selon l'équation :



Le glucose-1-phosphate libéré par cette dégradation peut être converti en glucose-6-phosphate par la phosphoglucomutase. Le clivage phosphorolytique du glycogène est énergétiquement avantageux car le sucre libéré est déjà phosphorylé. La phosphorylase ne peut cliver les branchements du glycogène : une enzyme débranchante à double activité (glucosyltransférase et  $\alpha$ -1,6 glucosidase) remodèle le glycogène pour la dégradation par la phosphorylase (Figure 2).



**Figure 2. La glycogénolyse.**

La dégradation du glycogène est le résultat de 3 réactions catalysées, chez les Mammifères, par deux enzymes : une glycogène phosphorylase et une enzyme débranchante à double activité (en vert dans la figure).

La glycogénolyse hépatique est majoritairement déclenchée lorsque l'organisme a besoin de produire du glucose à court terme. En effet, les réserves de glycogène hépatique s'épuisent après environ 24 h de jeûne chez l'Homme et 12 h chez la souris (Nilsson, 1973).

### 1.1.2. La néoglucogenèse

La néoglucogenèse correspond à la production *de novo* de glucose à partir de précurseurs endogènes non glucidiques (Figure 3). Bien que cette voie soit présente dans trois organes différents, il existe une sélectivité des organes pour les substrats.

- Dans le foie, les substrats principaux sont le lactate et l'alanine (Benoy et Elliott, 1937). Ces deux molécules sont converties en pyruvate par respectivement la lactate déshydrogénase et l'alanine transaminase. Le pyruvate est par la suite converti en oxaloacétate par la pyruvate carboxylase.
- Dans le rein et l'intestin, le précurseur principal identifié est la glutamine (Croset et al., 2001; Stumvoll et al., 1998, 1999), qui est d'abord transformée en glutamate puis en  $\alpha$ -cétoglutarate par la glutamate déshydrogénase (dans le rein) ou l'alanine transaminase (dans l'intestin). Cette dernière molécule est transformée lors du cycle du Krebs, fournissant *in fine* de l'oxaloacétate, utilisable lors de la néoglucogenèse.
- Le glycérol provenant de l'hydrolyse des triglycérides peut être, en moindre mesure, également utilisé dans les trois organes (Bowman, 1970; Cochrane et Ottaway, 1970; Croset et al., 2001). Il est converti en glycérol-3-phosphate puis en dihydroxyacétone phosphate lors de la néoglucogenèse.
- Chez la plupart des ruminants, le substrat principal de la néoglucogenèse est le propionate, produit lors de la fermentation des fibres solubles par les bactéries commensales intestinales (Aschenbach et al., 2010; Landau et al., 1993). Le propionate est d'abord converti en propionyl-coA puis en méthylmalonyl-coA dans la mitochondrie. Cette dernière molécule est convertie en succinyl-coA par la méthylmalonyl-coA mutase.

La plupart des étapes de la néoglucogenèse sont les réactions inverses de celles de la glycolyse. Cependant, dans la glycolyse, trois réactions sont fortement exergoniques et donc irréversibles. Elles sont remplacées dans la néoglucogenèse par des réactions thermodynamiquement plus favorables. Ces réactions font intervenir des enzymes spécifiques de la PEG, donc des cibles clés de sa régulation. Il s'agit de la phosphoénolpyruvate

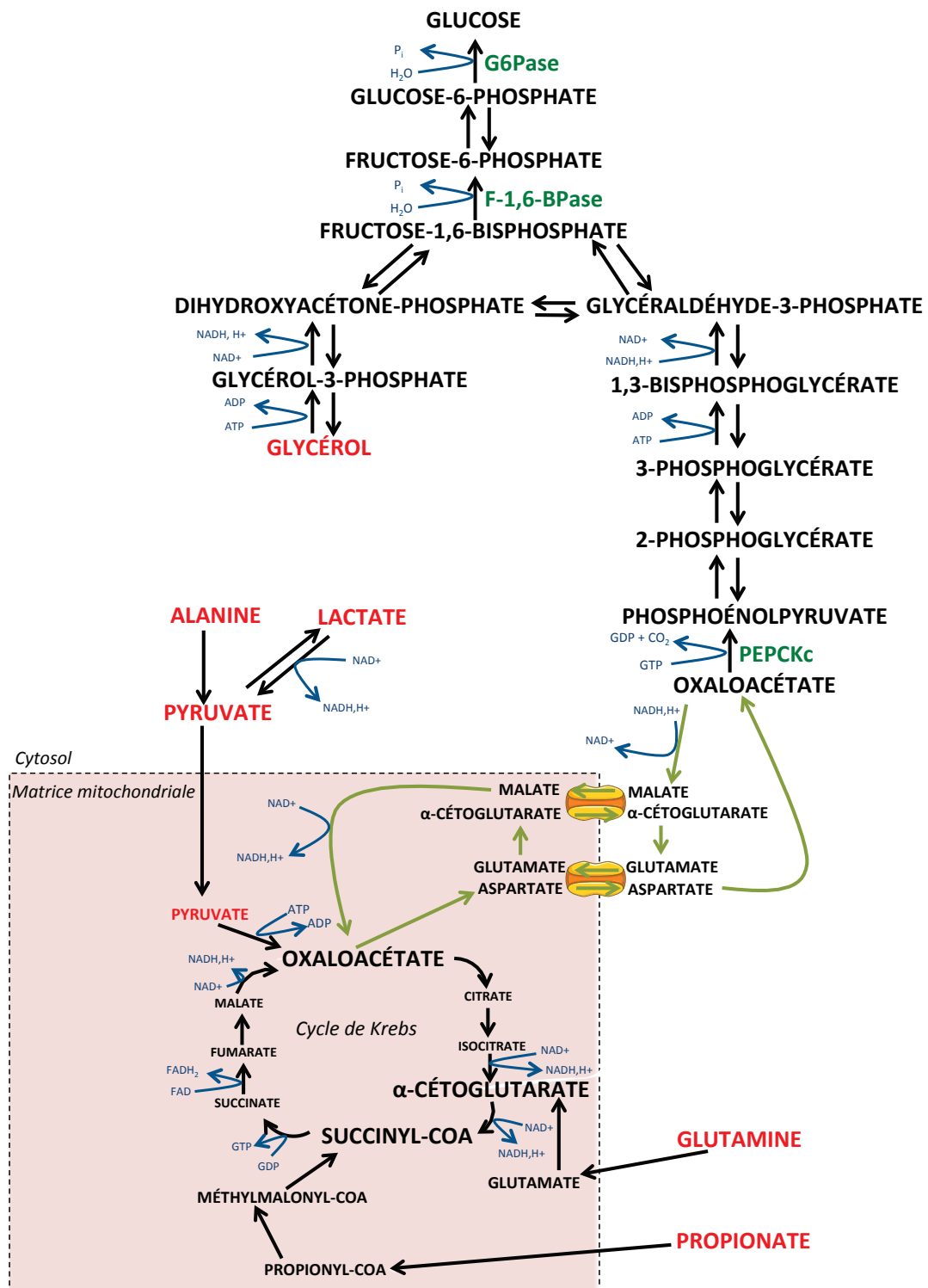


Figure 3. Les voies de la néoglucogénèse chez les Mammifères.

Les substrats néoglucogéniques sont indiqués en rouge, les enzymes spécifiques de la voie en vert. Les réactions couplées à des coenzymes redox/ATP sont indiquées avec des flèches bleues. Les flèches vertes indiquent la navette malate/aspartate, permettant l'export de l'oxaloacétate dans le cytosol.

carboxykinase (PEPCK), qui transforme l'oxaloacétate en phosphoénolpyruvate, la fructose-1,6-bisphosphatase (F1,6BPase), qui transforme le fructose-1,6-bisphosphate en fructose-6-phosphate, et la glucose-6-phosphatase (G6Pase), qui transforme le glucose-6-phosphate en glucose. Ce système de contrôle permet une inhibition réciproque de la glycolyse et la néoglucogenèse, et donc évite la formation de cycles futiles.

Contrairement à la PEPCK et la F1,6BPase, exprimées dans un grand nombre de tissus, l'expression de la G6Pase est restreinte à trois organes : le foie, le rein et l'intestin (Rajas et al., 1999). Cette spécificité confère à ces trois organes la capacité de produire du glucose par la néoglucogenèse.

Ces organes n'ont cependant pas la même importance ni le même rôle dans le maintien de l'homéostasie glucidique.

## **1.2 Rôles complémentaires des organes producteurs de glucose dans l'homéostasie glucidique**

### *1.2.1. Le foie*

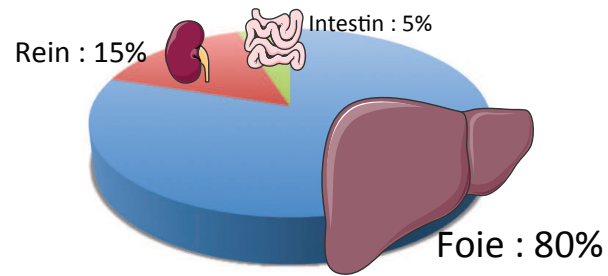
Le foie est le seul organe pouvant mobiliser à la fois la glycogénolyse et la néoglucogenèse. Il est généralement considéré comme le principal producteur de glucose à jeun. Lors d'un jeûne court, le foie utilise principalement ses réserves de glycogène et, si le jeûne se prolonge, la néoglucogenèse devient majoritaire à partir principalement de lactate et d'alanine (Nordlie et al., 1999). A l'état post-absorptif (5 à 6h après la fin d'un repas), le foie est responsable de près de 80% de la PEG (Figure 4).

Une trop forte induction de la production hépatique de glucose présente des effets délétères sur l'organisme. En effet, lors du diabète de type 2, la néoglucogenèse hépatique est fortement induite (Clore et al., 2000; Magnusson et al., 1992). De même, la surexpression de la G6Pase hépatique chez le rat est responsable d'un déséquilibre de l'homéostasie glucidique (Trinh et al., 1998).

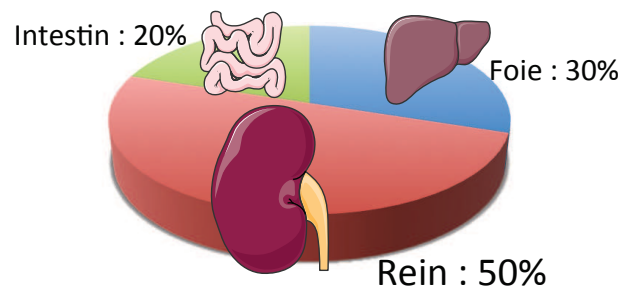
### *1.2.2. Le rein*

A l'état post-absorptif, le rein est responsable de 15 à 20% de la PEG chez le rat (Mithieux et al., 2006) et de 5 à 20% chez l'Homme (Cersosimo et al., 1999; Ekberg et al., 1999).

### ÉTAT POST-ABSORPTIF



### JEÛNE PROLONGÉ



**Figure 4. Les parts respectives de chaque organe producteur de glucose lors de l'état post-absorptif et le jeûne prolongé.**

*(Illustration réalisée avec l'aide de Servier Medical Art)*

Cependant, lors du jeûne prolongé, la part de la production rénale de glucose est drastiquement augmentée chez le rat et l'Homme (Ekberg et al., 1999; Mithieux et al., 2006) (Figure 4). De façon intéressante, le rein est également l'organe majeur de la PEG à l'état post-absorptif lors des régimes riches en protéines (Pillot et al., 2009). Dans ces conditions, une redistribution de la PEG est observée, avec une diminution de la part hépatique au profit des parts rénale et intestinale (pour le rein : 15-20% en régime standard contre environ 45% en régime riche en protéines).

### 1.2.3. *L'intestin*

Depuis environ 15 ans, l'intestin a été identifié comme un organe producteur de glucose (Croset et al., 2001). Il exprime en effet la PEPCK et la G6Pase, localisées dans la partie supérieure des villosités intestinales (Rajas et al., 1999, 2000). La G6Pase est également localisée dans les cryptes, où le nouvel épithélium est formé (Rajas et al., 2007).

La part de l'intestin dans la PEG est faible lors des périodes post-absorptives (Figure 4), mais monte à 20%, voire 35% lors du jeûne prolongé chez le rat (Croset et al., 2001; Mithieux et al., 2004a, 2006). Une induction similaire de la production intestinale de glucose (PIG) a également été démontrée dans deux autres conditions : lors d'un régime enrichi en protéines (Mithieux et al., 2005) et après une chirurgie bariatrique de type by-pass gastrique (Troy et al., 2008). Chez le rat nourri avec un régime riche en protéines, la PIG représente environ 20% de la PEG post-absorptive. D'autre part, après un by-pass gastrique, une augmentation de l'expression de la G6Pase et de la PEPCK a été observée dans le jéjunum et l'iléon.

L'induction de la PIG se traduit par une libération de glucose dans la veine porte, qui collecte le sang provenant de l'intestin. A l'état nourri post-absorptif, le glucose libéré par la PIG est détecté par un capteur portal qui transmet le signal au cerveau (Delaere et al., 2012, 2013), activant en retour un arc réflexe central responsable d'une augmentation de la sensibilité périphérique à l'insuline et de la sensation de satiété. Ces améliorations sont particulièrement observées lors des régimes riches en protéines (Mithieux et al., 2005; Pillot et al., 2009). Le rôle joué par la PIG dans la satiété initiée par les régimes enrichis en protéines a été confirmé récemment. En effet, les souris invalidées spécifiquement pour la sous-unité catalytique de la G6Pase (*G6pc*) dans l'intestin sont insensibles aux améliorations observées lors de ces régimes (Penhoat et al. 2011). De même, le signal glucose portal induit





par une augmentation de la PIG est responsable de l'amélioration du profil glycémique de souris ayant subi une intervention de type by-pass gastrique (Troy et al., 2008).

## **2. L'AXE INTESTIN-CERVEAU ET LE CONTRÔLE DE LA PRISE ALIMENTAIRE**

### **2.1 Innervation de l'intestin par le système nerveux périphérique (SNP)**

Du point de vue anatomique, le SNP peut être divisé en trois réseaux interconnectés :

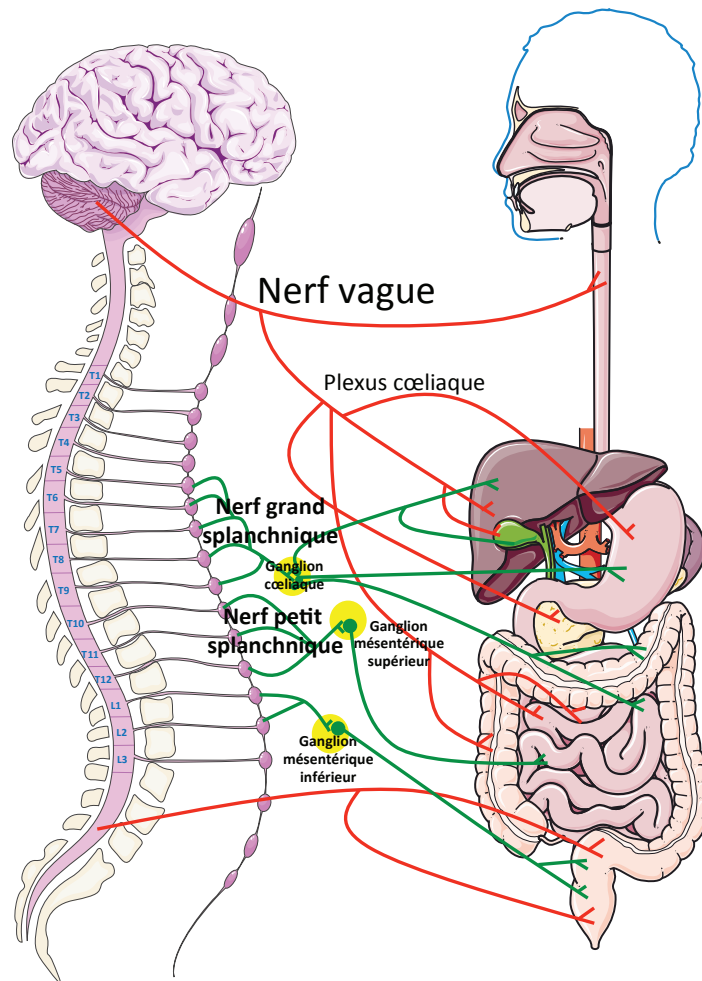
- le réseau parasympathique porté par les nerfs vagues
- le réseau sympathique porté en particulier par le nerf splanchnique
- le réseau entérique situé dans la paroi gastro-intestinale.

Chacun des réseaux comporte des composantes efférentes (motrices) et afférentes (sensorielles). Par convention, les appellations « système sympathique » et « système parasympathique » sont réservées aux fibres efférentes, tandis que les afférences sont désignées par le nerf qui les porte (ex : afférences vagales).

#### *2.1.1. L'innervation vagale*

Les nerfs vagues (nerfs crâniens X) sont des nerfs mixtes; presque toutes les neurofibres motrices sont des efférences parasympathiques. Les neurofibres motrices parasympathiques desservent le cœur, les poumons et les viscères abdominaux, et elles contribuent à la régulation de la fréquence cardiaque, de la respiration et de l'activité du système digestif. Les nerfs vagues transmettent aussi des influx sensitifs provenant des viscères thoraciques et abdominaux, des barorécepteurs de la crosse de l'aorte, des chémorécepteurs de la crosse de l'aorte et des glomus carotidiens (chémorécepteurs pour la respiration) et des calicules gustatifs de la partie postérieure de la langue.

Les deux nerfs vagues (ventral et dorsal) fournissent des neurofibres au cou et aux plexus nerveux, qui desservent pratiquement tous les organes des cavités thoracique et abdominale (Berthoud, 2004; Furness, 2012). Les axones pré ganglionnaires des nerfs vagues émergent principalement des noyaux dorsaux et ambigus du bulbe rachidien et font synapse avec des ganglions terminaux situés dans les parois de l'organe cible. Lorsque les principaux troncs des nerfs vagues atteignent l'œsophage, leurs neurofibres s'entremêlent et forment les



**Figure 5. L'innervation du tractus gastro-intestinal par le système nerveux autonome.**

Le système nerveux sympathique est indiqué en vert, le parasympathique en rouge.

*(Illustration réalisée avec l'aide de Servier Medical Art)*

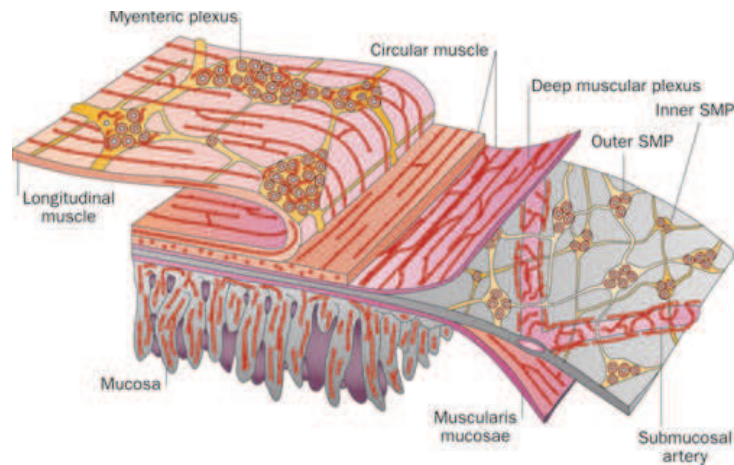
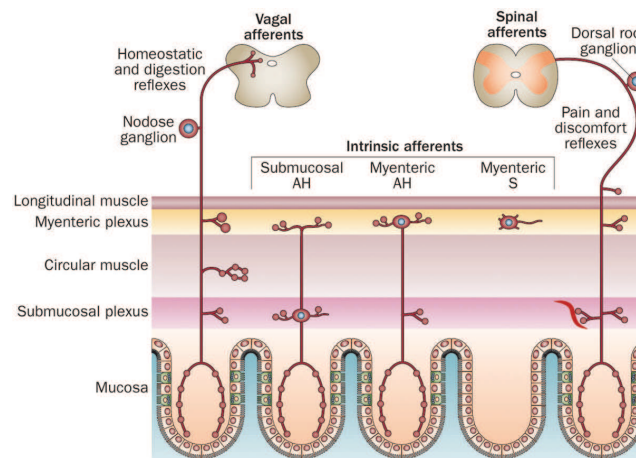
troncs vagues antérieur et postérieur, qui contiennent chacune des neurofibres provenant des nerfs vagues. Ces troncs descendent ensuite le long de l'œsophage jusque dans la cavité abdominale, et ils émettent des neurofibres par l'intermédiaire du plexus aortique abdominal (formé par un certain nombre de petits plexus - par exemple cœliaque, mésentérique supérieur et hypogastrique - attachés à l'aorte abdominale) avant de donner des ramifications aux viscères abdominaux (Figure 5). Les nerfs vagues innervent le foie, la vésicule biliaire, l'estomac, l'intestin grêle, les reins, le pancréas et la moitié proximale du gros intestin (le rectum étant innervé par les nerfs splanchniques pelviens).

### *2.1.2. L'innervation sympathique*

L'innervation sympathique de l'abdomen est assurée par des neurofibres pré ganglionnaires provenant de T5 (5ème nerf thoracique) à L2 (2ème nerf lombaire), qui empruntent certains nerfs splanchniques et font synapse principalement dans le ganglion cœliaque et mésentérique supérieur (Furness, 2012). La plupart des neurofibres pré-ganglionnaires à partir de T5 vers le bas font synapse dans des ganglions prévertébraux. Ces neurones pénètrent dans les troncs sympathiques, en sortent sans faire synapse et forment les nerfs splanchniques. Comme tous les nerfs spinaux, les nerfs splanchniques sont mixtes (i.e. contiennent des fibres motrices sympathiques et des fibres sensibles). Les nerfs splanchniques se joignent à un certain nombre de plexus enchevêtrés qui forment l'ensemble du plexus aortique abdominal. Ce plexus nerveux complexe contient plusieurs ganglions: cœliaque, mésentérique supérieur et mésentérique inférieur, appelés suivant les artères auxquels ils sont associés. Les neurofibres issues de ces ganglions atteignent habituellement leurs organes cibles en compagnie des artères qui les desservent. Elles desservent l'estomac, les intestins (sauf la moitié distale du gros intestin), le foie, la rate et les reins (Figure 5).

### *2.1.3. Le système nerveux entérique*

Le tube digestif possède son propre réseau nerveux interne formé par les neurones entériques. Ces neurones sont étroitement interconnectés et entretiennent d'intenses communications grâce auxquelles ils assurent ainsi la régulation de l'activité du système digestif. Les deux principaux plexus nerveux intrinsèques (ganglions reliés par des voies nerveuses non myélinisées) des parois du tube digestif, soit le plexus sous-muqueux et le plexus myentérique, sont composés en grande partie de neurones entériques semi-autonomes

**A****B**

**Figure 6. Anatomie du système nerveux entérique.**

**A.** Localisation du système nerveux entérique (représenté par les plexus d'Auerbach, *myenteric plexus*, et de Meissner ou sous-muqueux, *SMP*), (Furness, 2012).

**B.** Relation du système nerveux entérique avec les afférences autonomes, (Furness et al., 1998). La plupart des afférences intrinsèques et extrinsèques qui innervent l'intestin projettent vers la *lamina propria* de la muqueuse. Celles-ci incluent des fibres afférentes vagales provenant du ganglion inférieur du nerf vague, des afférences spinales des ganglions spinaux dorsaux, et des neurones intrinsèques (AH, *after-hyperpolarizing*) localisés dans les plexus entériques. Il existe également une classe S de neurones mécanosenseurs dans le plexus myentérique qui ne projette pas vers la muqueuse.

(Furness, 2012) (Figure 6).

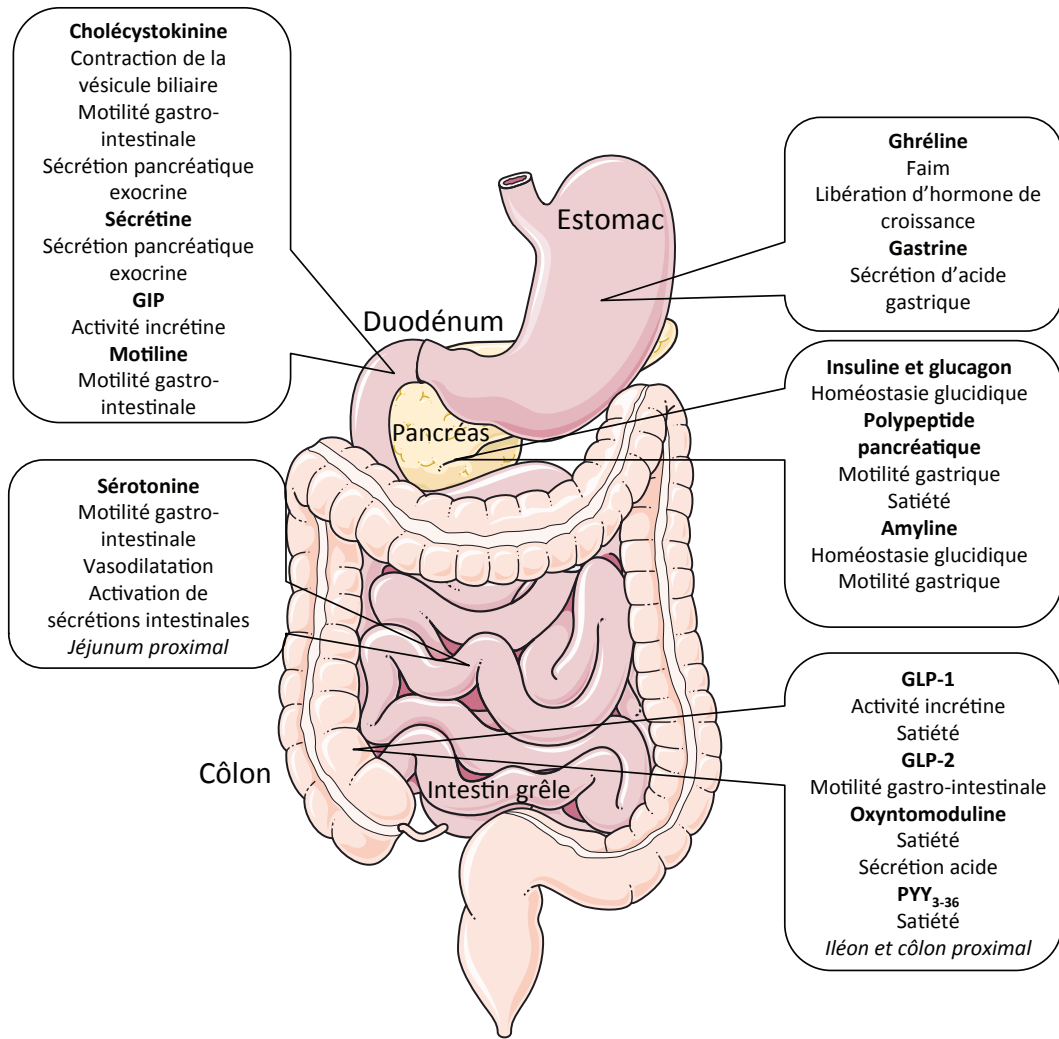
- Le plexus sous-muqueux, ou plexus de Meissner, fait partie de la sous-muqueuse. Il est composé de neurones sensoriels et de neurones moteurs. Ce plexus contient uniquement des fibres parasympathiques et régit l'activité des glandes et des muscles lisses de la muqueuse.
- Le plexus myentérique, ou plexus d'Auerbach, plus développé, se trouve entre les couches circulaire et longitudinale de la musculature. Les neurones de ce plexus constituent le principal réseau nerveux de la paroi du tube digestif et en régissent la motilité.

Le système nerveux entérique est relié au système nerveux central par des neurofibres viscérales afférentes et par des branches sympathiques et parasympathiques du système nerveux autonome, qui pénètrent dans la paroi de l'intestin et forment des synapses avec les neurones des plexus intrinsèques. Ainsi, les neurofibres du système nerveux autonome exercent également une régulation extrinsèque sur la digestion par l'intermédiaire d'arcs réflexes longs. De façon générale, l'action du système parasympathique accroît la motilité et la sécrétion d'eau, d'électrolytes et de protéines, alors que celle du système sympathique inhibe l'activité digestive.

Les ganglions entériques, qui sont largement indépendants, sont bien plus que de simples relais du système nerveux autonome, comme c'est le cas dans les autres systèmes. En effet, le système nerveux entérique contient plus de 100 millions de neurones, soit davantage que la moelle épinière.

## **2.2 Les hormones gastro-intestinales et la régulation de l'homéostasie énergétique**

Le tractus gastro-intestinal est l'organe endocrine le plus grand de l'organisme. Il libère plus de 20 hormones différentes qui influencent un nombre de processus physiologiques et agissent sur les tissus tels que les glandes exocrines, le muscle lisse et le système nerveux périphérique (Figure 7). La plupart de ces peptides sont sensibles au contenu nutritif du tube digestif. Les sensations à court terme de faim et satiété sont en grande partie régulées par des changements coordonnés dans les concentrations d'hormones gastro-intestinales circulantes (Berthoud, 2008; Murphy et Bloom, 2006). Le message est alors transmis par la circulation sanguine ou les afférences vagales en fonction de la localisation dans l'organe (Figure 8).



**Figure 7. Localisation des lieux de sécrétion des hormones gastro-intestinales et leurs fonctions putatives majeures.**

Ces hormones signalent à la périphérie et au système nerveux central, permettant la régulation d'un certain nombre de processus physiologiques.

*(Illustration réalisée avec l'aide de Servier Medical Art)*

### 2.2.1. La ghréline

La ghréline est une hormone peptidique libérée dans la circulation par l'estomac, découverte en tant que ligand endogène du récepteur à sécrétagogue de l'hormone de croissance (*growth-hormone-secretagogue receptor*, GHS-R). La ghréline est composée de 28 acides aminés et est modifiée de façon post traductionnelle par l'addition d'un groupe octanoyl à la sérine localisée en position trois. Cette acylation est nécessaire pour la liaison au GHS-R et pour traverser la barrière hémato-encéphalique (Kojima et Kangawa, 2005). A ce jour, la ghréline est le seul facteur gastro-intestinal décrit qui est capable d'augmenter l'appétit. La concentration de ghréline circulante est augmentée par le jeûne, et décroît après un repas (Janssen et al., 2011b; Kamegai et al., 2000). L'administration centrale ou périphérique de ghréline acylée augmente fortement la prise alimentaire. Ces effets valent souvent l'appellation de la ghréline comme « hormone de la faim » (Kojima et Kangawa, 2005).

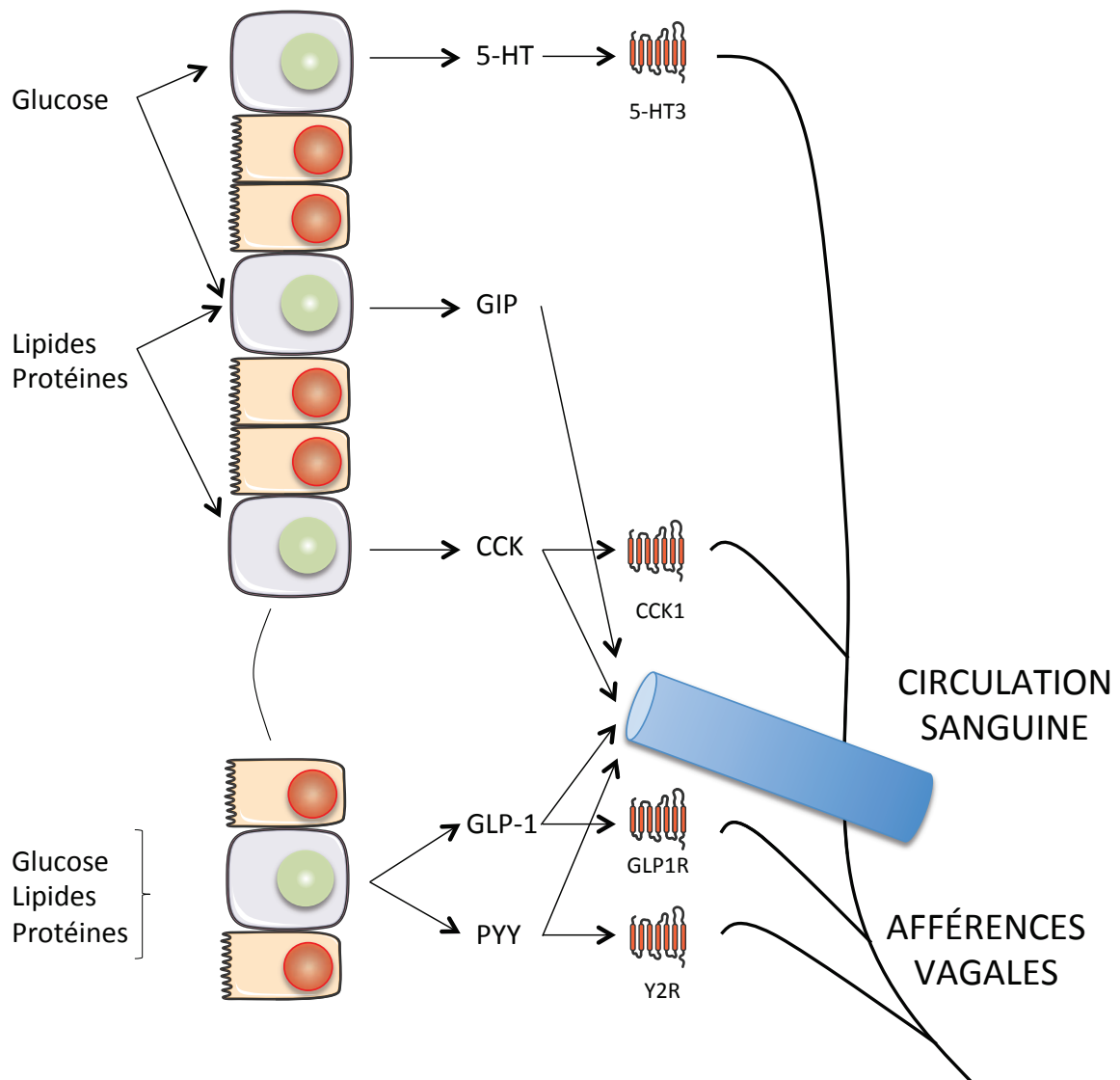
Les modèles de signalisation anormale par la ghréline montrent des phénotypes complexes liés à l'homéostasie énergétique. Les souris déficientes pour le gène de la ghréline ou pour son récepteur sont résistantes à l'obésité induite par un régime riche en graisses et en sucres. Les souris déficientes en ghréline ont également une préférence alimentaire modifiée, favorisant la graisse comme source d'énergie par rapport aux souris sauvages (Cummings, 2006). L'administration d'antagonistes GHS-R a pour effet de réduire la prise alimentaire chez des souris (Cummings, 2006). D'autres études ont montré que les souris diabétiques invalidées pour la ghréline ont une hyperphagie atténuée (Dong et al., 2006), et que la perte de ghréline réduit le diabète chez les souris *ob/ob* (Sun et al., 2006).

Le gène qui code pour la ghréline code également pour un autre peptide appelé obestatine. Des études ont montré que l'administration centrale ou périphérique du peptide réduisait la prise alimentaire et la prise de poids (Zhang et al., 2005). Cependant, des études postérieures ne soutiennent pas l'idée d'un rôle de l'obestatine dans le contrôle de la prise alimentaire (Gourcerol et al., 2006; Nogueiras et al., 2007).

### 2.2.2. La cholécystokinine

Dans l'intestin proximal, lipides et protéines induisent la sécrétion de cholécystokinine (CCK) par les cellules I. La CCK est libérée en postprandial depuis le duodénum et le jéjunum. Cette sécrétion active les afférences vagales via le récepteur CCK1 (Moriarty et al.,





**Figure 8. Détection des nutriments dans l'intestin grêle et le côlon et sécrétion d'hormones gastro-intestinales** (adapté de Berthoud, 2008).

*(Illustration réalisée avec l'aide de Servier Medical Art)*

1997; Smith et al., 1985). Les antagonistes CCK1 augmentent la prise alimentaire chez le rat et l'Homme, et le rat Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF), déficient en récepteur CCK1, est hyperphagique et obèse, suggérant un rôle physiologique de la CCK dans le contrôle de la prise alimentaire (Bi et Moran, 2002). Cependant, la perfusion continue de CCK n'a pas d'influence sur la prise alimentaire après 24 h, et bien que l'administration intermittente réduise la prise alimentaire de façon aiguë, cet effet est compensé par une augmentation de la prise alimentaire entre les injections (Crawley et Beinfeld, 1983; West et al., 1984, 1987). Certaines études montrent que la CCK ne peut pas activer les circuits vagues aux concentrations physiologiques circulantes, suggérant que les actions de la CCK sur la prise alimentaire résultent d'une action plutôt paracrine ou neurocrine qu'endocrine (Moran, 2000).

### 2.2.3. Le peptide YY

Le peptide YY (PYY) est une hormone intestinale proche du neuropeptide Y (NPY). Les deux peptides présentent un motif structural PP et exercent leurs effets à travers la famille de récepteurs Y. Le PYY entier se lie avec la même affinité à tous les récepteurs Y. Cependant, la plupart du PYY circulant est la forme tronquée du côté N-terminal, PYY<sub>3-36</sub>, qui se lie préférentiellement au récepteur Y2R.

Le PYY est sécrété par les cellules L de l'intestin distal (iléon et surtout côlon). Sa sécrétion est augmentée suite à un repas et est réduite par le jeûne. Une administration aiguë de PYY<sub>3-36</sub> réduit la prise alimentaire chez les rongeurs et les humains (Batterham et al., 2002). Cependant, le stress peut réduire la prise alimentaire de base, ce qui peut limiter l'effet des agents anorexigènes. L'administration périphérique de PYY<sub>3-36</sub> ne réduit pas la prise alimentaire chez les rongeurs qui ne sont pas acclimatés aux conditions expérimentales, ou lors d'un changement d'environnement (Abbott et al., 2006; Halatchev et al., 2004). Le récepteur Y2R sert probablement d'intermédiaire des effets anorexigènes du PYY<sub>3-36</sub>, car ils sont atténués par les antagonistes Y2R (Abbott et al., 2005a) et abolis chez les souris invalidées pour le gène *Y2r* (Batterham et al., 2002).

Les individus obèses ont une sensibilité normale aux effets anorexigènes du PYY<sub>3-36</sub>, et les taux circulants de PYY ne sont pas augmentés chez les obèses, contrairement aux taux de leptine (Batterham et al., 2003), ce qui suggère que la libération de PYY n'est probablement pas impliquée dans l'étiologie de l'obésité.



#### 2.2.4. *Le glucagon-like peptide-1 (GLP-1)*

Le même type cellulaire qui produit le PYY produit également un grand précurseur protéique appelé proglucagon. Celui-ci subit un nombre de modifications post-traductionnelles, dont plusieurs clivages aboutissant à des peptides d'activité biologique, tels que le glucagon, le glucagon-like peptide-1 (GLP-1), le glucagon-like peptide-2 (GLP-2) et l'oxyntomoduline.

Le GLP-1 existe sous plusieurs formes, mais la forme circulante la plus commune est la forme GLP-1<sub>7-36</sub>. Le GLP-1 est libéré dans la circulation après un repas et est une puissante incrétine : son administration centrale ou périphérique stimule fortement la sécrétion d'insuline. L'administration intracérébroventriculaire de GLP-1 réduit drastiquement la prise alimentaire chez les rongeurs, et l'administration périphérique inhibe l'appétit chez les rongeurs et l'Homme (Drucker, 2006).

La salive du monstre de Gila, *Heloderma suspectum*, un lézard venimeux, contient un peptide appelé exendine-4, qui est un puissant agoniste du récepteur du GLP-1. Une forme tronquée du peptide, l'exendine 9-39, agit comme antagoniste compétitif sur le même récepteur. Une administration intracérébroventriculaire aiguë d'exendine 9-39 augmente la prise alimentaire, et une administration chronique augmente la prise de poids. Il semble donc que la signalisation périphérique par le GLP-1 intervienne dans les mécanismes physiologiques qui réduisent l'appétit et la prise alimentaire suite à un repas. Cependant, la prise alimentaire et le poids des souris invalidées pour le récepteur du GLP-1 ne sont pas modifiés (Drucker, 2006).

Le GLP-1 et le PYY ont la particularité d'être clivés rapidement dans la circulation par la dipeptidyl peptidase IV (Eberlein et al., 1989; Mentlein et al., 1993), ce qui participe à la complexité des mécanismes associés à ces facteurs. Dans le cas du GLP-1, son clivage provoque son inactivation, ce qui suggère que la fixation du peptide intestinal aux afférences vagues abdominales (Kakei et al., 2002; Nakagawa et al., 2004) est le support majeur de ses effets physiologiques.

Dans le cadre d'un by-pass gastrique, une augmentation de la sécrétion du GLP-1 est observée (Shah et al., 2014). Cependant, il ne semble pas que cette sécrétion soit responsable de la perte de poids, mais serait associée à une amélioration de la sécrétion d'insuline (Troy et al., 2008).



### 2.2.5. *Le glucose-dependent insulintropic peptide (GIP)*

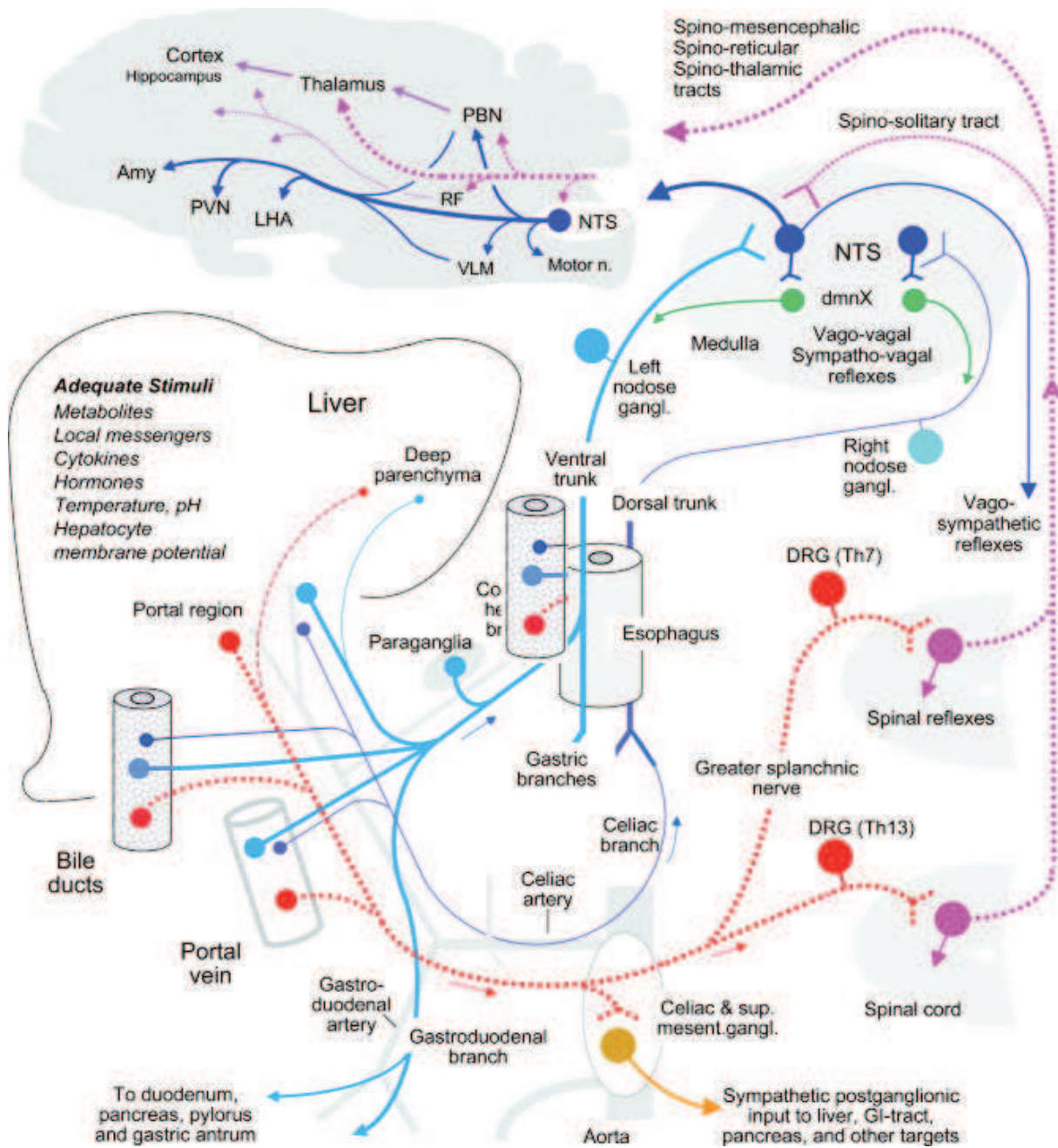
Le GIP est un peptide à 42 acides aminés libéré par les cellules K du duodénum après l'ingestion des aliments (Buchan et al., 1978; Carr et al., 2008). Les souris invalidées pour le récepteur du GIP sont résistantes à l'obésité lorsqu'elles sont nourries avec un régime riche en graisses (Miyawaki et al., 2002). Les explications de ce phénotype sont peu claires. Il est probable que la résistance à l'obésité soit le fait d'un effet du GIP sur le métabolisme des adipocytes, via des effets sur la lipolyse notamment (Timper et al., 2013).

Contrairement aux hormones précédentes, le GIP ne semble pas impliqué dans la modulation de la prise alimentaire.




### 2.2.6. *La sérotonine*

La majorité (environ 90%) de la sérotonine (5-HT) de l'organisme est synthétisée, stockée et libérée à partir d'une population de cellules entéroendocrines appelées cellules entérochromaffines (Mawe et Hoffman, 2013). Les premières tentatives pour enregistrer l'activité des afférences extrinsèques de l'intestin se sont révélées infructueuses jusqu'aux années 1950. Une étude a alors démontré que les fibres sensorielles quiescentes innervant l'estomac et l'intestin pouvaient être activées par une infusion vasculaire de phényldiguanide (Paintal, 1954). Cet agent a été par la suite identifié comme un puissant agoniste du récepteur de la sérotonine 5-HT<sub>3</sub>.

Les afférences vagues du tractus gastro-intestinal supérieur sont activées par la sécrétion de 5-HT dans l'intestin. Des études pharmacologiques et immunohistochimiques ont démontré que les afférences vagues dans la muqueuse intestinale expriment le récepteur 5-HT<sub>3</sub> (Glatzle et al., 2002; Hillsley et Grundy, 1998). De plus, l'infusion de solutions hyperosmotiques ou de produits de dégradation des glucides dans le lumen du duodénum induit la libération de 5-HT par les cellules entérochromaffines, agissant sur les récepteurs 5-HT<sub>3</sub> et stimulant ainsi les afférences vagues (Zhu et al., 2001). La présence de glucose dans le lumen stimule également la libération de 5-HT, et active un réflexe vago-vagal qui inhibe la vidange gastrique (Raybould et al., 2003). Ces stimuli résultent aussi en une sécrétion pancréatique. La réponse inhibitrice gastrique et la sécrétion pancréatique sont sensibles aux antagonistes des récepteurs 5-HT<sub>3</sub> (Li et al., 2000). Les signaux de satiété en provenance de l'intestin impliquent de même la libération de 5-HT : la suppression de la prise alimentaire par les lipides fait appel à une action conjointe des récepteurs 5-HT<sub>3</sub> et CCK1 (Savastano et



Nature des afférences :

-  Vagale ventrale
-  Vagale dorsale
-  Spinales

**Figure 9. Innervation afférente de la zone hépato-portale** (Berthoud, 2004).

Les afférences spinales sont reliées aux ganglions dorsaux des vertèbres thoraciques T7 à T13 (seuls les extrêmes sont représentés par souci de clarté).

L'épaisseur des traits (axones) et le diamètre des points (extrémités sensorielles) représentent l'abondance relative de l'innervation.

La représentation centrale n'a pas été déterminée par rapport à la zone hépato-portale mais illustre les zones associées à des informations viscérales en général.

Covasa, 2007). Chez l'Homme, l'inhibition des récepteurs 5-HT<sub>3</sub> augmente le volume d'ingestion d'un repas liquide (Janssen et al., 2011a), suggérant un rôle des récepteurs 5-HT<sub>3</sub> et de la signalisation par les afférences vagales dans le contrôle des sensations de faim et de satiété.

Bien que peu d'études aient été faites sur l'activation des fibres afférentes spinales par la 5-HT, des études *in vivo* et *ex vivo* montrent que les afférences spinales expriment le récepteur 5-HT<sub>3</sub> dans les terminaisons périphériques. Des études sur la distension colorectale chez le rat ont montré que l'alosétron, un antagoniste 5-HT<sub>3</sub>, inhibe les réponses réflexes et l'immunoréactivité c-Fos dans la corne dorsale de la moelle épinière (Kozlowski et al., 2000).

## **2.3 La détection des nutriments et le contrôle de la prise alimentaire par le système nerveux hépato-portal**

### *2.3.1. La détection des nutriments*

La zone hépato-portale possède une triple innervation périphérique assurée par les deux branches du nerf vague et le nerf splanchnique (Berthoud, 2004) (Figure 9). La branche hépatique commune est par ailleurs la voie de circulation des neurofibres vagales ventrales qui innervent également une partie de l'estomac, le pancréas et le duodénum. La veine porte est donc en position idéale pour détecter une grande partie des informations nutritionnelles issues des repas, avant que les nutriments ne soient métabolisés par le foie.

Bien que les nutriments soient capables d'induire des réponses post-absorptives influençant la prise alimentaire et le métabolisme après le passage dans le foie (Lutz et al., 2001; Trayhurn et Wood, 2005), seule la région hépato-portale est exposée à l'ensemble des signaux issus de l'alimentation, et tous les autres organes reçoivent ces informations après une utilisation partielle des nutriments dans le foie, cœur et poumons.

De plus, les effets métaboliques des hormones gastro-intestinales sont abolis par l'ablation chirurgicale du nerf vague abdominal. L'augmentation de la prise alimentaire et de la sécrétion d'hormone de croissance, dont la ghréline est le médiateur, sont abolis par une vagotomie (Date et al., 2002). C'est également le cas des effets de satiété initiés par la CCK (Smith et al., 1985), le GLP-1 et le PYY (Abbott et al., 2005b). De plus, les effets hypoglycémisants du GLP-1 font intervenir les récepteurs localisés dans le système nerveux périportal. Ainsi, lors d'une inhibition de la signalisation du GLP-1 dans la veine porte, les améliorations de l'homéostasie glycémique sont atténuées (Vahl et al., 2007).





Une augmentation des taux de lipides, protéines et glucose, peu de temps après l'ingestion d'un repas, active les neurones localisés dans la paroi de la veine porte (Breen et al., 2011; Delaere et al., 2012; Rasmussen et al., 2012), altérant ainsi l'appétit et le flux de glucose produit par le foie. Ces mécanismes pourraient être à l'origine des effets rapides sur la faim et la régulation de la glycémie observés après un by-pass gastrique chez les rongeurs (Breen et al., 2012; Troy et al., 2008).

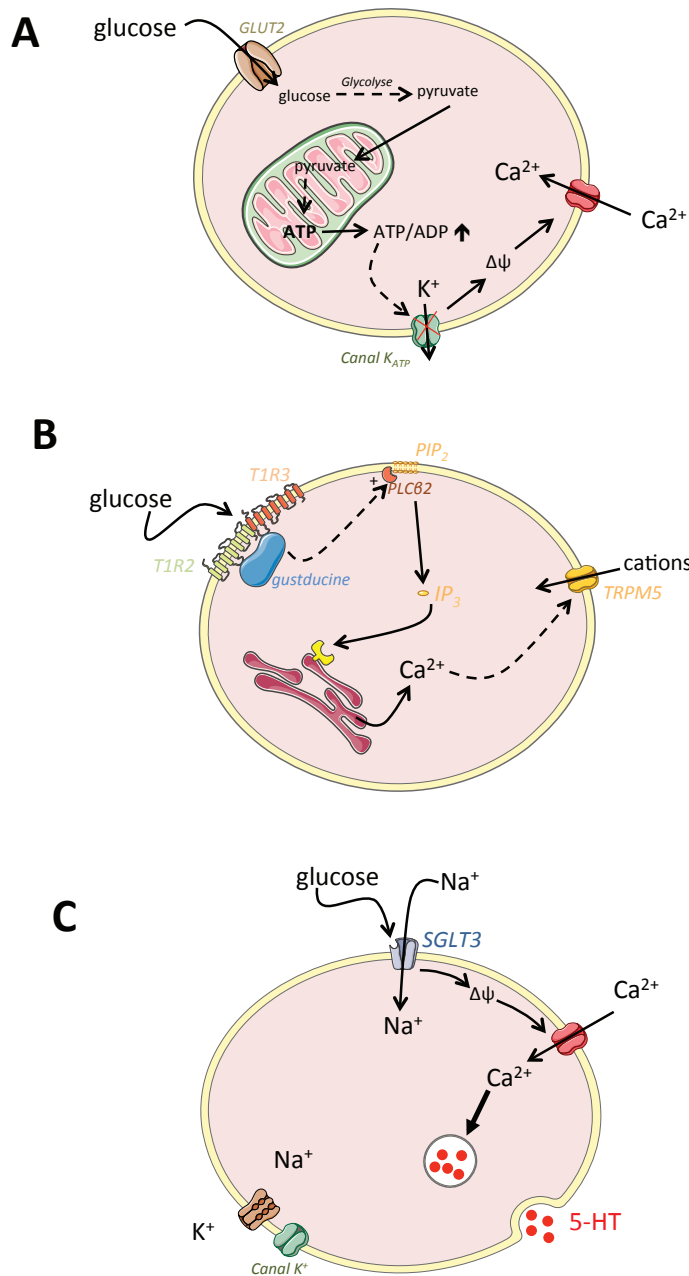
### 2.3.2. *Le glucose portal et la sensation de satiété*

Le flux d'apparition du glucose dans la veine porte lors de la digestion d'un repas riche en glucides (environ 50% des apports caloriques) est élevé. Il représenterait une à deux fois l'équivalent de la PEG totale (Delaere et al., 2012).

Les études initiales sur l'effet de la perfusion de glucose en veine porte ont été effectuées avec des flux égaux à la PEG (Tordoff et al., 1989). Dans ces conditions, la perfusion de glucose induit des réponses physiologiques et comportementales complexes telles qu'une diminution de la prise alimentaire, une modification de la préférence alimentaire et une modification de l'activité électrique des afférences hépato-portales vagues et spinales associée à un changement de l'activité des neurones hypothalamiques impliqués dans le contrôle de la faim (Delaere et al., 2010). Cependant, la perfusion à des flux nettement inférieurs (environ un sixième à un tiers de la PEG) est suffisante pour initier à la fois une diminution de la prise alimentaire et une activation des régions centrales contrôlant l'homéostasie énergétique (Delaere et al., 2013; Mithieux et al., 2005). Bien que les deux flux de glucose portal puissent représenter ce qui a lieu en période post prandiale, plusieurs études ont démontré que l'arrivée de glucose en veine porte ne détermine pas la fin d'un repas en cours mais conditionne plutôt la taille du repas suivant (Baird et al., 1997). Ceci suggère fortement une relation entre détection du glucose portal et satiété. En accord avec cette hypothèse, la région portale est un lieu crucial de la détection d'une hypoglycémie transitoire (Saberri et al., 2008), semblable à la transition entre un état nourri et un état post-absorptif.

### 2.3.3. *Mécanismes moléculaires de détection du glucose portal*

Si l'on considère le glucose comme une molécule porteuse d'un signal, le mécanisme le plus simple de détection est celui de la fixation à un récepteur cellulaire. Récemment, une étude a permis de discriminer parmi trois mécanismes distincts (Figure 10):



**Figure 10. Trois modèles de détection du glucose par les neurones de la veine porte.**

**A.** Le modèle classique de détection par Glut 2 et la glucokinase (d'après Thorens et Larsen, 2004).

**B.** Modèle de détection par les récepteurs du goût (d'après Depoortere, 2014).

La fixation d'un composé au goût sucré sur le dimère T1R2/T1R3 active la protéine G couplée (gustducine), et active la phospholipase C  $\beta$ 2 (PLC $\beta$ 2). Celle-ci dissocie le phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PIP<sub>2</sub>) en diacylglycérol et inositol-1,4,5-triphosphate (IP<sub>3</sub>). La fixation de celui-ci sur son récepteur induit la libération de calcium par le réticulum endoplasmique, activant le canal à cations *transient receptor potential member 5* (TRPM5), conduisant à la dépolarisation de la cellule.

**C.** Modèle de détection dans la cellule entérochromaffine intestinale (d'après Freeman et al., 2006).

La fixation de glucose à SGLT3 induit l'entrée de 2 Na<sup>+</sup>, conduisant à la sécrétion de sérotonine (5-HT) via l'entrée de Ca<sup>2+</sup>.

(Illustration réalisée avec l'aide de Servier Medical Art)

- la détection via le transporteur à faible affinité Glut 2, couplé à la phosphorylation du glucose par la glucokinase et possiblement responsable de la sécrétion de glucose stimulée par l'insuline dans les cellules  $\beta$  pancréatiques (Thorens et Larsen, 2004) ;
- les récepteurs intestinaux du goût, qui répondent aux mêmes stimuli que ceux de la langue (sucré, salé, acide, amer et umami) et qui peuvent coordonner la libération d'hormones impliquées dans l'homéostasie énergétique (Depoortere, 2014) ;
- et le cotransporteur glucose/sodium 3 (SGLT3), un récepteur (et non transporteur) de glucose, responsable des sécrétions stimulées par le glucose dans les cellules entérochromaffines (Freeman et al., 2006).

Un grand nombre d'arguments suggère un rôle clé de SGLT3 par rapport à Glut2 et les récepteurs du goût dans la détection de l'apparition du glucose portal à de faibles flux physiologiques. En effet, la détection de glucose portal est inhibée par la phlorizine (un inhibiteur spécifique des protéines de la famille des SGLT), alors que la perfusion de 3-O-méthylglucose (un analogue du glucose non phosphorylable), qui est capable de se lier à SGLT3 active le système de détection du glucose portal (Delaere et al., 2012). Il semblerait donc que SGLT3 soit la molécule impliquée dans la détection du signal glucose portal.

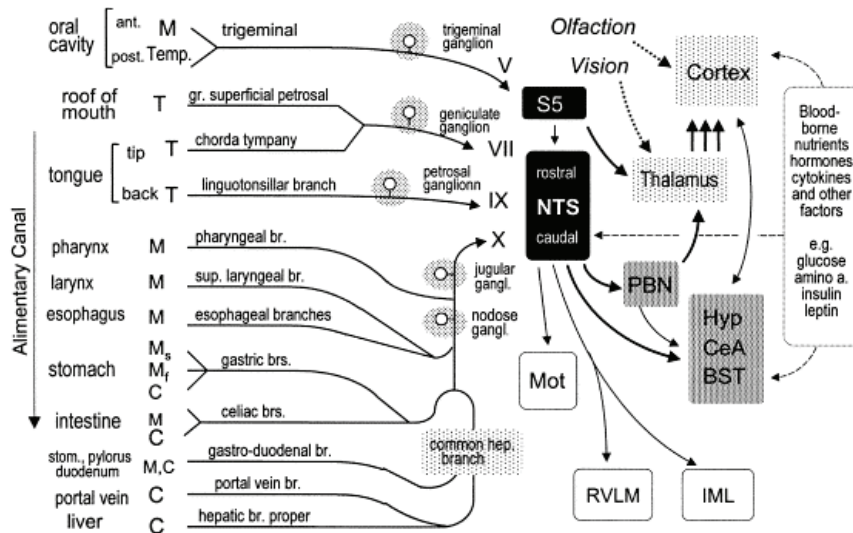
Alors que la région portale est innervée par les voies vagale et spinale (Berthoud, 2004), la détection de glucose portale n'est pas altérée par une ablation chirurgicale du nerf vague (Delaere et al., 2012). Ceci suggère que le signal porté par le glucose portal peut être relayé par les fibres afférentes des voies vagale et spinale.

## **2.4 Contrôle central de la prise alimentaire**

Le contrôle physiologique de la prise alimentaire implique un grand nombre de régions cérébrales et de neurotransmetteurs. En particulier, l'hypothalamus, le tronc cérébral et les régions cortico-limbiques (impliquées dans les circuits de récompense) occupent une place centrale (Berthoud, 2002).

### *2.4.1. Intégration des signaux par l'hypothalamus et le tronc cérébral*

L'hypothalamus et le tronc cérébral sont les régions historiquement les plus étudiées par rapport au contrôle de la prise alimentaire et du métabolisme énergétique. Ces deux régions contiennent des organes circumventriculaires (éminence médiane et *area postrema* –



**Figure 11. Schéma des voies afférentes relatives au contrôle de la prise alimentaire (Berthoud, 2002).**

Le long du canal alimentaire, les afférences nerveuses transmettent au tronc cérébral des informations de différentes natures : M = mécaniques (Ms = tension ; Mf = toucher), T = gustatives, Temp = thermiques, C = chimiques.

Abréviations : BST, noyau du lit de la strie terminale; CeA, noyau central de l'amygdale ; Hyp, hypothalamus ; IML, noyau intermédiolatéral (neurones pré-ganglionnaires sympathiques) ; Mot, noyau oral moteur du tronc ; NTS, noyau du tractus solitaire ; PBN, noyau parabrachial ; S5, noyau sensoriel principal du nerf trijumeau ; RVLM, bulbe rachidien ventrolatéral rostral.

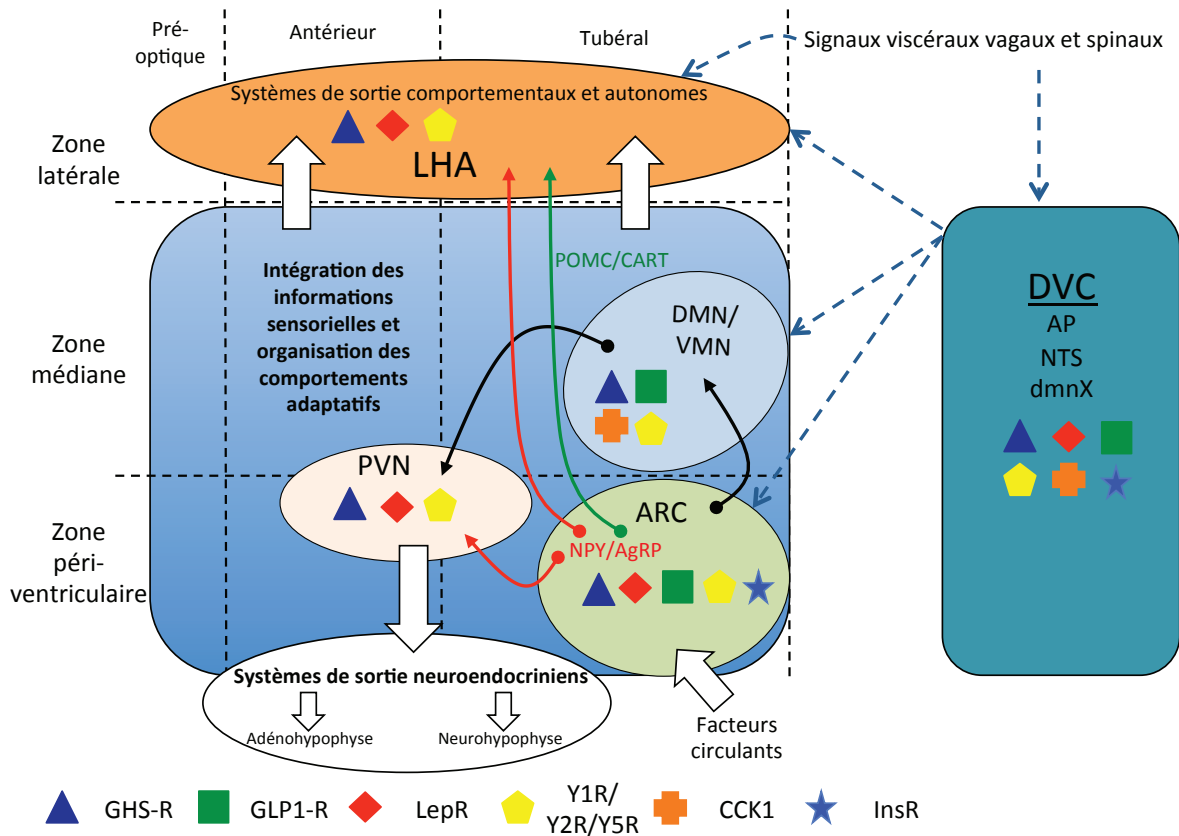
AP) qui possèdent des capillaires fenêtrés et une perméabilité plus grande que les autres structures isolées de la circulation par la barrière hémato-encéphalique (Duvernoy et Risold, 2007; Ganong, 2000). A proximité de ces zones, les neurones sont susceptibles de détecter les hormones et les nutriments dans la circulation à des concentrations supérieures à celles mesurées dans le cerveau. Le tronc cérébral, quant à lui, est le siège de l'intégration des informations nerveuses issues du SNP, notamment les afférences gustatives (via le nerf glosso-pharyngien, ou nerf crânien IX) et les afférences vagales (Figure 11). Il constitue un centre intégrateur des informations, relayées par la suite au reste du cerveau, et particulièrement à l'hypothalamus.

#### 2.4.2. L'hypothalamus

Dans les années 1940 et 1950, des expériences de lésion avaient suggéré un rôle globalement anorexigène et catabolique de certaines aires hypothalamiques (Anand et Brobeck, 1951; Brobeck et al., 1943). Depuis ces travaux, l'identification des neurotransmetteurs dans ces noyaux a confirmé le rôle central de l'hypothalamus, mais a surtout révélé une grande diversité neuronale.

##### 2.4.2.1. Les noyaux impliqués dans la prise alimentaire

L'hypothalamus des Mammifères est constitué de plus de 40 noyaux histologiquement distincts, sous-divisés en sous-noyaux (Figure 12). La *zone péri-ventriculaire* est principalement impliquée dans la détection des signaux sanguins et l'organisation et le contrôle des réponses endocrines. La *zone médiane* est essentiellement composée de grands noyaux (noyau dorso-médian – DMN, noyau ventro-médian – VMN) qui reçoivent des informations sensorielles et sont fortement interconnectés avec le reste de l'hypothalamus. Cette zone est impliquée dans l'organisation des comportements adaptatifs. La *zone latérale* (LHA) possède un système de communication intra- et extra-hypothalamique et peut être définie comme l'interface entre les régions plus médianes et les régions cortico-limbiques d'une part, et entre les systèmes moteurs somatique et autonome d'autre part. Le noyau paraventriculaire (PVN) de l'hypothalamus représente un microcosme à l'intérieur de l'hypothalamus, dans le sens où plusieurs sous-noyaux sont connectés aux trois systèmes effecteurs : le système endocrine (groupes magnocellulaires), le système autonome et le système comportemental (groupes parvocellulaires) (Berthoud, 2002).



**Figure 12. Organisation anatomique et fonctionnelle de l'hypothalamus et du complexe dorsal vagal (DVC)** (d'après Berthoud, 2002).

Carte fonctionnelle de l'hypothalamus et du DVC avec les éléments de détection humorale et nerveuse.

Abréviations : AP, area postrema ; ARC, noyau arqué de l'hypothalamus ; dmX : noyau moteur dorsal du nerf vague ; DMN/VMN, noyaux dorso-médian/ventro-médian de l'hypothalamus ; LHA, hypothalamus latéral ; NTS, noyau du tractus solitaire ; PVN, noyau paraventriculaire de l'hypothalamus.

Les récepteurs à la ghréline (GHS-R), au GLP-1 (GLP1-R), à la leptine (LepR), à la CCK (CCK1), à l'insuline (InsR) et aux NPY/PYY (Y1R/Y2R/Y5R) sont indiqués.

De nombreuses études depuis une vingtaine d'années ont visé à identifier les populations neuronales hypothalamiques qui contiennent des neurotransmetteurs et récepteurs spécifiques d'importance cruciale dans le comportement alimentaire et le développement de l'obésité. Parmi les noyaux hypothalamiques, le noyau arqué (ARC) occupe un rôle intégrateur, avec des connexions à la zone latérale, le tronc cérébral et le système cortico-limbique entre autres (Guan et al., 2001; Li et al., 1999) (Figure 12).

#### 2.4.2.2. Les neurotransmetteurs associés

Plusieurs populations neuronales ont été identifiées dans l'hypothalamus, sur la base de leur contenu en neurotransmetteurs. Dans l'ARC, deux populations neuronales principales répondent rapidement aux informations nutritionnelles. L'une exprime le gène de la pro-opiomélanocortine (POMC) et le transcrit régulé par la cocaïne et les amphétamines (CART), et induit un effet anorexigène (Boston et al., 1997). La forme active de POMC est le résultat de son clivage en plusieurs neuropeptides, parmi lesquels la  $\beta$ -endorphine, la corticotropine (ACTH) et les hormones mélanotropes  $\alpha$  et  $\beta$  ( $\alpha$ - et  $\beta$ -MSH) (Cone, 2005).  $\alpha$ - et  $\beta$ -MSH exercent leur effet anorexigène par la liaison aux récepteurs MC4R et MC3R (Adan et al., 1994). Contrairement aux neurones POMC/CART, l'autre population de neurones de l'ARC co-exprime le neuropeptide Y (NPY) et l'*Agouti-related peptide* (AgRP) et induit un effet orexigène (Ollmann et al., 1997). Tout comme PYY, NPY se fixe aux récepteurs Y1R, Y2R et Y5R (Bouali et al., 1995; Gerald et al., 1996; Lopez-Valpuesta et al., 1996). Ces neurones s'opposent à l'action des neurones POMC/CART notamment par l'effet antagoniste de l'AgRP sur les récepteurs MC3/4R (Ollmann et al., 1997). Les neurones NPY/AgRP et POMC/CART de l'ARC expriment de multiples récepteurs aux hormones. La leptine (Glaum et al., 1996; Håkansson et al., 1996), les glucocorticoïdes (Hisano et al., 1988), l'insuline et les métabolites tels que le glucose (Lynch et al., 2000; Muroya et al., 1999) ont directement accès à l'ARC par leurs récepteurs spécifiques.

L'hypothalamus est par ailleurs fortement impliqué dans d'autres fonctions physiologiques que la prise alimentaire. Les comportements sexuels, la soif, la température corporelle et la défense immunitaire sont par exemple régulés dans diverses parties de l'hypothalamus.

L'hypothalamus joue un rôle crucial dans le contrôle de la prise alimentaire et la régulation de la balance énergétique, mais l'explication actuelle n'est plus compatible avec une hypothèse simple de deux centres, l'un responsable de la faim et l'autre de la satiété. Il est





aujourd'hui clair que des signaux internes ont accès aux noyaux hypothalamiques par diverses routes : les récepteurs d'hormones, les senseurs de métabolites et les voies nerveuses afférentes. Cette information sur l'état interne est traitée à l'intérieur de l'hypothalamus et est à l'origine d'effecteurs autonomes et endocrines-hypophysaires par des voies bien décrites.

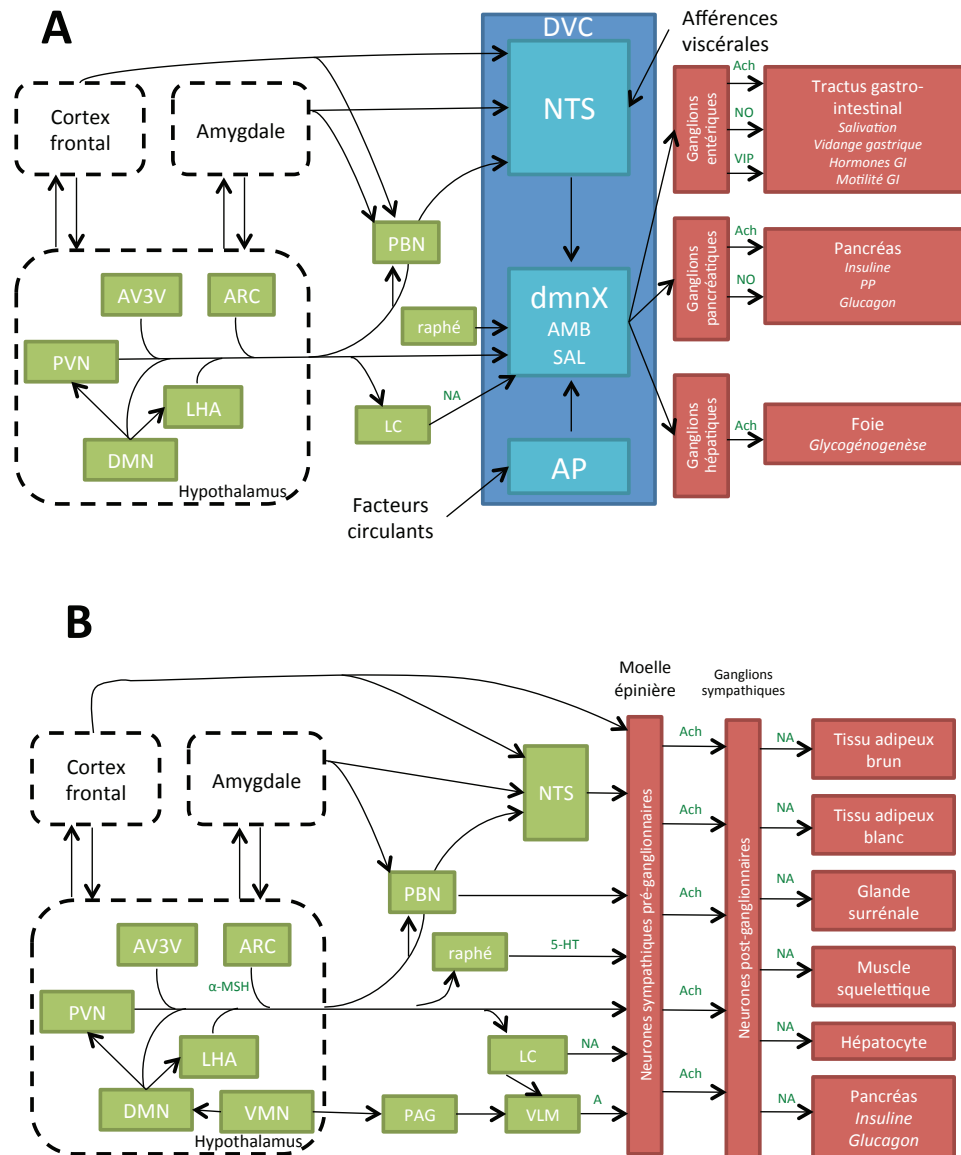
Ce qui reste incompris est la façon dont une telle information interagit avec l'information externe et cognitive au niveau de structures télencéphaliques comme le cortex. En particulier, chez l'Homme, l'initiation d'un repas démarre souvent sans un signal clair de déplétion énergétique, comme un ordre exécutif démarrant dans le cortex (Berthoud, 2002). Ainsi, même en présence de signaux de satiété et de réserves énergétiques remplies, il est possible que le cortex et le système limbique puissent se superposer au contrôle exercé par l'hypothalamus.

### 2.4.3. *Le tronc cérébral*

Le tronc cérébral contient de nombreuses voies sensibles et motrices en provenance et à destination des viscères. L'intégration des signaux sur l'état énergétique de l'organisme a également lieu dans cette région de l'encéphale. Le complexe dorsal vagal (DVC) et le noyau parabrachial (PBN) sont les deux structures les plus étudiées relativement au contrôle de la prise alimentaire et la régulation de l'homéostasie énergétique.

#### 2.4.3.1. Le complexe dorsal vagal

Le complexe dorsal vagal est composé du noyau du tractus solitaire (NTS), de l'*area postrema* (AP) et du noyau dorsal moteur du nerf vague (dmnX). Depuis le début des années 1990, des études ont montré que le tronc cérébral caudal est capable d'organiser certains aspects du comportement alimentaire en absence d'informations hypothalamiques (Flynn et al., 1991; Grill et al., 1998; Williams et al., 2000). Hormis l'ARC, le NTS est une des seules régions du cerveau à posséder une population de neurones à POMC, et le NTS et dmnX ont la concentration la plus élevée de MC4R dans l'encéphale (Mountjoy et al., 1994). L'injection de ligands MC3/4R dans le NTS et le 4<sup>ème</sup> ventricule est aussi efficace pour moduler la prise alimentaire que l'injection dans l'hypothalamus et le 3<sup>ème</sup> ventricule (Williams et al., 2000). Le DVC exprime également fortement le récepteur à la leptine (Buyse et al., 2001). Une autre similarité avec l'hypothalamus est la possibilité de l'AP (et certaines parties très vascularisées du NTS) de détecter des hormones circulantes et d'autres facteurs. Ainsi, l'information des



**Figure 13. Schéma simplifié des communications nerveuses autonomes impliquées dans la balance énergétique** (d'après Berthoud, 2002).

**A.** Communications vagues-parasympathiques vers les principales cibles impliquées dans la balance énergétique. Les neurones pré-ganglionnaires sont localisés dans les noyaux moteur dorsal (dmnX) et ambigu (AMB) du nerf vague, et dans le noyau salivaire (SAL).

**B.** Communications spinales-sympathiques vers les principales cibles impliquées dans la balance énergétique. Les neurones pré-ganglionnaires sont localisés dans la colonne intermedio-latérale le long de la moelle épinière.

Abréviations : AP, area postrema ; ARC, noyau arqué de l'hypothalamus ; AV3V, aire antéro-ventrale du troisième ventricule ; DMN, noyau dorso-médian de l'hypothalamus ; DVC, complexe dorsal vagal ; LC, locus coeruleus ; LHA, hypothalamus latéral ; NTS, noyau du tractus solitaire ; PAG, matière grise péri-aqueductale ; PBN, noyau parabrachial ; PVN, noyau paraventriculaire de l'hypothalamus ; VLM, bulbe rachidien ventrolatéral ; VMN, noyau ventro-médian de l'hypothalamus.

Les neurotransmetteurs impliqués dans la transmission du signal sont indiqués en vert : A, adrénaline ; Ach, acétylcholine ; NA : noradrénaline ; NO, monoxyde d'azote ; VIP, peptide intestinal vasoactif ; 5-HT, sérotonine.

hormones gastro-intestinales a accès directement au NTS (Figure 12) par l'intermédiaire de récepteurs dans l'AP et les nombreuses projections de l'AP au NTS. De plus, tout comme dans l'hypothalamus, le NTS possède des neurones sensibles au glucose (Ritter et al., 2000). Enfin, le NTS est connecté avec d'autres acteurs importants du contrôle de la prise alimentaire et la régulation de la balance énergétique (Figure 13). Bien qu'il n'y ait pas de projections directes du NTS au cortex, il existe de nombreuses connections poly-synaptiques via le PBN, le thalamus et l'amygdale. Le cortex reçoit également les informations du NTS via les systèmes d'excitation du tronc cérébral tels que le noyau du raphé et le locus coeruleus (Berthoud, 2002).

#### 2.4.3.2. Le noyau parabrachial

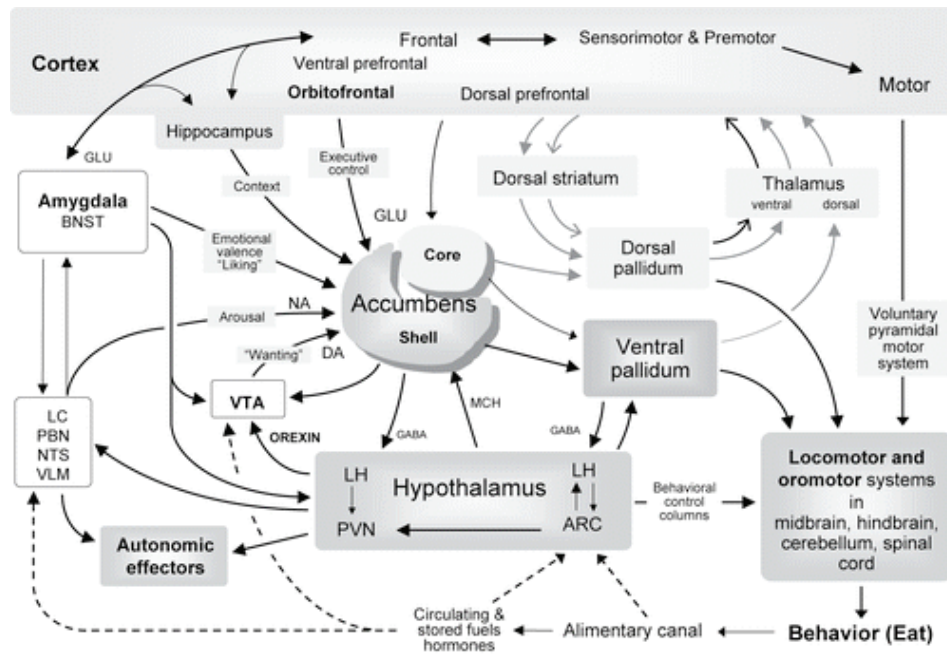
Le PBN, localisé dans le pont dorsal, intègre plusieurs informations sensorielles telles que le goût (Spector, 1995), les informations mécano- et chimio-viscérales (Baird et al., 2001) et la douleur (Gauriau et Bernard, 2002) via des connections réciproques avec le tronc cérébral, le diencephale et le cerveau antérieur. Les parties médiane et latérale du PBN reçoivent des afférences viscérales des parties caudale et rostrale du NTS respectivement (Figure 11). Ces régions du PBN ont à leur tour des projections vers de nombreux noyaux hypothalamiques tels que le PVN, l'ARC, le VMN et le LHA (Li et al., 1999).

Les projections descendantes du PBN ont leur origine dans la partie la plus latérale et sont dirigées vers le NTS latéral et la moelle épinière (Figure 13).

D'après la localisation stratégique et les connections anatomiques du NTS et du PBN, ces structures font partie du circuit processeur central qui contrôle la prise alimentaire et l'homéostasie énergétique.

#### 2.4.4. *Le choix alimentaire : la récompense et l'aversion*

Hormis un contrôle purement homéostatique basé sur l'état énergétique de l'organisme, les préférences alimentaires sont également influencées par des facteurs dépendant notamment de deux processus physiologiques, récompense et aversion, dont le support neuro-anatomique est le système cortico-limbique (cf. discussion à la fin du paragraphe 2.4.2).



**AR** Berthoud H-R, Morrison C. 2008  
 Annu. Rev. Psychol. 59:55–92

**Figure 14. Composantes centrales de la notion de récompense** (Berthoud et Morrison, 2008).

Sont indiquées les régions impliquées ainsi que les grandes fonctions et les neurotransmetteurs utilisés.

Abréviations : ARC, noyau arqué de l'hypothalamus ; BNST, noyau du lit de la strie terminale ; DA, dopamine ; GABA, acide  $\gamma$ -aminobutyrique ; GLU, glutamate ; LH, aire hypothalamique latérale ; MCH, hormone concentratrice de mélanine ; NA, noradrénaline ; NTS, noyau du tractus solitaire ; PVN, noyau paraventriculaire de l'hypothalamus ; VLM, bulbe rachidien ventrolatéral ; VTA, aire tegmentaire ventrale.

#### 2.4.4.1. La récompense

Depuis de nombreuses années, des études montrent que la transition entre la faim précédant un repas et la sensation de rassasiement est altérée chez les sujets obèses, notamment par rapport à la nourriture riche en lipides (Covasa, 2010; Little et Feinle-Bisset, 2011). Une composante clé de ces défauts pourrait venir d'altérations dans le « système de récompense » (Berridge, 2009; Berthoud et Morrison, 2008). En effet, la nourriture est l'une des récompenses nécessaires et intenses. Trois différentes composantes ont pu être isolées de cette notion de récompense tirée d'une consommation d'aliments : le plaisir hédonique (*liking*), la motivation à manger (*wanting*) et l'apprentissage (*learning*) (Berridge, 2009). Ces composantes font intervenir un réseau complexe qui permet l'association entre les trois (Figure 14).

Le plaisir hédonique et la motivation ont des substrats neuro-anatomiques différents. D'une part, le plaisir fait intervenir des systèmes tels que les systèmes opioïdes et GABAergiques, et des structures anatomiques telles que les relais gustatifs du PBN comme le suggèrent des études sur des rats décérébrés ayant goûté une solution sucrée (Grill et Norgren, 1978). D'autre part, la motivation à consommer de la nourriture repose sur les systèmes dopaminergiques méso- et télencéphaliques, ainsi que sur des structures prosencéphaliques comme le noyau accumbens (NAcc), le pallidum ventral et l'amygdale (Berridge et al., 2010).

Le récepteur  $\mu$ -opioïde (MOR) joue un rôle crucial dans ces systèmes de plaisir. L'injection locale de l'agoniste DAMGO dans le NAcc induit une prise alimentaire vorace, particulièrement de nourriture palatable riche en sucres et en graisses (Kelley et al., 2002; Will et al., 2003). Cette augmentation de la prise alimentaire semble être due à une augmentation du plaisir hédonique, puisque les injections de morphine dans cette même région augmentent le nombre de réactions affectives positives (Peciña et Berridge, 2005), alors que l'injection d'antagonistes réduit la consommation d'une boisson sucrée (Kelley et al., 1996). Contrairement à ce qui est couramment admis, le système méso- limbique dopaminergique n'affecte pas le plaisir des stimuli mais est crucial pour la mobilisation du comportement moteur pour obtenir des stimuli plaisants, ce qui constitue un système différent, celui de la motivation à manger (Berridge et Robinson, 2003).

La motivation à manger, bien que généralement conséquence du plaisir, constitue un élément distinct de la valeur hédonique. Cette distinction des substrats repose principalement sur des recherches concernant la dépendance aux drogues, où les stimuli n'offrent souvent pas de plaisir mais sont pourtant très désirés. La motivation repose sur un aspect conscient



explicite et un aspect inconscient implicite. La motivation n'a pas de composante affective de récompense. Son attribution transforme des informations sensorielles (vue, odeurs, sons) en des récompenses désirées et attirantes (Berridge et Robinson, 2003). Des projections dopaminergiques de l'aire tegmentaire ventrale (VTA) vers le NAcc (le système méso- limbique) sont la composante cruciale du système de motivation inconsciente (Dayan et Balleine, 2002; Kaczmarek et Kiefer, 2000; Wyvell et Berridge, 2000). Le système méso- limbique est intimement connecté à des éléments du système de régulation métabolique (Figure 14). La leptine et l'insuline peuvent agir directement sur des neurones dopaminergiques méso- limbiques pour moduler la motivation à manger (Fulton et al., 2006; Hommel et al., 2006). La leptine peut également indirectement moduler les neurones dopaminergiques méso- limbiques à travers son action sur le LHA, dont les neurones à orexine ont des projections vers la VTA (Harris et al., 2005).

#### 2.4.4.2.L'aversion

La première étape face à la nourriture dans un environnement donné est le processus d'apprentissage qui permettra la distinction entre ce qui est bénéfique et ce qui ne l'est pas. L'aversion gustative conditionnée (*conditioned taste aversion*) est le processus de mémoire et d'apprentissage gustatif le mieux caractérisé. De nombreuses études ont élucidé les structures participant dans ce processus, les neurotransmetteurs et récepteurs associés ainsi que les voies de signalisation intracellulaires (Berman et Dudai, 2001; Desmedt et al., 2003).

L'aversion gustative conditionnée fait intervenir des structures nombreuses et intégratives. Tout comme les voies de perception viscérale et post-absorptive, elle fait intervenir le PBN, le NTS, le LHA et le cortex insulaire (Berthoud et Morrison, 2008). L'interaction entre alimentation, métabolisme et aversion est évidente en ce qui concerne la perception sensorielle. Cependant, le contenu nutritif du repas peut être source d'aversion indépendamment des propriétés gustatives (généralement plus agréables pour les sucres et les graisses). Un exemple bien étudié est celui de l'aversion à un régime carencé en un acide aminé, où la détection du déséquilibre plasmatique par le cortex piriforme antérieur induit un détournement du régime en question et la préférence envers une autre source compensatoire quand elle est disponible (Gietzen, 1993).

Qu'il s'agisse d'aversion ou de récompense, il existe des systèmes innés et acquis qui peuvent se renforcer ou s'opposer dans le contrôle de la prise alimentaire. De façon





intéressante, la perfusion de glucose dans la veine porte active les régions responsables des circuits de récompense. Tout comme le glucose portal, les régimes riches en protéines semblent activer les mêmes cibles centrales (Delaere et al., 2013; Mithieux et al., 2005). Contrairement aux régimes riches en protéines, les régimes riches en graisses et en sucres rapides n'activent pas l'expression de la protéine c-Fos (un marqueur reconnu d'activation neuronale) dans les régions corticales (Delaere et al., 2013).

### **3. LES RÉGIMES RICHES EN PROTÉINES ET LE RÔLE DES RÉCEPTEURS $\mu$ -OPIOÏDES DANS LA SATIÉTÉ**

#### **3.1 Les effets métaboliques des régimes riches en protéines**

##### *3.1.1. Satiété et induction de la thermogénèse*

Lorsque l'on considère les différents effets inducteurs de satiété des macronutriments, les protéines sont les nutriments qui coupent le plus la faim, alors que les lipides sont ceux qui la coupent le moins (Eisenstein et al., 2002; Latner et Schwartz, 1999; Pullar et Webster, 1977; Raben et al., 2003). Une relation possible entre la perception de la satiété et les effets métaboliques liés à l'absorption des macronutriments a été établie dans une situation contrôlée de 24h dans une chambre métabolique. Des volontaires ont été nourris avec des régimes différents régimes isocaloriques isovolumiques de compositions variables : un régime riche en protéines et riche en glucides (30% des calories provenant des protéines, 60% des glucides, 10% des lipides) et un régime riche en lipides (60% des calories provenant des lipides, 30% des glucides, 10% des protéines). La satiété était alors plus élevée chez les individus ayant reçu le régime riche en protéines et en glucides. De plus, une augmentation de la dépense énergétique a été observée chez le groupe nourri avec le régime riche en protéines (Westerterp-Plantenga et al., 1999).

Ces observations sont cependant dépendantes de la source de protéines. L'apport de protéines animales induit, par exemple, une augmentation de 2% de la dépense énergétique par rapport aux protéines végétales (Mikkelsen et al., 2000). De même, une différence dans la satiété induite par les protéines a pu être observée entre les protéines de lactosérum et la caséine. Le lactosérum induit une plus forte satiété que la caséine, associée à une augmentation de la sécrétion de CCK et GLP-1 (Boirie et al., 1997; Hall et al., 2003).



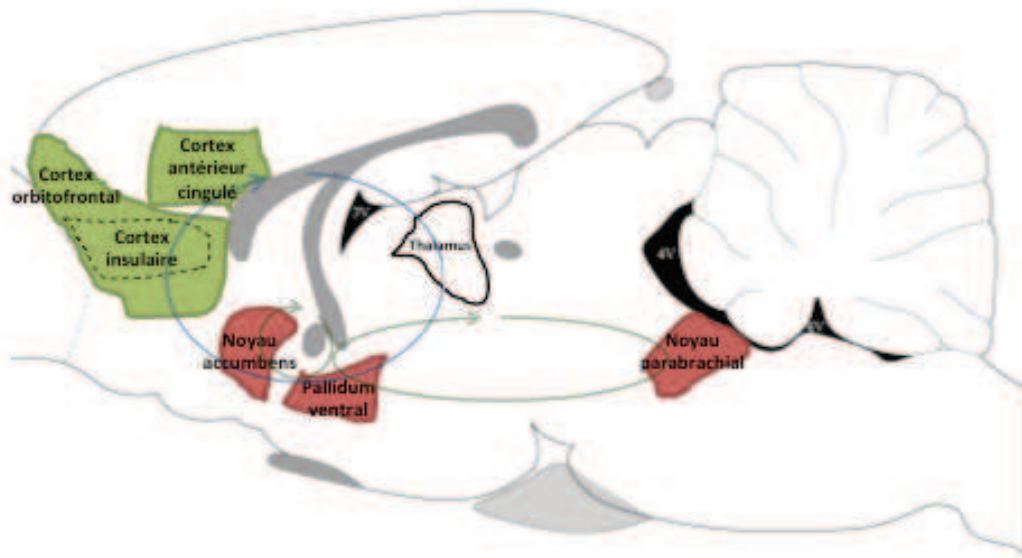
Chez le rat, les protéines sont également plus efficaces que les glucides pour réduire l'appétit (Bensaïd et al., 2002, 2003). Un autre effet des régimes riches en protéines concerne le choix des macronutriments. Ainsi, des rats Wistar ayant le choix des macronutriments du sevrage à la maturité choisissent spontanément une nourriture riche en protéines et en lipides (Jean et al., 2002).

### 3.1.2. Contrôle de l'homéostasie glucidique

Les effets bénéfiques des protéines sur l'homéostasie glucidique sont connus depuis bientôt un siècle. En 1922, le Dr. MacLean a remarqué que lorsqu'un homme diabétique, ayant une glycémie à jeun de 280 mg/dL, était nourri avec 250 g de viande (soit environ 50 g de protéines), ceci ne produisait pas d'augmentation de la glycémie, contrairement à l'idée répandue à l'époque que les protéines étaient hyperglycémiques par leurs effets sur la néoglucogenèse (MacLean, 1922).

Les effets insulinothropes des acides aminés et des protéines ont été décrits pour la première fois dans les années 1960 (Pallotta et Kennedy, 1968), et ont depuis été confirmés chez des sujets sains (Nuttall et al., 1985) ou diabétiques de type 2 (Nuttall et al., 1984). La perfusion combinée de glucose et des acides aminés à chaîne branchée leucine et arginine a permis de démontrer une synergie entre ces acides aminés et le glucose dans la stimulation de la sécrétion d'insuline (Floyd et al., 1970). Ces données sont en accord avec des récentes études *in vivo*, montrant que la co-ingestion de petites quantités de leucine augmentait la sécrétion d'insuline suite à un régime hyperglycémiant (Koopman et al., 2005). Bien que la sécrétion d'insuline suite à l'ingestion de glucides soit déficiente chez les diabétiques de type 2, plusieurs études ont montré que l'ingestion combinée de protéines et de glucides peut quadrupler la concentration d'insuline plasmatique (van Loon et al., 2003; Manders et al., 2005).

De plus, des individus diabétiques nourris pendant 5 semaines avec un régime hyperprotéique ont une réduction de l'hémoglobine glyquée comparable à la réduction induite par la metformine et les thiazolidinediones (Gannon et al., 2003). Cette réduction est d'autant plus forte que la quantité de glucides ingérés dans le régime est faible (Gannon et Nuttall, 2004).



**Figure 15. Les récepteurs  $\mu$ -opioïdes centraux et la récompense alimentaire** (d'après Berridge et al., 2010).

Les « points chauds » d'hédonisme sont représentés dans le noyau accumbens, le pallidum ventral et le noyau parabrachial. Ces régions se connectent à d'autres régions par l'intermédiaire de médiateurs  $\mu$ -opioïdes, amplifiant les réactions de plaisir hédonique par rapport au goût sucré.

### 3.1.3. Mécanismes centraux activés par les régimes hyperprotéiques

Comme discuté précédemment, une alimentation hyperprotéique induit une augmentation de la sécrétion de CCK par l'intestin. Cette sécrétion induit l'activation de neurones noradrénergiques dans le NTS (Rinaman, 2003). De façon intéressante, ces mêmes neurones sont activés lors de l'ingestion de régimes hyperprotéiques. La détection de protéines dans l'intestin active des mécanismes dépendants de la CCK dans les afférences vagales qui transmettent l'information au NTS (Faipoux et al., 2008).

Dans l'hypothalamus, un régime riche en protéines inhibe les neurones NPY/AgRP et active les neurones POMC/CART (Faipoux et al., 2008; Kinzig et al., 2007; Ropelle et al., 2008). Les mécanismes intracellulaires de réponse à une telle alimentation impliquent les kinases antagonistes mTOR (*mammalian target of rapamycin*) et AMPK (kinase activée par l'AMP). L'AMPK est dépendante du ratio ATP/AMP. Les régimes hyperprotéiques induisent une augmentation de l'ATP, inhibant l'AMPK et activant mTOR (Cota et al., 2006; Ropelle et al., 2008). De façon intéressante, ce mécanisme semble être activé par la présence de leucine, un acide aminé à chaîne branché dont l'administration centrale coupe la faim (Cota et al., 2006; Morrison et al., 2007).

## 3.2 La régulation de la balance énergétique par les récepteurs $\mu$ -opioïdes (MOR)

### 3.2.1. Les récepteurs $\mu$ -opioïdes centraux

Comme discuté au paragraphe 2.4.4.1, la signalisation via les MOR dans le système nerveux central joue un rôle crucial dans le système de plaisir hédonique associé à la prise alimentaire. Les systèmes impliqués sont résumés en Figure 15.

L'administration centrale d'agonistes MOR augmente la prise alimentaire, alors que les antagonistes la diminuent (Echo et al., 2002; Smith et Berridge, 2007; Yeomans et Gray, 2002). L'activation de « points chauds » MOR, identifiés dans le pallidum ventral et le NAcc, augmente les réactions hédoniques aux saveurs sucrées (Peciña et Berridge, 2005) ainsi que la prise alimentaire d'aliments palatables riches en graisses et en sucres (Kelley, 2004). A l'opposé, l'injection centrale d'antagonistes MOR réduit les réactions gustatives positives (Shin et al., 2010) et interrompt la recherche d'aliments et l'alimentation compulsive (Giuliano et al., 2012). De même, la naloxone, un puissant antagoniste MOR, supprime la prise d'une boisson sucrée (Levine et al., 1982) et bloque la préférence pour la saccharine

<b>[Leu<sup>5</sup>]-enképhaline</b>	Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu
<b>[Met<sup>5</sup>]-enképhaline</b>	Tyr-Gly-Gly-Phe-Met
<b>Dynorphine A</b>	Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-Arg-Ile-Arg- Pro-Lys-Leu-Lys-Trp-Asp-Asn-Gln
<b>Dynorphine B</b>	Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-Arg-Gln-Phe- Lys-Val-Val-Thr
<b><math>\alpha</math>-néoendorphine</b>	Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-Lys-Tyr-Pro- Lys
<b><math>\beta</math>-néoendorphine</b>	Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-Lys-Tyr-Pro
<b><math>\beta_h</math>-endorphine</b>	Tyr-Gly-Gly-Phe-Met-Thr-Ser-Glu-Lys- Ser-Gln-Thr-Pro-Leu-Val-Thr-Leu-Phe- Lys-Asn-Ala-Ile-Ile-Lys-Asn-Ala-Tyr-Lys- Lys-Gly-Glu
<b>Endorphine-1</b>	Tyr-Pro-Trp-Phe-NH <sub>2</sub>
<b>Endorphine-2</b>	Tyr-Pro-Phe-Phe-NH <sub>2</sub>
<b>Nociceptine</b>	Phe-Gly-Gly-Phe-Thr-Gly-Ala-Arg-Lys- Ser-Ala-Arg-Lys-Leu-Ala-Asn-Gln

Figure 16. Les peptides opioïdes endogènes et leur structure primaire.

(Lynch et Burns, 1990).

En plus du récepteur  $\mu$ , des récepteurs opioïdes  $\kappa$  et  $\delta$  ont été décrits (Kosterlitz et Paterson, 1980). Leur rôle dans le contrôle de la prise alimentaire est moins bien établi. Il semblerait, par exemple, que le récepteur  $\kappa$  agisse dans l'hypothalamus via la signalisation liée à la sécrétion de ghréline (Romero-Picó et al., 2013).

### 3.2.2. *Les récepteurs $\mu$ -opioïdes périphériques*

Après le cerveau, les MOR sont principalement exprimés dans la région gastro-intestinale, spécialement dans l'intestin grêle, où ils contrôlent la motilité du tractus digestif (Hedner et Cassuto, 1987; Sternini, 2001; Sternini et al., 2004). Plusieurs observations suggèrent un rôle des MOR de l'intestin dans la modulation de la prise alimentaire :

- La morphine, un agoniste MOR, est souvent administrée chez les patients atteints de cancer pour atténuer la douleur. Un effet secondaire souvent constaté est une constipation causée par une inhibition de la motilité intestinale. Lorsque les patients sont également traités oralement à la naloxone, un antagoniste MOR, la motilité intestinale est restaurée sans pour autant affecter l'effet analgésique central de la morphine (Meissner et al., 2000; Sykes, 1996). Ceci suggère que la drogue peut être active en tant qu'antagoniste MOR à la périphérie, sans atteindre le cerveau.
- En accord avec l'observation précédente, la naloxone diminue la prise alimentaire lorsqu'elle est donnée oralement chez l'Homme (Yeomans et Gray, 2002). Cependant, la drogue est métabolisée activement dans le foie (Greenwood-Van Meerveld et al., 2004; Reimer et al., 2009).

## 3.3 Les peptides opioïdes

### 3.3.1. *Les opioïdes endogènes*

Peu de temps après la découverte des récepteurs opioïdes, des études ont identifié des composés dans le cerveau ayant une activité opioïde et une affinité pour les récepteurs (Figure 16). Depuis le séquençage des premiers enképhalines pentapeptidiques (Hughes et al., 1975), les substances opioïdes endogènes ont été classées en trois familles, chacune avec un peptide précurseur et un récepteur opioïde préférentiel: les enképhalines (précurseur : préproenképhaline ; récepteur  $\kappa$ ), les dynorphines (préprodynorphine ;  $\delta$ ) et les  $\beta$ -endorphines



<b><math>\beta</math>-casomorphine 1-7</b>	Tyr-Pro-Phe- Pro-Gly-Pro-Ile	Agonistes $\mu$ -opioïdes
<b><math>\beta</math>-casomorphine 1-5</b>	Tyr-Pro-Phe- Pro-Gly	
<b><math>\beta</math>-casomorphine 1-4</b>	Tyr-Pro-Phe- Pro	
<b>Casoxine A</b>	Tyr-Pro-Ser- Tyr-Gly-Leu- Asp	Antagonistes $\mu$ -opioïdes
<b>Casoxine B</b>	Tyr-Pro-Tyr-Tyr	
<b>Casoxine C</b>	Tyr-Ile-Pro-Ile- Gln-Tyr-Val- Leu-Ser-Arg	

Figure 17. Les peptides opioïdes exogènes (exorphines) provenant de la digestion protéolytique des caséines du lait.

( $\beta$ -lipotropine,  $\mu$  et  $\delta$ ). Les trois familles sont appelées endorphines (une contraction d'*endogenous morphine*).

Tous les peptides opioïdes endogènes partagent la séquence enképhaline (Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu ou Tyr-Gly-Gly-Phe-Met) en N-terminal, avec des différentes extensions en C-terminal.

Un autre groupe d'opioïdes endogènes a été identifié, les endomorphines 1 et 2 (Figure 16) (Zadina et al., 1997). Ces peptides sont assez différents des autres peptides opioïdes dans le sens où ils sont hautement sélectifs pour le récepteur  $\mu$  et ne contiennent pas la séquence enképhaline en N-terminal. Ces peptides ont été extensivement étudiés (Fichna et al., 2007) mais de nombreuses questions subsistent. Particulièrement, aucun mécanisme ne permet jusqu'à présent de rendre compte de la biosynthèse de ces peptides car aucun précurseur n'a été jusqu'à présent identifié (Terskiy et al., 2007).

### 3.3.2. *Les opioïdes provenant de la protéolyse : une connexion entre la digestion protéique et les MOR ?*

Il est aujourd'hui bien établi, chez l'Homme et les rongeurs, que les régimes riches en protéines diminuent la sensation de faim et la prise alimentaire (Booth et al., 1970; Larsen et al., 2010; Rolls et al., 1988). Les mécanismes par lesquels ces effets ont lieu ont longtemps été mal compris. Une propriété intrigante des protéines par rapport aux MOR est le fait que certaines protéines, particulièrement celles impliquées dans la nutrition humaine comme la caséine du lait ou le gluten, libèrent des peptides à activité  $\mu$ -opioïde *in vitro* après une protéolyse partielle, appelés exorphines par analogie avec les endorphines (Zioudrou et al., 1979). Suivant la source, l'effet résultant est agoniste ou antagoniste (Figure 17). De plus, de nombreuses études soulignent l'activité  $\mu$ -opioïde de certains oligopeptides, dont la structure minimale est un dipeptide (Capasso et al., 1997; Moritoki et al., 1984; Shiomi et al., 1981). Comme les exorphines, certains peptides jouent un rôle agoniste MOR (Moritoki et al., 1984; Shiomi et al., 1981), d'autres un rôle antagoniste (Capasso et al., 1997).

Les protéines alimentaires sont absorbées à partir de la lumière intestinale après protéolyse incomplète. Il a donc été supposé que les protéines alimentaires (par exemple les caséines) pourraient exercer une signalisation systémique via leurs résidus de protéolyse ayant une activité  $\mu$ -opioïde (Meisel et FitzGerald, 2000; Zioudrou et al., 1979). Cependant, il semble peu probable que ces oligopeptides puissent atteindre le cerveau suite à l'ingestion orale de protéines. Par exemple, la  $\beta$ -casomorphine 1-7, un agoniste MOR libéré par la



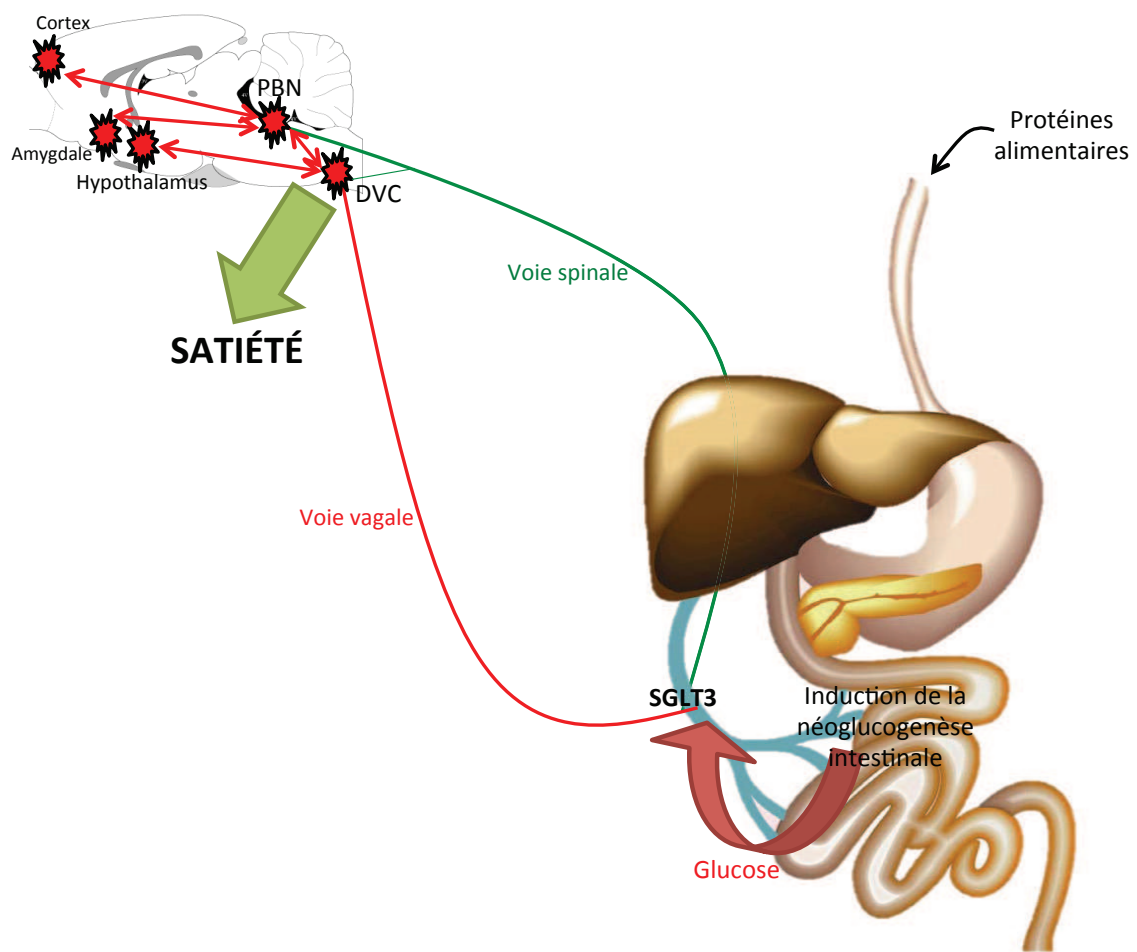
digestion de la  $\beta$ -caséine, est activement dégradée par le foie (Kreil et al., 1983) et n'est pas détectée dans le sang systémique après l'ingestion de lait ou de produits laitiers (Teschemacher et al., 1986). Alternativement, il est possible que les agonistes ou antagonistes MOR exercent leurs effets au niveau mésentérique ou gastro-intestinal (Holzer, 2009; Meisel et FitzGerald, 2000). La possibilité pour les MOR périphériques de moduler la prise alimentaire n'a cependant pas été étudiée. Une telle modulation pourrait avoir lieu par un mécanisme de communication entre l'intestin et le cerveau impliquant les MOR dans la sphère gastrointestinale.

### **3.4 La néoglucogenèse intestinale, lien entre digestion protéique et satiété**

De nombreux arguments ont suggéré que la connexion entre les protéines alimentaires et leur effet coupe-faim est dépendante d'un processus métabolique, la néoglucogenèse intestinale (NGI). Tout comme le foie et le rein, l'intestin est un organe capable de synthétiser du glucose à partir de précurseurs non glucidiques (cf. paragraphe 1.2.3). De façon intéressante, une induction forte de l'expression des gènes de la néoglucogenèse (glutaminase, G6Pase, PEPCCK) a lieu chez des rats ou des souris nourris avec un régime riche en protéines (Mithieux et al., 2005). Ceci aboutit à une production de glucose dans la veine porte pendant la période post-absorptive. La détection de glucose portal active un système de détection nerveux (le signal « glucose portal »), connu depuis des décennies pour son effet coupe-faim et l'activation de cibles hypothalamiques via des afférences nerveuses portales (Delaere et al., 2010). Comme discuté précédemment, le glucose active un signal via la protéine SGLT3 (Delaere et al., 2012), et sa détection centrale se traduit par l'activation des régions impliquées dans l'homéostasie énergétique (hypothalamus, tronc cérébral) et le système de récompense (Delaere et al., 2013).

L'utilisation de souris déficientes dans l'intestin pour la sous-unité catalytique de la G6Pase, *G6PC*, a permis de démontrer que la NGI a un rôle causal dans les effets bénéfiques des régimes riches en protéines. En effet, ces souris sont insensibles à l'effet coupe-faim des régimes hyperprotéiques (Penhoat et al., 2011). Enfin, l'effet coupe-faim des protéines est toujours présent chez des souris dont les composantes hypothalamiques principales contrôlant la prise alimentaire (les récepteurs et neuromédiateurs du système à mélanocortine, cf. paragraphe 2.4.2.2) sont invalidés (Pillot et al., 2011).

L'induction de la NGI est un processus dont l'établissement prend du temps, vu qu'elle est dépendante de l'induction de gènes. Ainsi, la NGI peut perdurer après



**Figure 18. L'effet des régimes protéiques sur la satiété passe par une induction de la néoglucogenèse intestinale.**

La consommation de régimes riches en protéines active la production intestinale de glucose chez le rongeur (Mithieux et al., 2005). Le glucose libéré dans la veine porte est détecté par la protéine SGLT3 au niveau des terminaisons nerveuses portales (Delaere et al., 2012), activant les régions cérébrales responsables de la régulation de la balance énergétique (hypothalamus et tronc cérébral) (Delaere et al., 2013; Mithieux et al., 2005) et des circuits de récompense (Delaere et al., 2013). Un arc réflexe central aboutit alors à la sensation de satiété.

l'assimilation des nutriments, puisqu'elle dépend de l'induction forte de certaines activités enzymatiques. Ceci pourrait expliquer pourquoi les régimes hyperprotéiques diminuent la faim à une période postérieure au repas qui précède, c'est-à-dire pourquoi ils induisent la satiété, et non le rassasiement (Figure 18).

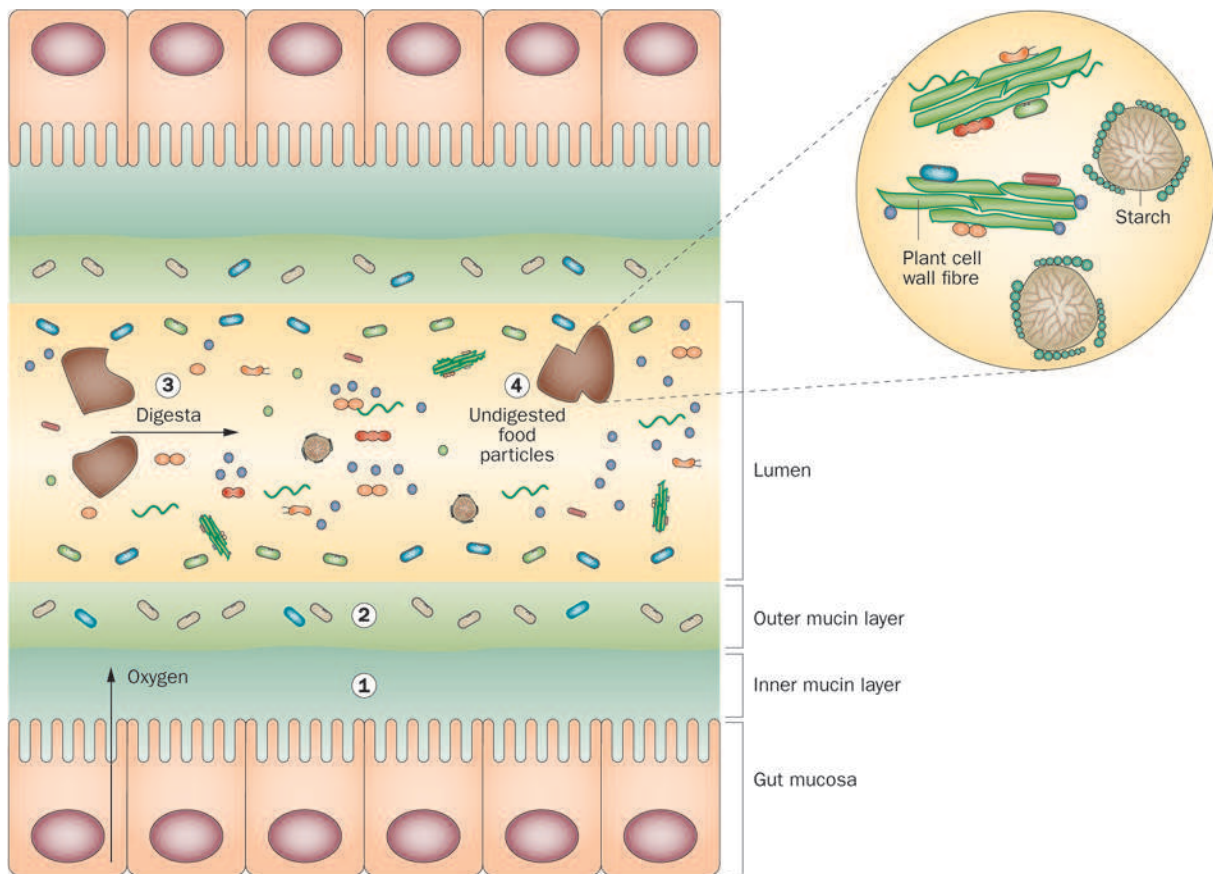
#### **4. INTERACTIONS FONCTIONNELLES ENTRE LE MICROBIOTE INTESTINAL ET LE MÉTABOLISME DE L'HÔTE LORS DES RÉGIMES RICHES EN FIBRES SOLUBLES**

L'intestin d'un Mammifère abrite un grand nombre de micro-organismes (le microbiote intestinal, anciennement appelé flore intestinale). Chez l'Homme, par exemple, le nombre de ces micro-organismes est environ 10 fois supérieur au nombre de cellules humaines (Flint et al., 2012). La relation entre l'hôte Mammifère et les micro-organismes qui colonisent le tractus intestinal est le résultat d'une coévolution longue et complexe (Ley et al., 2008). D'une part, l'impératif principal de l'hôte est de se défendre contre la menace constante d'une infection posée par les micro-organismes de l'intestin. D'autre part, les Mammifères possèdent la capacité de bénéficier des nutriments produits par les micro-organismes. Le développement de l'intestin et du système immunitaire est en effet conditionné par la présence d'un microbiote complexe (Hooper et Macpherson, 2010; Sekirov et al., 2010). La balance entre bénéfices et dommages dépend notamment de l'état du microbiote en termes de distribution, diversité et activité métabolique.

##### **4.1 Microbiote intestinal et nutrition**

###### *4.1.1. Développement et composition du microbiote intestinal*

Le fœtus est microbiologiquement stérile et est colonisé à la naissance par des bactéries provenant de la mère et de l'environnement. Le microbiote initial est instable et subit de grands changements avant la stabilisation lors du sevrage (Mackie et al., 1999; Palmer et al., 2007; Turnbaugh et al., 2009a). Le microbiote est composé d'environ 200 espèces bactériennes principales et plus de 1000 espèces moins communes, et ressemble donc à un organe multicellulaire qui a coévolué avec l'hôte et qui fournit des fonctions métaboliques à celui-ci. Ces fonctions sont notamment le métabolisme de composés



**Figure 19. Microenvironnements microbiens à l'intérieur du gros intestin (Flint et al., 2012).**

Plusieurs microenvironnements dans lesquels les micro-organismes peuvent résider existent dans le gros intestin :

1. la surface épithéliale et la couche de mucine interne (colonisation minimale chez le sujet sain) ;
2. la couche de mucine diffuse (colonisateurs spécialisés, par exemple *Akkermansia muciniphila*) ;
3. la phase liquide luminale (communauté microbienne diverse) ;
4. les particules de substrat luminales (colonisateurs primaires spécialisés, par exemple *Ruminococcus* spp.).

xénobiotiques, d'acides aminés et de glucides (Gill et al., 2006; Kurokawa et al., 2007; Turnbaugh et al., 2009a).

L'environnement intestinal diffère fortement entre les différentes régions anatomiques en termes de physiologie, flux digestifs, disponibilité de substrats, sécrétions de l'hôte, pH et teneur en dioxygène. Le microbiote intestinal apparaît donc comme un ensemble de communautés écologiques exploitant des niches distinctes. Le gros intestin, qui est caractérisé par des flux faibles et un pH neutre à légèrement acide, abrite de loin la plus grande communauté bactérienne (dominé par des bactéries anaérobiques obligatoires). Il existe d'importantes différences dans l'environnement intestinal (entre la partie proximale et la partie distale et entre la partie luminale et la surface de la muqueuse), correspondant à une répartition différente des bactéries (Figure 19).

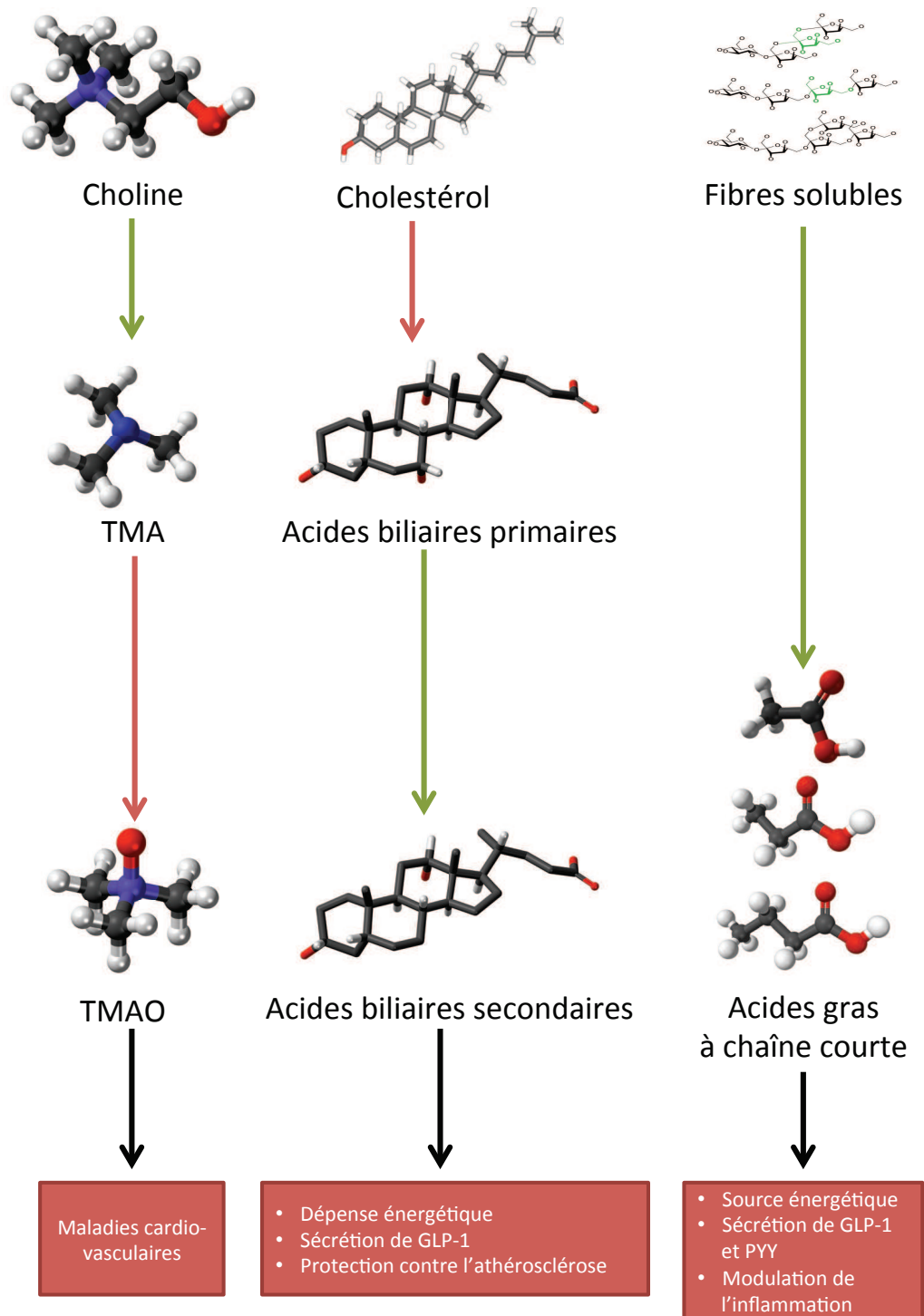
Le microbiote intestinal humain est dominé par des bactéries appartenant à trois phylums majeurs : les Firmicutes (surtout Gram positif : Clostridia, Mollicutes), les Bacteroidetes (surtout Gram négatif : Flavobacterium, Bacteroides et Cytophaga) les Actinobactéries (Gram positif : Bifidobactéries notamment). Ces trois familles représentent plus de 95% de la distribution totale du microbiote (Gill et al., 2006).

#### 4.1.2. *Modulation de la composition du microbiote par l'alimentation*

Le microbiote intestinal est un organe dynamique, comparé à d'autres organes de l'organisme, car la composition cellulaire et le réseau de transcription sont rapidement modifiés en réponse à des variations de l'alimentation (Hildebrandt et al., 2009; Sonnenburg et al., 2005; Turnbaugh et al., 2008, 2009b; Walker et al., 2011). Par exemple, quand des souris sont nourries avec un régime riche en graisses, la composition du microbiote intestinal est altérée en 24 heures, augmentant la proportion de Firmicutes, et particulièrement de la classe *Erysipelotrichi* (Hildebrandt et al., 2009; Turnbaugh et al., 2008, 2009b). L'altération du microbiote est due à l'augmentation des graisses alimentaires, plutôt qu'à l'état obèse (Hildebrandt et al., 2009). Cependant, le microbiote altéré associé à la nourriture riche en graisses serait suffisant pour induire une augmentation de l'obésité après la transplantation dans des souris axéniques (Turnbaugh et al., 2008).

En 2011, une étude a montré que lorsque l'on donne des régimes différant par le type et le contenu en glucides non digestibles à des individus obèses pendant 3 semaines, les profils du microbiote fécal sont déterminés plutôt par l'individu que par le régime (Walker et al., 2011). Ces changements ont lieu en quelques jours, et sont réversibles lors du retour au





**Figure 20. Effets des métabolites bactériens sur le métabolisme de l'hôte** (d'après Tremaroli et Bäckhed, 2012).

La choline, le cholestérol et les fibres solubles sont obtenues par l'alimentation et métabolisés par le microbiote soit directement, soit après des modifications préalables par l'hôte.

Les flèches vertes indiquent des réactions ayant lieu chez les bactéries intestinales, les flèches rouges chez l'hôte.

Abréviations : TMA, triméthylamine ; TMAO, triméthylamine-*N*-oxyde.

régime initial. Les espèces affectées sont principalement celles qui utilisent les glucides non digestibles, mais la même espèce ne répond pas de la même façon chez chaque individu. D'autres études ont montré une forte augmentation de l'abondance des Bifidobactéries suite à un régime riche en inuline ou en galacto-oligosaccharides, mais de nouveau certains individus ne répondent pas au changement (Davis et al., 2011; Ramírez-Farias et al., 2009). Ainsi, les changements de composition en glucides non digestibles affectent la composition du microbiote fécal, mais ces réponses sont notamment influencées par la composition initiale du microbiote. La plasticité du microbiote intestinal et les altérations fortes en réponse au changement d'alimentation pourraient expliquer les résultats divergents obtenus lors d'études chez l'Homme (Ley, 2010).

## **4.2 Métabolisme bactérien dans l'intestin**

Les activités métaboliques des micro-organismes intestinaux ont des conséquences majeures pour l'hôte. Le métabolisme dans les colonies microbiennes anaérobies est hautement interactif, et de nombreuses bactéries se nourrissent d'autres bactéries présentes dans l'intestin (Flint et al., 2007). Bien que la composition du microbiote joue un rôle dans la réponse métabolique (Walker et al., 2005), c'est la disponibilité des substrats qui détermine largement la résultante métabolique (Louis et al., 2007).

La Figure 20 présente un aperçu des effets du métabolisme bactérien sur le métabolisme de l'hôte.

### *4.2.1. Contrôle microbien du métabolisme des acides biliaires*

Les acides biliaires primaires cholique et chénodéoxycholique sont synthétisés à partir de cholestérol, et jouent un rôle essentiel dans la solubilisation et l'absorption du cholestérol, des graisses alimentaires et des vitamines liposolubles. Les acides biliaires primaires sont conjugués à la taurine chez la souris et à la glycine chez l'Homme, et sont réabsorbés dans l'iléon distal pour être transportés dans le foie. Cependant, les bactéries présentes dans cette partie de l'iléon déconjuguent ces acides biliaires. Les acides biliaires déconjugués échappent à l'absorption intestinale et peuvent être métabolisés par les bactéries en acides biliaires secondaires. Étant donné le rôle du microbiote dans la transformation des acides biliaires, les rongeurs axéniques ont une plus grande quantité d'acides biliaires et un profil moins diversifié qu'un rongeur élevé en animalerie conventionnelle (Swann et al., 2011; Wostmann,



1973).

Les acides biliaires agissent également en tant que molécules de signalisation et se lient à des récepteurs cellulaires (Hylemon et al., 2009), tels que le récepteur *Farnesoid X Receptor* (FXR) (Sinal et al., 2000) et le récepteur à 7 domaines transmembranaires TGR5. FXR et TGR5 sont tous les deux impliqués dans l'homéostasie glucidique chez la souris (van Dijk et al., 2009; Thomas et al., 2009). Contrairement à FXR, qui est activé préférentiellement par les acides biliaires primaires, TGR5 se lie également aux acides biliaires secondaires tels que l'acide déoxycholique (formé à partir d'acide cholique) et l'acide lithocholique (formé à partir d'acide chénodéoxycholique). Par ailleurs, une étude a montré que le microbiote régule l'expression des gènes de synthèse des acides biliaires primaires dans le foie par des mécanismes dépendant de FXR (Sayin et al., 2013).

#### 4.2.2. Métabolisme microbien de la choline

La choline est un composant important des membranes cellulaires. Elle est principalement obtenue par l'alimentation (notamment la viande rouge et les œufs), mais peut être également synthétisée par l'hôte (Vance, 2008). La choline est également importante pour le métabolisme lipidique et la synthèse de lipoprotéines à très faible densité (VLDL) dans le foie. Des taux insuffisants de choline sont associés à une altération de l'écologie microbienne et une stéatose hépatique chez la souris (Henaou-Mejia et al., 2012) et l'Homme (Spencer et al., 2011). Particulièrement, une faible abondance de Gamma-protéobactéries et un fort taux d'*Erysipelotrichi* dans le microbiote fécal humain sont associés à la stéatose hépatique (Spencer et al., 2011). Les activités enzymatiques de l'hôte et du microbiote interagissent dans la transformation de la choline en méthylamines toxiques, de telle sorte que la triméthylamine (TMA) produite par les micro-organismes intestinaux est métabolisée en triméthylamine-*N*-oxyde (TMAO) dans le foie de l'hôte (Dumas et al., 2006; Prentiss et al., 1961). Ces transformations peuvent diminuer les quantités de choline disponible et pourraient être à l'origine de stéatose hépatique non alcoolique chez la souris (Dumas et al., 2006).

Une preuve forte de l'implication du microbiote dans les maladies cardio-vasculaires provient de l'étude de l'étude des souris déficientes en apolipoprotéine E. Par rapport aux souris sauvages, ces souris ont tendance à développer de l'athérosclérose. Le phénotype est d'ailleurs plus sévère (augmentation de la proportion de cellules spumeuses et de lésions aortiques) si les souris sont nourries avec un régime supplémenté en choline (Wang et al., 2011). Cependant, le traitement de ces mêmes souris avec un large spectre d'antibiotiques,



ayant pour effet de diminuer considérablement la population du microbiote intestinal, inhibe l'athérosclérose induite par la supplémentation en choline (Wang et al., 2011).

#### 4.2.3. Métabolisme microbien des polysaccharides

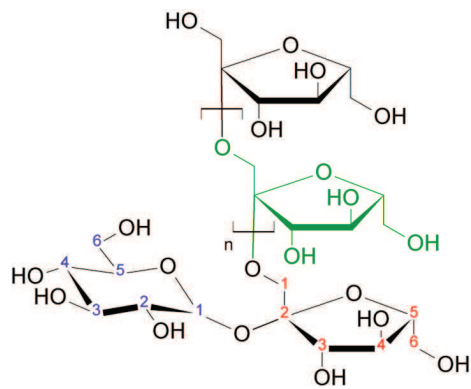
##### 4.2.3.1. Les polysaccharides non solubles

Une grande partie du résidu digestif qui arrive dans le gros intestin est sous la forme de particules insolubles (parois cellulaires des plantes et amidon résistant) (Van Wey et al., 2011), appelées fibres insolubles ou non fermentescibles. Des modèles *in vitro* suggèrent que des groupes spécialisés de bactéries sont impliqués dans la transformation de ces structures (Leitch et al., 2007). L'analyse d'échantillons fécaux de volontaires sains a par ailleurs révélé une plus grande fraction de séquences de Ruminococcaceae associées à la fraction particulaire qu'à la fraction liquide (Walker et al., 2008), alors que les séquences de *Bacteroides* Gram-négatives sont plutôt associées à la partie liquide. Ces résultats suggèrent que certaines bactéries sont préférentiellement associées à la partie non digestible et pourraient être des décomposeurs primaires de ces substrats. Bien que de nombreuses espèces de *Bacteroides* spp. possèdent des génomes riches en gènes codant des protéines à activité glycoside hydrolase (Martens et al., 2009), ces bactéries semblent mieux équipées pour utiliser les glucides solubles que les glucides non solubles (Flint et al., 2008).

##### 4.2.3.2. L'utilisation de substrats provenant de l'hôte

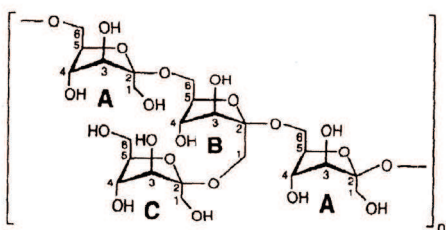
La mucine constitue une barrière protectrice pour l'épithélium intestinal, mais également un substrat potentiel de croissance pour les bactéries intestinales. Le décomposeur de mucine *Akkermansia muciniphila* est un membre important du microbiote colique sain. La dégradation du mucus par cette bactérie produit notamment des acides gras à chaîne courte (AGCC), acétate et propionate (Derrien et al., 2004). Des études ont montré un rôle de cette espèce dans la modulation de la réponse immunitaire chez la souris (Derrien et al., 2011; van Passel et al., 2011). De plus, l'administration journalière d'*A. muciniphila* pendant 4 semaines chez la souris réduit l'obésité et le diabète associés à une alimentation riche en graisses et en sucres (Everard et al., 2013).

D'autres espèces du microbiote, notamment *Bacteroides* spp., ont la capacité d'utiliser des polysaccharides provenant de l'hôte (Martens et al., 2009).

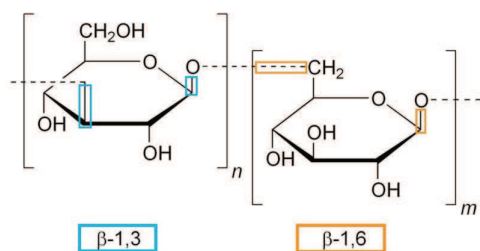


Inuline (si chaîne longue)  
ou  
oligofructose (si chaîne courte)  
*liaisons β-2,1*

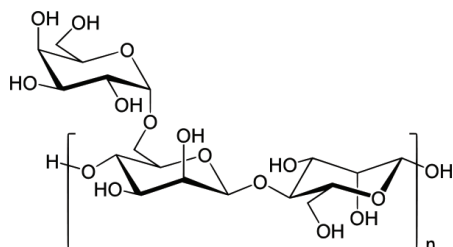
Fructanes



Phléine  
*liaisons β-2,6*



β-glucanes



Gomme de guar

Figure 21. Quelques exemples de fibres solubles (fermentescibles).

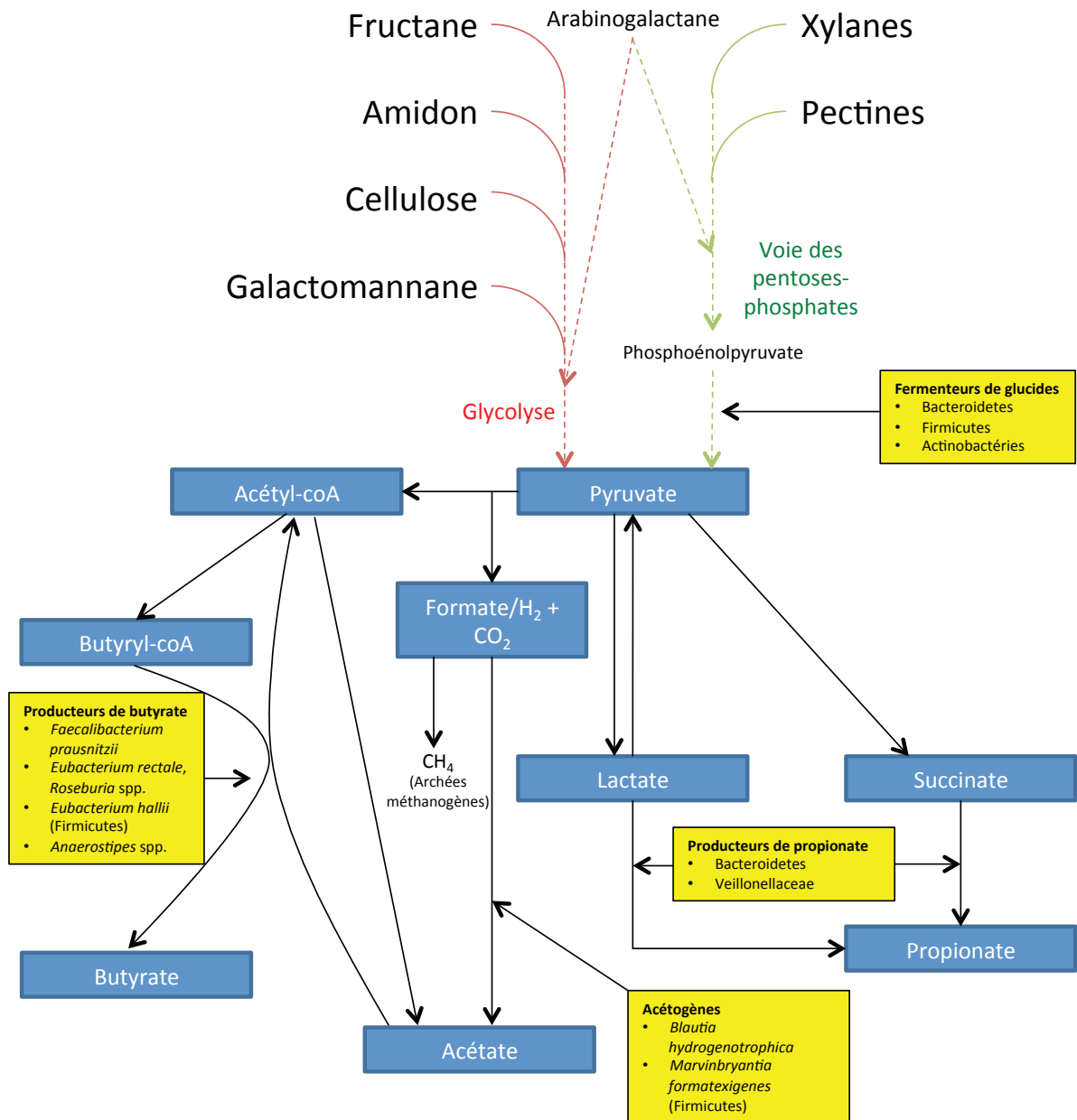
#### 4.2.3.3. Le métabolisme des acides gras à chaîne courte (AGCC)

Bien que certains glucides présents dans la lumière du côlon soient le résultat d'une digestion incomplète en amont, de nombreux glucides apportés par la digestion ne peuvent pas être digérés par la machinerie enzymatique de l'hôte. C'est notamment le cas de certains oligosaccharides, dont les liaisons  $\beta$ -glucosidiques, fructosidiques et galactosidiques sont uniquement hydrolysées par le microbiote. Ces substances portent le nom de fibres alimentaires solubles ou fermentescibles (Figure 21).

Dans les conditions anaérobiques du gros intestin, les glucides non digestibles sont principalement fermentés en AGCC (acétate, propionate et butyrate) et en gaz (dihydrogène, dioxyde de carbone, méthane et sulfure d'hydrogène). Généralement, l'acétate est l'AGCC avec les concentrations plasmatique et fécale les plus élevées, suivi du propionate puis du butyrate (Cummings et al., 1987; Macfarlane et Macfarlane, 2003). Les AGCC ont des effets variés sur l'hôte, en tant notamment que source d'énergie pour l'hôte. Le butyrate est essentiellement consommé par les cellules épithéliales du côlon, alors que l'acétate est disponible dans la circulation systémique (Pomare et al., 1985). Les effets détaillés des AGCC sur le métabolisme de l'hôte seront discutés ultérieurement. Cette partie se concentrera notamment sur la synthèse d'AGCC par le microbiote.

Des progrès considérables dans la détermination des espèces à rôles clés dans le métabolisme anaérobie ont été effectués grâce à la détection moléculaire basée sur l'ARNr 16S et de nouvelles approches de métagénomique (Louis et al., 2007). Deux bactéries productrices de butyrate appartenant au phylum des Firmicutes, *Faecalibacterium prausnitzii* et *Eubacterium rectale*, par exemple, sont parmi les bactéries les plus abondantes dans la communauté microbienne d'un individu sain (Louis et al., 2010; Walker et al., 2011). Bien que ces deux espèces utilisent des voies métaboliques semblables pour la synthèse de butyrate, basées sur la butyryl-coA:acétyl-coA transférase (Louis et Flint, 2009), des données expérimentales indiquent qu'elles exploitent des niches écologiques distinctes. *E. rectale* et *Roseburia* spp., phylogénétiquement proche de cette dernière, sont des bactéries flagellées capables d'utiliser une variété de polysaccharides, spécialement l'amidon (Aminov et al., 2006; Ramsay et al., 2006; Scott et al., 2011). *F. prausnitzii* n'est pas flagellée et est incapable d'utiliser de nombreux polysaccharides, y compris l'amidon (Lopez-Siles et al., 2012). Des données obtenues sur des volontaires humains montrent que les régimes amaigrissants pauvres en glucides diminuent la proportion de butyrate parmi les AGCC





**Figure 22. Groupes fonctionnels et phylogénétiques impliqués dans le métabolisme des acides gras à chaîne courte** (d'après Flint et al., 2012; Macfarlane et Macfarlane, 2003).

Les principales sources de glucides fermentescibles sont représentées selon la voie métabolique de dégradation : glycolyse (en rouge) et voie des pentoses-phosphates (en vert).

(Brinkworth et al., 2009; Duncan et al., 2007), en corrélation avec une diminution des bactéries productrices de butyrate *Roseburia* et *E. rectale* (Duncan et al., 2007; Russell et al., 2011). A l'opposé, l'abondance de *F. prausnitzii* est peu affectée par les régimes pauvres en glucides (Duncan et al., 2007; Walker et al., 2011). A l'inverse, un régime riche en fibres solubles augmente l'abondance de *F. prausnitzii* (Dewulf et al., 2013).

Des acides organiques tels que le lactate, le succinate et le formate servent généralement d'intermédiaires dans le métabolisme microbien, étant donné les possibilités d'interconversion (Figure 22). Certains Firmicutes dominants dans le côlon sain, *Eubacterium hallii* et *Anaerostipes* spp., ont la capacité de convertir le lactate et l'acétate en butyrate (Duncan et al., 2004). La proportion d'*E. hallii* est notamment augmentée dans des cultures fécales *in vitro* en présence de lactate (Belenguer et al., 2007). Étant donné la formation généralisée de lactate et son pKa faible (3,9), les activités de ces bactéries utilisatrices de lactate ont probablement un rôle majeur dans le maintien de l'homéostasie du microbiote. Le lactate peut s'accumuler dans des conditions de dysbiose (par exemple dans des cas de colite sévère) (Vernia et al., 1988), probablement à cause de la croissance de bactéries productrices de lactate à un pH réduit (Belenguer et al., 2007). L'acétate, l'AGCC à la plus forte concentration parmi les AGCC fécaux, est également un intermédiaire qui est consommé par les bactéries majeures productrices de butyrate (Louis et Flint, 2009).

Bien que la plupart des glucides soient fermentés par des voies communes aboutissant à la production d'AGCC, certains requièrent des voies alternatives. Les désoxyhoses tels que le fucose et le rhamnose, par exemple, sont fermentés par certaines bactéries intestinales via la production de propanediol, aboutissant à terme à la production de propionate et propanol (Scott et al., 2006). La production de propionate à partir d'hexoses est principalement associée aux Bacteroidetes et aux Veillonellaceae (Firmicutes). La voie majeure de formation du propionate se fait à partir de succinate (Linehan et al., 1978; Paynter et Elsdén, 1970). Quelques types de bactéries sont capables de produire du propionate par une voie alternative, à partir de lactate, qui est converti en acrylate (Baldwin et al., 1963).

D'autres AGCC peuvent être produits par le microbiote lors de la fermentation des molécules alimentaires. La fermentation d'acides aminés dérivés de protéines alimentaires ou de protéines de l'hôte aboutit à un grand nombre de produits (Smith et Macfarlane, 1997). Les acides gras à chaîne branchée (isobutyrate, 2-méthylbutyrate et isovalérate) fécaux sont indicatifs de la fermentation des acides aminés à chaîne branchée (valine, leucine, isoleucine). Leur concentration fécale est notamment augmentée lors d'une alimentation riche en



protéines (Russell et al., 2011).

### 4.3 Le microbiote intestinal et le métabolisme de l'hôte

#### 4.3.1. Microbiote et obésité

Le microbiote intestinal est altéré chez les personnes obèses, et peut répondre à des variations de poids corporel. Le microbiote du caecum des souris *ob/ob*, génétiquement obèses en raison d'un déficit de production de leptine, contient plus de Firmicutes et moins de Bacteroidetes que celui des souris sauvages élevées dans les mêmes cages, même lorsque les souris sont nourries avec le même régime pauvre en graisses et riche en polysaccharides (Ley et al., 2005). Des changements similaires ont été également observés dans le microbiote fécal d'Hommes obèses (Ley et al., 2006). La proportion de Bacteroidetes augmente lors de la perte de poids, que ce soit par une restriction de graisses ou de glucides (Ley et al., 2006), ce qui suggère que les Bacteroidetes répondent à la quantité de calories alimentaires. Un effet semblable est constaté après la perte de poids consécutive à une chirurgie de type by-pass gastrique. Chez ces patients, des proportions accrues de *Bacteroides* et *Prevotella* sont négativement corrélées à la prise alimentaire et l'adiposité (Furet et al., 2010). Cependant, d'autres études ne montrent pas un changement du ratio Firmicutes/Bacteroidetes (Duncan et al., 2008; Schwartz et al., 2010; Zhang et al., 2009). Deux études récentes ont montré que les individus sains avaient un enrichissement génétique du microbiote, comparé au microbiote des individus obèses (Le Chatelier et al., 2013; Cotillard et al., 2013). Bien que l'obésité et la prise alimentaire affectent la composition du microbiote, la contribution claire du microbiote à l'obésité n'a à ce jour pas été démontrée.

Le by-pass gastrique occasionne une perte de poids durable et réduit fortement le risque de diabète de type 2 et de maladies cardio-vasculaires pour une personne obèse. Ces caractéristiques ont permis d'explorer plus amplement la relation entre le microbiote et l'obésité. Après un by-pass gastrique, par exemple, l'abondance fécale de la bactérie productrice de butyrate *Faecalibacterium prausnitzii* est fortement augmentée (Furet et al., 2010). L'abondance de cette bactérie est négativement corrélée avec des marqueurs inflammatoires, suggérant que la bactérie module l'inflammation systémique (commune au diabète et à l'obésité) et contribue à l'amélioration des maladies métaboliques. De plus, les souris axéniques sont résistantes au développement de l'obésité, et le traitement de souris obèses avec des antibiotiques réduit l'adiposité et l'inflammation du tissu adipeux, tout en



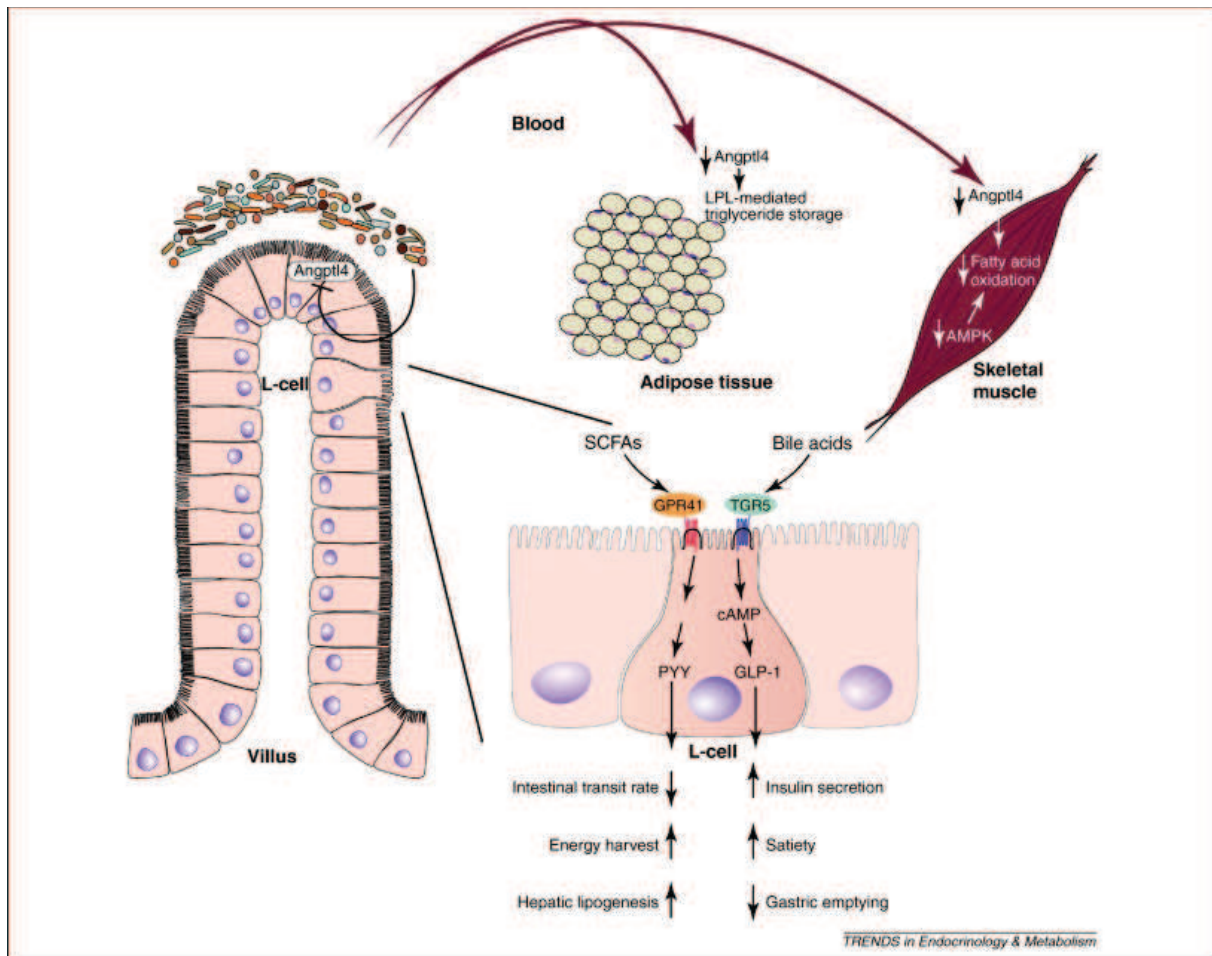
améliorant le métabolisme glucidique (Bäckhed et al., 2004; Caesar et al., 2012; Membrez et al., 2008).

#### 4.3.2. *Le microbiote intestinal et la récolte d'énergie*

Comme expliqué au paragraphe 4.2.3.3, la fermentation des polysaccharides par le microbiote aboutit essentiellement à la formation d'AGCC.

Les modalités de fermentation intestinale, et par conséquent les types et quantités d'AGCC produits, sont déterminées par la quantité de polysaccharides consommés et la composition du microbiote intestinal. Par exemple, la fermentation de fructanes (fructo-oligosaccharides) augmente lorsque des souris axéniques colonisées avec *Bacteroides thetaiotaomicron* sont co-colonisées avec *Methanobrevibacter smithii* (Samuel et Gordon, 2006). *B. thetaiotaomicron* produit plus de formate et d'acétate, et *M. smithii* utilise le formate pour la méthanogenèse. Ces interactions induisent une fermentation glucidique plus efficace et une augmentation de l'absorption intestinale d'énergie, résultant en une augmentation de l'adiposité chez les souris co-colonisées par rapport aux souris colonisées seulement avec *B. thetaiotaomicron*. La composition du microbiote intestinal et les interactions métaboliques entre les espèces peuvent ainsi affecter la digestion et la récolte d'énergie.

Des données directes sur le rôle du microbiote dans la récolte d'énergie proviennent des données sur les rats axéniques, qui ont des taux intestinaux réduits d'AGCC (Høverstad et Midtvedt, 1986), et un contenu calorique dans les fèces et l'urine doublé par rapport à des rats nourris avec le même régime riche en polysaccharides (Wostmann et al., 1983). Les rongeurs axéniques compensent la récolte énergétique réduite par une augmentation de la prise alimentaire (Wostmann et al., 1983). Les souris axéniques ont également une adiposité réduite, mais cette caractéristique est perdue 14 jours après la colonisation avec une flore provenant d'animaux conventionnels (Bäckhed et al., 2004; Caesar et al., 2012). La récolte énergétique microbienne a été étudiée chez des souris *ob/ob*, qui ont un contenu accru d'AGCC dans le caecum et un contenu calorique fécal réduit par rapport aux souris sauvages élevées dans la même cage (Turnbaugh et al., 2006). Les données métagénomiques ont révélé un enrichissement en fonctions géniques liées à la dégradation de polysaccharides chez les souris *ob/ob* (Turnbaugh et al., 2006). Ces résultats sont également vrais chez l'Homme : le microbiote fécal de personnes obèses a une capacité de récolte énergétique accrue (Turnbaugh et al., 2009a). Chez les souris, le phénotype obèse est transmissible par des transplantations de



**Figure 23. Contrôle du métabolisme de l'hôte par le microbiote intestinal (Greiner et Bäckhed, 2011).**

Le microbiote inhibe l'expression de la protéine Angptl4 dans l'intestin, ayant pour conséquence le stockage de graisses dans le tissu adipeux. De plus, cette inhibition, associée à une inhibition d'AMPK, réduit l'oxydation des acides gras dans le muscle squelettique. Le microbiote a également des effets sur les cellules L entéroendocrines : les acides gras à chaîne courte (SCFAs) se lient au récepteur GPR41, stimulant la sécrétion de PYY. La sécrétion de PYY réduit le transit intestinal, augmente la récolte d'énergie et stimule la lipogenèse hépatique. De plus, la production d'acides biliaires secondaires par le microbiote aboutit à leur liaison au récepteur TGR5. La stimulation de TGR5 induit la libération de GLP-1, activant la sécrétion d'insuline, la satiété et inhibant la vidange gastrique.

microbiote, et les souris axéniques colonisées avec un microbiote provenant de souris obèses ont une prise de poids doublée par rapport à des souris colonisées avec un microbiote provenant de donneurs maigres (Turnbaugh et al., 2006). Toutefois, cette étude ne détermine pas si ces changements sont dus à un microbiote propre aux individus obèses ou si celui-ci est la conséquence d'une ingestion accrue de calories.

#### 4.3.3. *Microbiote intestinal et lipogenèse de novo*

La colonisation de souris axéniques augmente la fermentation de polysaccharides en AGCC, ainsi que l'absorption de glucose dans l'intestin grêle (Bäckhed et al., 2004). Les taux accrus d'AGCC sont associés à une augmentation de la lipogenèse dans le foie et de la production de VLDL (Bäckhed et al., 2004; Velagapudi et al., 2010). Le microbiote intestinal module l'expression de protéines sécrétées par l'intestin grêle. L'une de ces protéines est l'inhibiteur de la lipoprotéine lipase (LPL) *angiopoietin-like protein 4* (Angptl4, également connu sous le nom de *fasting-induced adipose factor*, Fiaf). La colonisation de souris axéniques inhibe l'expression d'Angptl4 dans l'iléon, accompagné d'une augmentation de l'activité LPL et du stockage de graisses dans le tissu adipeux blanc (Bäckhed et al., 2004, 2007). De même, les souris axéniques déficientes en Angptl4 ont une adiposité semblable aux souris colonisées (Bäckhed et al., 2004). Ces résultats suggèrent que la dégradation microbienne des polysaccharides en AGCC peut directement influencer l'adiposité de l'hôte.

La compréhension des mécanismes permettant la définition d'un « intestin sain » a subi une avancée avec les découvertes récentes du rôle du microbiote dans le métabolisme de l'hôte. Mis à part leur effet sur la récolte énergétique, peu de données sont disponibles sur les réseaux de signalisation contrôlés par le microbiote intestinal. Certains mécanismes ont été proposés à ce jour (Greiner et Bäckhed, 2011) (Figure 23) pour rendre compte des effets métaboliques du microbiote intestinal.

## 4.4 Les AGCC et leurs effets bénéfiques lors des régimes riches en fibres

### 4.4.1. *Les régimes riches en fibres*

Chez les individus obèses, des modifications de la composition du microbiote ont lieu non seulement au niveau des phylums, mais également au niveau d'espèces (Ley, 2010). Par





exemple, un nombre décri de Bifidobactéries à la naissance a été corrélé à un surpoids postérieur pendant l'enfance (Kalliomäki et al., 2008). Chez les adultes, le nombre de Bifidobactéries est légèrement augmenté chez les obèses (Schwiertz et al., 2010). Cette modification est également présente chez les sujets diabétiques de type 2, comparés aux sujets sains (Wu et al., 2010).

L'idée de modifier la composition en Bifidobactéries a été à l'origine du concept de prébiotiques (Roberfroid et al., 2010), défini comme «une stimulation sélective de la croissance ou des activités d'un certain nombre de genres/espèces de bactéries du microbiote intestinal, conférant des effets bénéfiques à l'hôte». Les fructanes, ou fructo-oligosaccharides, présents naturellement dans certains fruits, sont utilisés comme substrat énergétique par certaines bactéries (Figure 22), dont *Bifidobacterium* spp., qui expriment la  $\beta$ -fructofuranosidase. La présence de ces polysaccharides dans l'intestin stimule le développement de ces bactéries. Une augmentation remarquable du nombre de *Bifidobacterium* spp. a été observée chez des souris diabétiques (par l'alimentation ou génétiquement) suite à une supplémentation du régime avec des fructanes de type inuline (Cani et al., 2007, 2009; Dewulf et al., 2011). L'augmentation de Bifidobactéries était, dans ce cas, inversement corrélée au développement de la masse grasse et l'intolérance au glucose (Cani et al., 2007). La supplémentation en fructanes induit par ailleurs une augmentation du nombre de cellules L dans le côlon et le jéjunum, et active la sécrétion de GLP-1 dans la veine porte (Cani et al., 2006; Delzenne et al., 2007).

Chez l'Homme, les bénéfices des régimes riches en fibres solubles telles que les fructanes sont connus depuis longtemps. Ces régimes améliorent la sensibilité à l'insuline et la tolérance au glucose chez des sujets sains (Robertson et al., 2003, 2005) et diabétiques (Mendeloff, 1977; Ray et al., 1983). Les AGCC sont souvent considérés comme responsables des bénéfices des régimes riches en fibres, par leur capacité à réguler l'homéostasie énergétique (Layden et al., 2013).

#### 4.4.2. Les AGCC et leur rôle sur le métabolisme

Paradoxalement, les concentrations fécales en AGCC sont plus élevées chez les individus obèses que chez les individus sains (Schwiertz et al., 2010). Etant donné que les régimes riches en fibres sont efficaces pour la perte de poids, de nombreuses études ont cherché à déterminer l'impact d'un régime enrichi en AGCC. Des souris nourries avec un régime riche en graisses supplémenté avec du butyrate ont une dépense énergétique et une



thermogenèse augmentée, et résistent à l'obésité (Gao et al., 2009). De la même manière, l'injection orale d'acétate chez le rat OLETF (cf. paragraphe 2.2.2) réduit la prise de poids et augmente la tolérance au glucose (Yamashita et al., 2007). Une autre étude a montré que l'acétate, le propionate et le butyrate sont chacun séparément protecteurs contre l'obésité induite par l'alimentation (Lin et al., 2012). Ces études sur les rongeurs suggèrent qu'une concentration accrue d'AGCC circulants protège, au moins partiellement, contre l'obésité, bien que ces études n'aient pas déterminé les concentrations d'AGCC circulants.

Peu d'études ont examiné le rôle des AGCC dans la régulation de la glycémie chez l'Homme. Une étude de 1988 a montré qu'un traitement oral avec de l'acétate n'améliore pas la tolérance au glucose chez l'Homme (Scheppach et al., 1988). Une autre étude a démontré que la perfusion gastrique d'acétate et de propionate n'influence pas la production hépatique de glucose chez l'Homme (Laurent et al., 1995).

Des études supplémentaires *in vivo* suggèrent un rôle indirect des AGCC dans l'homéostasie glucidique. Une étude a montré que la sécrétion de glucagon peut être régulée par les AGCC lorsque ceux-ci sont perfusés dans le caecum (Wolever et al., 1991). De plus, la concentration plasmatique de PYY et GLP-1 est augmentée par des perfusions rectales ou intraveineuses d'acétate (Freeland et Wolever, 2010), suggérant un lien entre AGCC et homéostasie glucidique.

En plus des études *in vivo* précédentes, des études *in vitro* ont étudié les effets des AGCC sur la sécrétion d'insuline. Par exemple, le propionate inhibe la sécrétion d'insuline stimulée par le glucose dans des îlots de rat en culture (Ximenes et al., 2007). Cependant, des études sur des îlots de ruminants ont montré au contraire que les AGCC induisent une augmentation de la sécrétion d'insuline (Horino et al., 1968). Il est important de noter que, chez les ruminants, le propionate est un substrat énergétique majeur (cf. paragraphe 1.1.2), ce qui pourrait expliquer ces différences. Bien que ces données suggèrent un rôle des AGCC sur la sécrétion d'insuline, il ne semble pas clair que ces effets soient aussi présents *in vivo*.

D'autre part, des études ont montré un effet hypocholestérolémiant du propionate chez le rongeur (Anderson et Chen, 1979; Anderson et Siesel, 1990; Wright et al., 1990). Peu d'études ont exploré les effets du butyrate sur le métabolisme lipidique. Une étude a montré qu'un régime supplémenté en butyrate réduit les taux plasmatiques de triglycérides et de cholestérol chez la souris (Gao et al., 2009), mais ces effets sont peut-être le résultat secondaire de l'amélioration d'autres paramètres (réduction de l'adiposité et sensibilité accrue à l'insuline). L'administration d'acétate, quant à elle, décroît le taux de triglycérides



circulants chez l'Homme, que ce soit par voie orale (Crouse et al., 1968) ou intraveineuse (Akanji et Hockaday, 1990; Fernandes et al., 2012).

Ces études montrent bien des effets bénéfiques des AGCC sur le métabolisme énergétique, mais jusqu'à ce jour aucun mécanisme n'a été proposé pour rendre compte de ces améliorations. Une augmentation de la dépense énergétique et une réduction de la prise alimentaire ont été observées dans certaines études (Arora et al., 2011; Gao et al., 2009; Lin et al., 2012), mais aucune étude n'a permis de démontrer si ces effets étaient la cause ou la conséquence des améliorations métaboliques.

#### 4.4.3. Les récepteurs des AGCC et leur rôle dans le métabolisme

En plus de leurs effets sur le métabolisme, les AGCC ont été identifiés comme des ligands endogènes des récepteurs orphelins GPR41 et GPR43 (Brown et al., 2003). Ces deux récepteurs ont depuis été rebaptisés *free fatty acid receptor 3* (FFAR3) et *free fatty acid receptor 2* (FFAR2) respectivement. FFAR2 a une affinité préférentielle pour les AGCC plus courts (acétate et propionate), alors que FFAR3 se lie au butyrate, au propionate et à l'isovalérate, avec une affinité moindre pour l'acétate (Stoddart et al., 2008). Ces récepteurs sont exprimés dans de nombreuses cellules, comme les cellules immunitaires (Brown et al., 2003), les adipocytes (Hong et al., 2005), les neurones sympathiques (Kimura et al., 2011), les entérocytes (Tazoe et al., 2009) et les cellules L entéroendocrines (Tolhurst et al., 2012). FFAR2 et FFAR3 sont couplés à des protéines Gai/o (i.e. qui inhibent la synthèse d'AMPc), mais FFAR2 peut être également couplé à des protéines Gαq comme la gustducine (i.e. qui activent la synthèse de diacylglycérol et d'inositol triphosphate) (Li et al., 2013).

Les modèles de souris transgéniques ont permis d'étudier de façon plus précise les implications de ces récepteurs dans l'homéostasie énergétique. Les souris invalidées pour FFAR2 ont, par exemple, une prise de poids ralentie par rapport aux souris sauvages souris avec un régime riche en graisses, avec une masse grasse réduite mais une masse maigre accrue (Bjursell et al., 2011). Cependant, ce modèle ne semble pas approprié pour l'étude du récepteur, car l'expression de FFAR3 est fortement altérée, suggérant des effets compensatoires dus à l'absence de FFAR2 (Bjursell et al., 2011; Tolhurst et al., 2012). De plus, d'autres études ont montré que les souris déficientes en FFAR2 sont obèses sous un régime standard, mais ces différences pourraient être dues à une différence de fond génétique entre les souris (Kimura et al., 2013).



Une étude a démontré que les souris recolonisées déficientes en FFAR3 étaient plus maigres que les souris sauvages, alors qu'il n'y avait pas de différence lorsque ces souris étaient axéniques (Samuel et al., 2008). De même, une activation accrue de FFAR3 chez des souris sauvages recolonisées induit une augmentation de la sécrétion de PYY (Figure 23), associée à une augmentation de la lipogenèse hépatique (Samuel et al., 2008). Une augmentation similaire de la sécrétion de GLP-1 suite à l'activation de FFAR2 a été observée chez la souris (Tolhurst et al., 2012). Cependant, une étude récente a également montré que des effets bénéfiques des AGCC pouvaient prendre place en absence de FFAR3 (Lin et al., 2012), suggérant des effets compensatoires permanents entre FFAR2 et FFAR3. A ce jour, aucune équipe n'a étudié de souris invalidée pour FFAR2 et FFAR3, ce qui pourrait apporter une vision plus complète de l'implication de ces récepteurs dans la régulation de la balance énergétique.





## **RÉSULTATS**



**Duraffourd, C., De Vadder, F., Goncalves, D., Delaere, F., Penhoat, A., Brusset, B., Rajas, F., Chassard, D., Duchamp, A., Stefanutti, A., Gautier-Stein, A. et Mithieux, G. (2012). Mu-opioid receptors and dietary protein stimulate a gut-brain neural circuitry limiting food intake. *Cell* 150, 377-388.**



Etant donné l'augmentation globale des cas d'obésité et des co-morbidités associées telles que le diabète de type 2, une meilleure compréhension des mécanismes contrôlant l'homéostasie énergétique est nécessaire. Un champ d'application de plus en plus important implique la recherche sur les signaux hormonaux que l'intestin produit en réponse à l'assimilation des nutriments, et qui modulent la faim et l'appétit (cf. paragraphes 2.2 et 2.3).

La NGI est un processus physiologique qui influence le contrôle de l'homéostasie énergétique dans l'état nourri post-absorptif (Mithieux et al., 2009). L'induction de la NGI se traduit par une libération de glucose dans la veine porte. Sa détection par un capteur portal et la transmission de ce signal au cerveau initient une diminution de la faim et une augmentation de la sensibilité à l'insuline. Ce processus a lieu particulièrement lors des régimes hyperprotéiques (Mithieux et al., 2005; Pillot et al., 2009) et à la suite d'une opération de type by-pass gastrique (Troy et al., 2008). Le rôle causal de la NGI dans la satiété induite par les régimes hyperprotéiques a été démontré par l'étude de souris invalidées spécifiquement pour le gène de la *G6pc* dans l'intestin (Penhoat et al., 2011). Cependant, un lien manquant concernait le mécanisme par lequel les protéines induisent la NGI.

L'une des propriétés connues depuis longtemps des protéines est la capacité de certaines d'entre elles (par exemple la caséine) à libérer des oligopeptides à activité  $\mu$ -opioïde après digestion protéolytique (Zioudrou et al., 1979). La littérature fait aussi mention de l'activité  $\mu$ -opioïde de plusieurs oligopeptides, dont la structure minimale est un dipeptide (Capasso et al., 1997; Moritoki et al., 1984; Shiomi et al., 1981). Etant donné le rôle clé des MOR dans la régulation de la prise alimentaire et la forte expression de ceux-ci dans l'intestin (cf. paragraphe 3.2), nous nous sommes posé la question de la relation entre digestion protéolytique, signalisation par les MOR et induction de la NGI.

En effet, les protéines alimentaires pourraient exercer une signalisation systémique à travers leurs résidus protéolytiques à activité  $\mu$ -opioïde (Meisel et FitzGerald, 2000; Zioudrou et al., 1979). Cependant, il semble douteux que ces résidus puissent atteindre le cerveau. En effet, la  $\beta$ -casomorphine 1-7, un agoniste MOR libéré par la dégradation de la  $\beta$ -caséine du lait, est dégradée entièrement par le foie (Kreil et al., 1983) et n'est pas détectée dans le sang systémique après ingestion de lait ou de produits laitiers (Teschemacher et al., 1986). En accord avec cette idée, la naloxone, un antagoniste MOR activement dégradé par le foie (Greenwood-Van Meerveld et al., 2004; Reimer et al., 2009), est capable de supprimer la prise alimentaire lorsqu'elle est administrée oralement chez l'Homme (Yeomans et Gray, 2002). Ceci suggère que la drogue pourrait moduler la faim à partir d'un site localisé dans le tractus gastro-intestinal.



Dans cette étude, nous utilisons dans un premier temps des perfusions d'agonistes et antagonistes MOR dans la veine porte. Nous concluons ainsi que les MOR présents dans la veine porte initient un circuit neural intestin-cerveau contrôlant la NGI. Par la suite, nous démontrons que les protéines alimentaires agissent dans ce site gastrointestinal pour induire la NGI et la satiété via les propriétés antagonistes MOR de leurs résidus protéolytiques.





# Mu-Opioid Receptors and Dietary Protein Stimulate a Gut-Brain Neural Circuitry Limiting Food Intake

Celine Duraffourd,<sup>1,2,3,5</sup> Filipe De Vadder,<sup>1,2,3,5</sup> Daisy Goncalves,<sup>1,2,3</sup> Fabien Delaere,<sup>1,2,3</sup> Armelle Penhoat,<sup>1,2,3</sup> Bleuenn Brusset,<sup>1,2,3</sup> Fabienne Rajas,<sup>1,2,3</sup> Dominique Chassard,<sup>1,2,3,4</sup> Adeline Duchamp,<sup>1,2,3</sup> Anne Stefanutti,<sup>1,2,3</sup> Amandine Gautier-Stein,<sup>1,2,3</sup> and Gilles Mithieux<sup>1,2,3,\*</sup>

<sup>1</sup>Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, U 855, Lyon 69372, France

<sup>2</sup>Université de Lyon, Lyon 69008, France

<sup>3</sup>Université Lyon 1, Villeurbanne 69622, France

<sup>4</sup>Hospices Civils de Lyon, HFME, Bron 69250, France

<sup>5</sup>These authors contributed equally to this work

\*Correspondence: gilles.mithieux@inserm.fr

<http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2012.05.039>

## SUMMARY

Intestinal gluconeogenesis is involved in the control of food intake. We show that mu-opioid receptors (MORs) present in nerves in the portal vein walls respond to peptides to regulate a gut-brain neural circuit that controls intestinal gluconeogenesis and satiety. In vitro, peptides and protein digests behave as MOR antagonists in competition experiments. In vivo, they stimulate MOR-dependent induction of intestinal gluconeogenesis via activation of brain areas receiving inputs from gastrointestinal ascending nerves. MOR-knockout mice do not carry out intestinal gluconeogenesis in response to peptides and are insensitive to the satiety effect induced by protein-enriched diets. Portal infusions of MOR modulators have no effect on food intake in mice deficient for intestinal gluconeogenesis. Thus, the regulation of portal MORs by peptides triggering signals to and from the brain to induce intestinal gluconeogenesis are links in the satiety phenomenon associated with alimentary protein assimilation.

## INTRODUCTION

Given the worldwide increase in cases of obesity and associated illnesses such as type 2 diabetes, the scientific community has been urged to improve our understanding of the mechanisms underlying energy homeostasis. An increasingly important area of investigation involves the hormonal signals that the gut produces in response to nutrient assimilation and that modulate hunger, such as cholecystokinin (CCK), glucagon-like peptide 1, and peptide YY (Gibbs et al., 1976; Morley et al., 1983; Turton et al., 1996). In particular, the enteric neural system plays a key role in sensing and transmitting signals to the brain (Berthoud, 2004; Moran, 2000; Vahl et al., 2007).

Intestinal gluconeogenesis is a newly described process (Croset et al., 2001; Mithieux et al., 2004a; Mithieux et al., 2004b; Rajas et al., 1999; Rajas et al., 2000) that influences the control of glucose and energy homeostasis in the fed postabsorptive state (for review see Mithieux, 2009). The induction of intestinal gluconeogenesis translates into a release of glucose in the portal vein, which collects blood from the whole gut. Its detection by a portal glucose sensor and the transmission of this signal to the brain by the peripheral neural system initiate a decrease in hunger and an improvement in the insulin sensitivity of hepatic glucose production. This above all takes place in two particular nutritional situations, i.e., feeding with a protein-enriched diet (PED) (Mithieux et al., 2005; Pillot et al., 2009) and after gastric bypass surgery (Troy et al., 2008). The role played by intestinal gluconeogenesis in the satiety initiated by PED has been confirmed recently. Indeed, mice with an intestinal-specific knockout of the catalytic subunit (G6PC) of glucose-6 phosphatase (G6Pase, the essential enzyme of gluconeogenesis) proved insensitive to PED-induced satiety (Penhoat et al., 2011).

A long-known and intriguing property of proteins is that a number of them, especially those involved in human nutrition such as caseins from milk, release oligopeptides exhibiting  $\mu$ -opioid activity in vitro upon partial proteolytic digestion (Zioudrou et al., 1979). Moreover, the literature on the subject mentions the  $\mu$ -opioid activity of various oligopeptides, of which the minimal structure required is a dipeptide (Capasso et al., 1997; Moritoki et al., 1984; Schiller et al., 2002; Shiomi et al., 1981). It is also known that the modulation of  $\mu$ -opioid receptors (MORs) can interfere with the control of food intake. Agonists enhance food intake, whereas antagonists inhibit it (see the review by Yeomans and Gray, 2002). Interestingly, MORs are most widely expressed in two organs of the body: the brain, especially in the regions implicated in the control of food intake and reward-driven appetite (Ding et al., 1996; George et al., 1994; Will et al., 2003), and the small intestine, where they control gut motility, including bowel movements (Hedner and Cassuto, 1987; Sternini, 2001; Sternini et al., 2004). Food proteins are



absorbed from the intestinal lumen after incomplete proteolysis. It has been hypothesized that food proteins (e.g., caseins) might exert a systemic signaling role via their proteolytic digests with  $\mu$ -opioid activity (Meisel and FitzGerald, 2000; Zioudrou et al., 1979). However, that the latter might reach the brain following oral ingestion seems questionable. Indeed,  $\beta$ -casomorphin 1-7 ( $\beta$ 1-7), an MOR agonist released by the digestion of  $\beta$ -casein, is degraded by the liver (Kreil et al., 1983) and is not detected in systemic blood after the ingestion of milk or dairy products (Teschemacher et al., 1986). Alternatively, MOR modulators from an alimentary origin might act at a gastrointestinal or mesenteric portal site (Holzer, 2009; Meisel and FitzGerald, 2000). In line with this rationale, naloxone (Nalox), a chemical MOR antagonist that is actively degraded by the liver (Greenwood-Van Meerveld et al., 2004; Reimer et al., 2009), can suppress food intake when given orally in humans (Yeomans and Gray, 2002). This suggests that the drug might modulate hunger sensations from a gastrointestinal site.

In this work, we first use intraportal infusions of MOR agonists and antagonists to establish that MORs present at a portal site initiate a gut-brain neural circuit of intestinal gluconeogenesis regulation. Then, we demonstrate that alimentary proteins act at this gastrointestinal site to induce gut gluconeogenesis-dependent satiety via the MOR antagonist properties of their oligopeptide digests.

## RESULTS

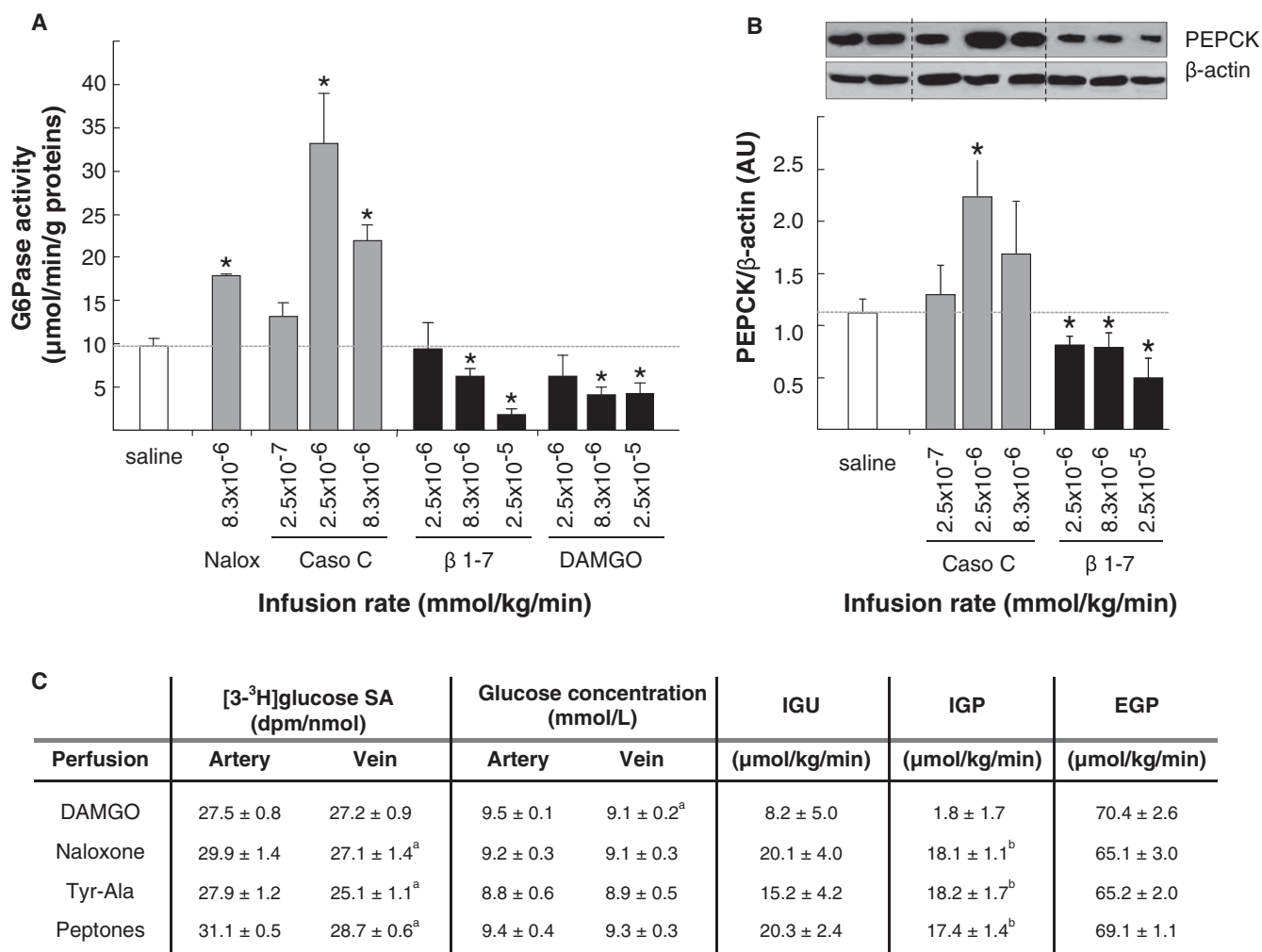
### Portal MORs Regulate Intestinal Gluconeogenesis via a Gut-Brain Neural Circuit

To elucidate the role of the portal neural system in the induction of intestinal gluconeogenesis gene expression by food protein, we initially studied the effect of a PED in rats after periportal treatment by capsaicin, a drug that inactivates afferent nerves. Interestingly, there was no induction of either G6Pase activity or PEPCK-C (phosphoenolpyruvate carboxykinase-cytoplasmic form) protein expression in capsaicin-treated rats fed on a PED, unlike what occurred in sham-operated rats in which strong induction was observed (Figures S1A and S1B, available online). We studied the abundance of neuronal fibers, visualized via the presence of the neuronal marker PGP9.5, around the portal vein walls after capsaicin treatment. In agreement with the observation that portal nerves are mainly composed of afferents (Berthoud, 2004), the number of neuronal fibers was dramatically reduced after administration of the drug (Figure S1C). This confirmed the suppression of the afferents by the drug. Then, to test the putative role of MORs in this induction, we infused MOR-regulators in conscious rats with a catheter implanted in a mesenteric vein, as described previously (Mithieux et al., 2005). Three infusion rates were studied. The intermediate rate approximately matched (on a 1:1 molar basis) the appearance of  $\beta$ 1-7 from a protein-enriched meal representative of the PED used above. It is noteworthy that both  $\beta$ 1-7 and a selective MOR agonist D-Ala2, N3-Me-Phe4, Gly5-ol (DAMGO) significantly suppressed intestinal G6Pase activity after an 8 hr infusion (Figure 1A). On the contrary, both Casoxin C (CasoC), an MOR antagonist stemming from kappa-casein (Chiba et al., 1989) and Nalox markedly enhanced G6Pase activity (Figure 1A).

Comparable results were obtained for the expression of the PEPCK-C protein (Figure 1B). When a metabolic glucose tracer (tritiated on carbon 3) was associated with the Nalox infusion at the end of the experiment, there was a decrease in  $3[^3\text{H}]$  glucose-specific activity in the portal vein compared to that in artery (Figure 1C). This revealed that newly synthesized unlabeled glucose had been released in the blood by the intestine. Intestinal glucose production (IGP) represented 25%–30% of total endogenous glucose production (EGP) after the infusion of Nalox (Figure 1C). IGP was sufficient to counterbalance intestinal glucose uptake (IGU), so no lowering of plasma glucose was observed in the portal vein (Figure 1C). We previously showed that this is sufficient to initiate portal glucose sensing and suppression of food intake (Mithieux et al., 2005; Troy et al., 2008). On the contrary, no such appearance of unlabeled glucose was observed in rats infused with DAMGO (Figure 1C). In this case, there was no decrease in the  $3[^3\text{H}]$  glucose-specific activity and the level of plasma glucose was lower in the portal vein compared to that in the artery (Figure 1C), reflecting glucose utilization by the gut. It must be noted that we did not determine IGP after infusion of saline. Because of the low accuracy of the tracer dilution method (this is a weakness of this approach), the flux of glucose released by the intestine under basal condition is hardly distinguishable from nil (see e.g., Mithieux et al., 2005; Pillot et al., 2009 for discussion of this point). In agreement with what could be expected from the effect of MOR effectors on intestinal gluconeogenesis, rats infused with MOR antagonist (CasoC) in the portal vein exhibited decreased food intake, whereas those infused with MOR agonist ( $\beta$ 1-7) exhibited increased food intake (Figure S1D).

We used three approaches to further determine the role played by portal MORs. Immunohistochemical studies using the neuronal marker PGP9.5 (Figure 2A, in red) revealed the presence of neuronal fibers in the walls of the portal vein both in rats (Figure 2A) and in mice (not shown). In addition, the presence of MOR-1 (green fluorescence) was also detected in close vicinity to the portal vein (Figure 2A). Merging both fluorescence channels (Figure 2A, in yellow) revealed close colocalization of both proteins in certain neuronal structures. Interestingly, we observed comparable colocalization of MOR-1 and PGP9.5 in the portal branches irrigating the portal spaces of the human liver (Figure 2A). Furthermore, the presence of MOR-1 within the portal vein walls was confirmed by western blot (Figure 2B). In contrast, MOR-1 was not detected in the ileum of MOR-KO mice, which confirmed the specificity of the detection (Figure 2B). Then, we studied the effect of  $\beta$ 1-7 and CasoC separately on intestinal gluconeogenesis gene expression in capsaicin-treated rats. There was no effect of either effector on gluconeogenic enzymes in rats with portal denervation (Figure S1E), strongly suggesting that the periportal neural system is crucial for the transmission of the MOR-signal. Lastly, we evaluated the impact of  $\beta$ 1-7 and Nalox on the regions of the brain implicated in the reception of the signals from the portal area. This is linked to the dorsal vagal complex (DVC), which is the main receiver of inputs from the vagus nerve, and to the parabrachial nucleus (PBN), which mainly receives afferents from the spinal cord (for a review see Berthoud, 2004). Using immunohistochemistry, we studied the expression of the immediate-early gene protein





**Figure 1. Effect of Portal Infusion of MOR Effectors on Gut Gluconeogenesis in Rats**

(A and B) The rats (fed on an SED) were infused via the portal vein with saline or MOR effectors at the indicated rates, for 8 hr. (A) G6Pase activity. (B) PEPCK-C protein amount estimated by western blot. The data are expressed as the means ± SEM of six to eight rats per group. \*, different from saline infusion,  $p < 0.05$  (Tukey's post hoc test).

(C) EGP and intestinal glucose fluxes were determined after portal infusions of metabolites ( $8.3 \times 10^{-6}$  mmol/kg/min). The results are the means ± SEM of five rats per group. <sup>a</sup>Different from value in artery,  $p < 0.05$ , Student's two tailed test for paired values. <sup>b</sup>Different from DAMGO,  $p < 0.05$ , one-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test.

See also Figure S1.

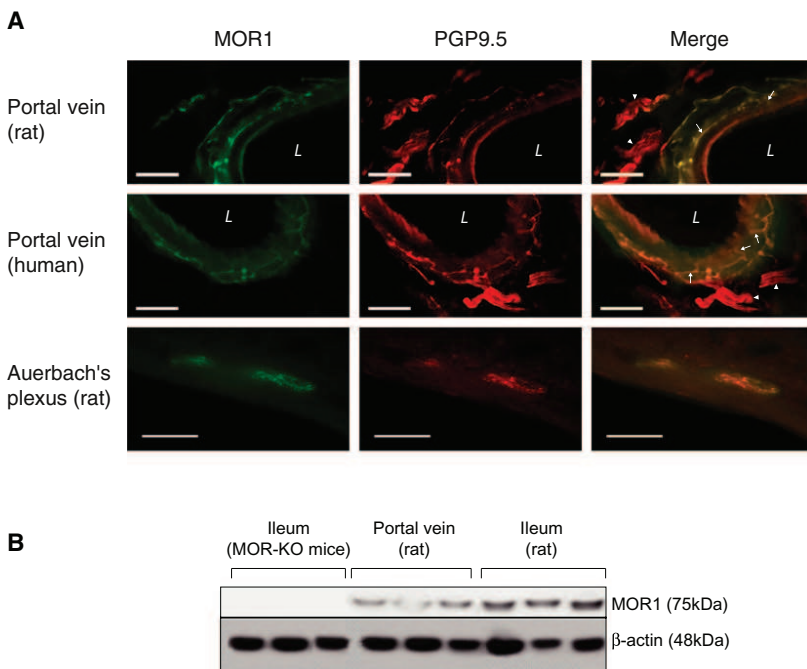
product C-FOS, a well-recognized marker of neuronal activation (Bullitt, 1990; Sagar et al., 1988). The portal infusion of  $\beta 1-7$  did not elicit significant C-FOS activation in any of these regions, compared to saline infusion (Figures 3 and S2). On the contrary, Nalox infusion caused a 2- to -3-fold induction of C-FOS in the DVC, i.e., the area postrema (AP) and the nucleus of the tractus solitarius (NTS), and in the PBN (Figures 3 and S2). Interestingly, no activation took place in any of these nuclei in rats whose portal vein had been treated by capsaicin at the time of surgery for catheter implantation (Figures 3 and S2). A very similar pattern of C-FOS activation (and of denervation effect) took place in the main hypothalamic regions, where neurons are projected from the NTS, notably the paraventricular nucleus (PVN), the lateral hypothalamus (LH) and the arcuate nucleus (ARC)

(Figure S2). In the same manner, C-FOS activation occurred in the periaqueductal gray (PAG), a nucleus receiving inputs from the PBN, following Nalox infusion, whereas activation did not take place in this nucleus in capsaicin-denervated rats (Figure S2). When surgical disruption of the common hepatic branch of vagus was performed instead of capsaicin denervation, C-FOS activation induced by Nalox was cancelled in the NTS and in the downstream PVN but was still present in the PBN and in the PAG (Figure S3).

#### Proteolytic Digests and Oligopeptides Exhibit MOR Antagonist Properties

When rats were previously fed on a PED for 3 days, there was a marked increase in amounts of G6PC and PEPCK-C protein





**Figure 2. Presence of MORs within the Walls of the Portal Veins in Rats and Humans**

(A) MORs (green, left) colocalized with specific neuronal marker ubiquitin carboxy-terminal hydrolase PGP9.5 (red, middle) in the walls of the portal vein of both rats and humans. Right: merged images. The arrows point out the neural fibers innervating the wall of the portal vein. The arrowheads point out nerve bundles in the vicinity of the portal vein. Bottom: MOR was visualized in the Auerbach's plexus (the nervous system innervating the muscular layers of the intestinal wall, which controls motility) as a positive control. White bar: 50  $\mu$ m in portal veins, 25  $\mu$ m in the Auerbach's plexus. The data shown are representative of portal veins from three rats and portal branches from four different human samples.

(B) Western blot analysis of the presence of MOR-1 in the ileum and the portal vein of rats and its absence in the ileum of MOR-KO mice as a control of specificity.

(compare Figure 4 and Figures 1A and 1B). Infusing MOR agonists in the portal vein of PED-fed rats reversed increases of G6PC and PEPCK-C protein. On the contrary, no additional induction effect took place when infusing MOR antagonists (Figure 4). The same pattern was observed with a PED containing a mixture of milk caseins (which might possibly release  $\beta$ 1-7 or CaseC into the blood) (Figure 4), or with a PED from plant proteins (i.e., soy, which did not contain these moieties) (Figure S4). This suggests that MOR antagonists and PED from any origin could induce intestinal gluconeogenesis gene expression via the same mechanistic pathway.

To document the above assumption, we combined several approaches. First, we infused a proteolytic digest (peptones) and selected oligopeptides (di- or tripeptides) separately into the mesenteric-portal vein of rats. The following structures were selected to match the di- or tripeptides with or without a lateral chain (Tyr-Ala and Gly-Gly, respectively) or with an electric charge in the lateral chain (Phe-Pro-Arg). In all cases, a marked induction of G6Pase was observed in both the jejunum (Figure 5A) and the ileum, a gut portion of weaker G6Pase activity in the basal state, but inducible in the case of PED feeding (Mithieux et al., 2005) (Figure 5B). In Figure 5, peptones were from a mixture of caseins. However, peptones from meat protein had the same effect (not shown). In addition, glucose tracer dilution studies revealed that IGP took place after the portal infusion of Tyr-Ala and peptones separately (Figure 1C). Finally, as observed previously for MOR antagonists (Figure S1), no induction of G6Pase by oligopeptides took place in rats with capsaicin denervation of the periportal area (Figure 5). Second, in rats infused with Tyr-Ala, there was a 3-fold increase in C-FOS expression in the DVC (Figures 3B and 3G) and in the hypothalamus, the PBN and the PAG (Figure S2), just like the rats infused with Nalox. Furthermore, no increase in C-FOS took place after

inactivation of portal afferents (Figures 3B, 3H, and S2). Third, we tested whether or not oligopeptides could behave as MOR antagonists in a neuroblastoma cell constitutively expressing MOR (Lorentz et al., 1988; Yang et al., 2000).

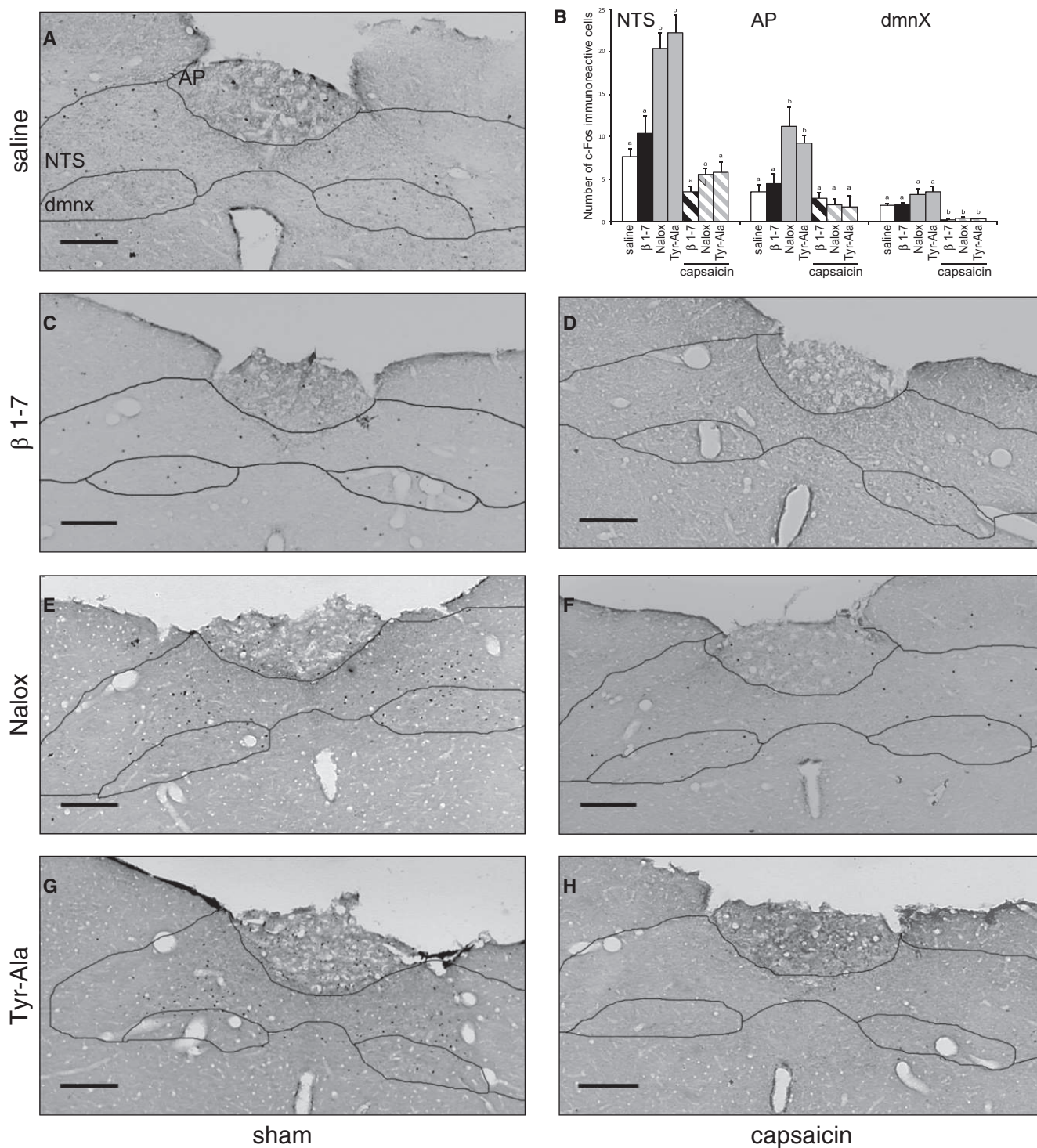
(1) We checked that labeled (tritiated) DAMGO bound to N1E-115 cells and that unlabeled DAMGO competed for binding with a 50% inhibitory concentration ( $IC_{50}$ ) of about  $10^{-7}$ M, thus confirming previous results (Zhang et al., 2006). Then, we showed that Tyr-Ala and Gly-Gly competed for the binding of tritiated DAMGO with  $IC_{50}$  means of  $3 \cdot 10^{-6}$ M and  $9 \cdot 10^{-7}$ M, respectively. Peptones also competed efficiently with tritiated DAMGO (data not shown). (2) We studied the effect of oligopeptides on the coupling of MOR to adenylate cyclase in the same cells. Concomitant with the fact that MOR is coupled via G-protein-inhibiting adenylate cyclase, the agonist DAMGO strongly decreased cell cAMP content (Figure S5). On the contrary, the antagonists CaseC and Nalox dramatically increased cell cAMP content. This is in keeping with a previous observation: an endogenous activity of MOR may exist, constantly depressing the cAMP level even in the absence of an agonist. This endogenous activity may be eliminated on antagonist binding, thus promoting an increase of cAMP (Kotz et al., 2000). It is noteworthy that all oligopeptides increased the cAMP content and could prevent the decrease of DAMGO-induced cAMP in coinubation experiments (Figure S5). This strongly suggests that oligopeptides exhibited MOR antagonist properties.

### MOR-Dependent Induction of Intestinal Gluconeogenesis Is a Causal Link in the Satiety Effects of Food Proteins

To demonstrate the causal role of MORs in the protein-digest-dependent induction of intestinal gluconeogenesis and its role in associated satiety, we performed experiments of portal infusion on mice with deletion of *Mor* (MOR-knockout) and on mice with intestine-specific deletion of G6Pase (*I-G6pc*-knockout, G6PC being the catalytic subunit of G6Pase). There was a slight basal induction of gluconeogenic enzymes in







**Figure 3. Effect of Portal Infusion of MOR Agonists and Antagonists on C-FOS Expression in the Dorsal Vagal Complex of Rats**

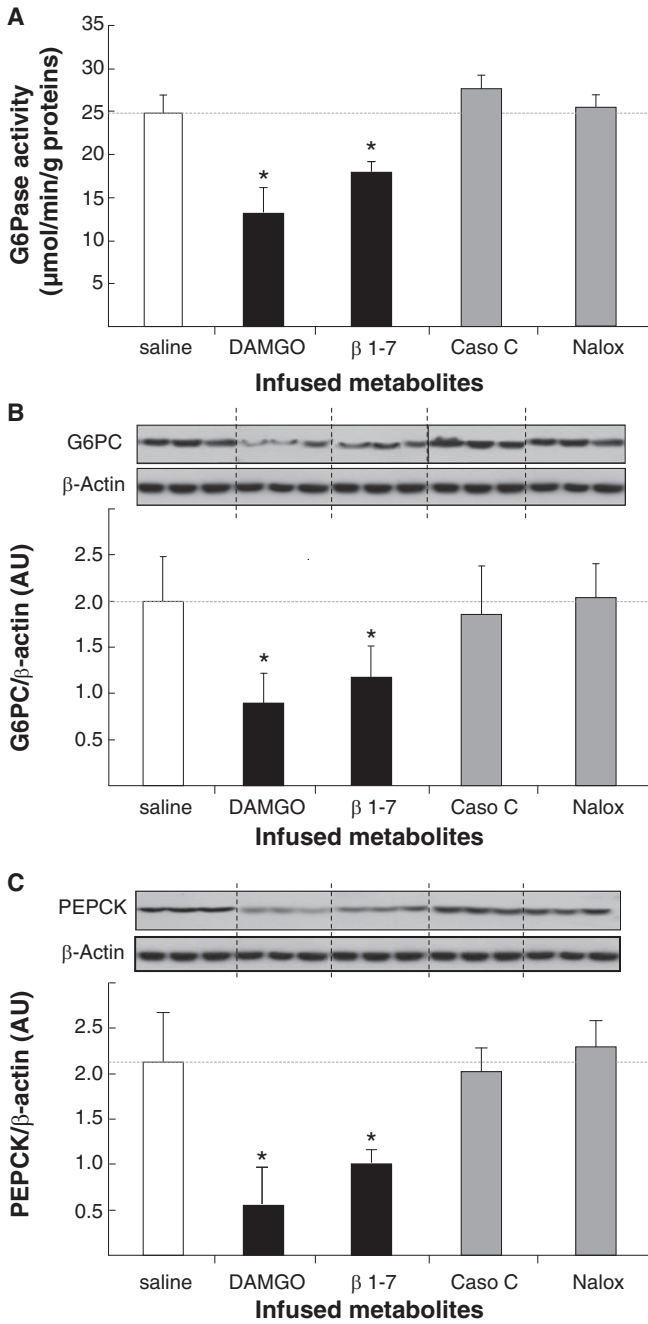
(A, C, E and G) C-FOS immunoreactive cells in the DVC of rats infused via the portal vein with saline only (A), β1-7 (C), Nalox (E), and Tyr-Ala (G) (at a rate of  $8.3 \cdot 10^{-6}$  mmol/kg/min).

(B) Quantification of C-FOS neurons in all areas of the DVC: saline (white bar), β1-7 (black bar), Nalox (gray bar). Open bars: sham-treated rats; dashed bars: capsaicin-treated rats. Data are expressed as means ± SEM (n = 3) of immunoreactive cells per brain hemisphere. The values with different letters differed significantly ( $p < 0.05$ , Kruskal-Wallis nonparametric test, followed by Dunn's post hoc test).

(D, F, and H) Comparable infusions of β1-7 (D), Nalox (F) and Tyr-Ala (H) in rats previously treated by capsaicin around the portal vein.

Scale bar: 200 μm. The following abbreviations are used: AP, area postrema; NTS, nucleus of the solitary tract; dmnx, dorsal motor nucleus of the vagus. See also Figures S2 and S3.





**Figure 4. Effect of Portal Infusions of MOR Effectors on Gut Gluconeogenesis Gene Expression in Rats Fed with PED**

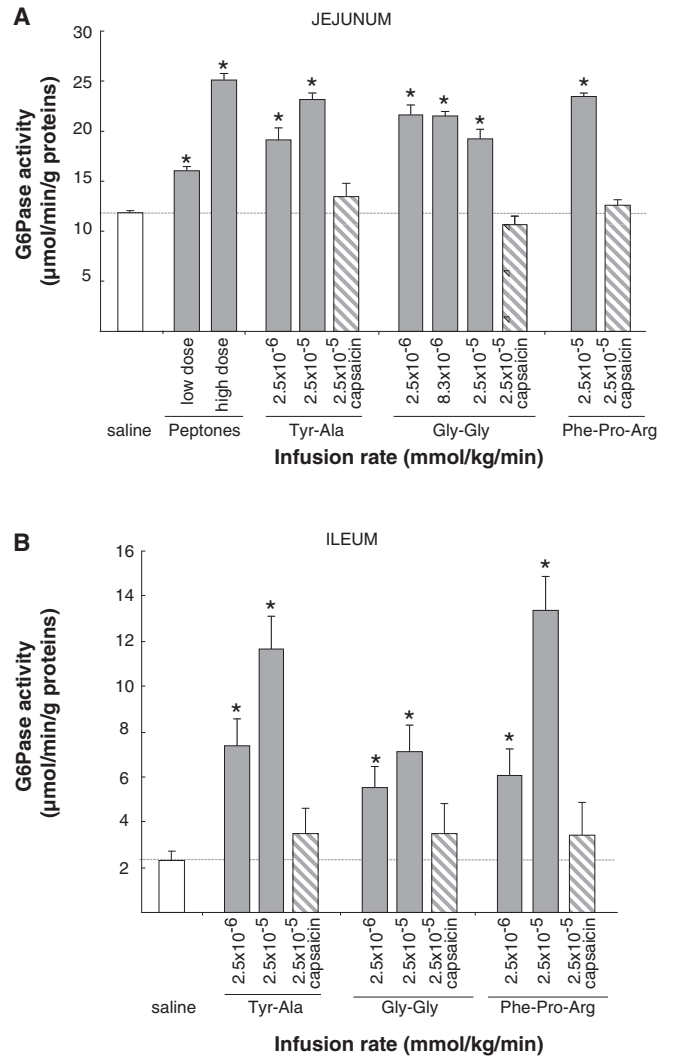
Rats with portal catheters were fed the PED diet for 2 weeks before infusion. Infusion with MOR effectors was performed as in Figure 1.

(A) G6Pase activity.

(B and C) Quantification of G6PC and PEPCK-C proteins by western blotting. The data are expressed as the means ± SEM (n = 5). \*, value significantly different from the saline infusion group, p < 0.05.

See also Figure S4.

MOR-KO mice (Figures S6A and S6B). Again, this is in line with the basal tone of MORs in wild-type (WT) mice (see above), which would not exist in MOR-KO mice. When infused in WT



**Figure 5. Effect of Oligopeptides and Protein Digests on G6Pase Enzyme Expression in the Rat Intestine**

Rats with portal catheters (fed on SED) were infused for 8 hr with the indicated metabolites at the indicated rates. The rate of infusion of peptones was calculated to match the rate of appearance of protein digests derived from the assimilation of an SED (low dose) or PED (high dose). The shaded bars refer to experiments in rats treated locally with capsaicin around the portal vein.

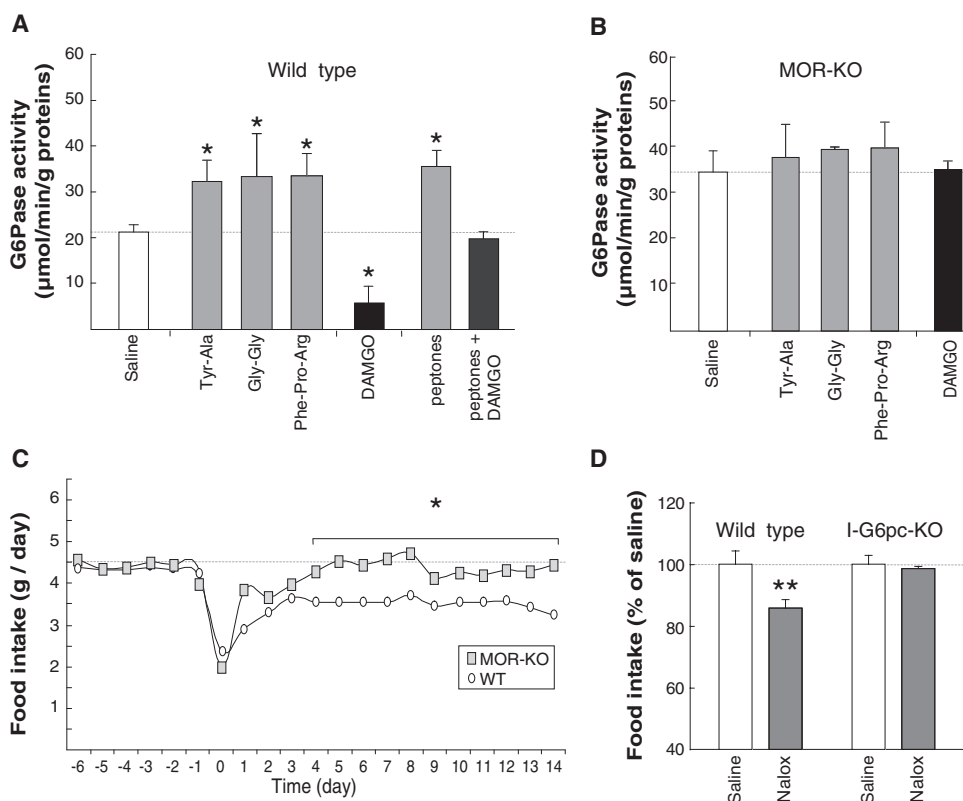
(A) G6Pase activity in jejunum.

(B) Comparable determinations performed in a distal ileum segment. The data are the means ± SEM (n = 6). Statistics are as described in the legend of Figure 1.

See also Figure S5.

mice, di- and tripeptides and peptones induced G6Pase activity in the jejunum (Figure 6A). On the contrary, DAMGO suppressed G6Pase activity, and this was inverted by peptones in coinfusion experiments (Figure 6A). It is noteworthy that none of these effectors induced any effect on gut gluconeogenesis in MOR-KO mice (Figure 6B). Furthermore, we studied food intake in MOR-KO and WT mice after a switch from starch-enriched diet (SED) to PED. Food intake per day for both groups was not different with SED. After a transient drop, a classic response to





**Figure 6. Effect of MOR Modulators and Oligopeptide Fractions on Intestinal G6Pase Enzyme Expression and Features of Food Intake in Wild-Type and MOR-KO or I-G6pc-KO Mice**

(A) G6Pase activity was determined in WT mice (fed on SED) with a portal catheter, which were infused with the indicated metabolites at a rate of  $8.3 \times 10^{-6}$  mmol/kg/min for 8 hr. The expression of the data and statistical analysis are as described in the legend of Figure 1 (n = 6 mice per group).

(B) Comparable experiments performed on MOR-KO mice.

(C) Food intake was monitored each day during the first period of feeding SED to WT (open circles) and MOR-KO (gray squares) mice. At day 0, the mice were switched to PED and food intake was monitored for a further 2 weeks. The data are expressed as the means  $\pm$  SEM of eight mice per group. The error bars are not shown for the sake of graph clarity. All values on day 4 were different between the WT and MOR-KO mice ( $p < 0.05$ , Student's t test for unpaired values).

(D) Saline or Nalox ( $8.3 \times 10^{-6}$  mmol/kg/min) were infused alternatively in WT and I-G6pc-KO mice for 24h. The amount of food ingested was quantified at the end of the infusion. The data are expressed as mean  $\pm$  SEM (WT: n = 6; I-G6pc-KO: n = 6). \*\*, different from saline,  $p < 0.01$  (Student's two tailed test for paired values). See also Figure S6.

changes in food type in rodents, food intake was reduced by about 20% in WT mice fed with a PED. On the contrary, MOR-KO mice resumed their previous food intake (Figure 6C). It is noteworthy that this insensitivity to PED was linked to an absence of modulation of intestinal G6Pase. This highlights a dramatic difference from the induction effect shown in WT mice (Figure S6C). Lastly, we studied the food intake in WT and I-G6pc-KO mice infused with an MOR antagonist via the portal vein. There was a 15% decrease in the amount of food ingested in WT mice infused with Nalox (Figure 6D), i.e., mice exhibiting increased intestinal gluconeogenesis (Figure 6A). In contrast, no effect was observed upon the infusion of Nalox in I-G6pc-KO mice, i.e., in the absence of intestinal gluconeogenesis (Figure 6D). Comparable results were obtained when Tyr-Ala was infused instead of Nalox (13% decrease in the amount of food ingested in WT mice, no diminution in I-G6pc-KO mice). Taken together, these data strongly suggest that MOR-mediated intestinal gluconeogenesis and MOR-mediated modulation of hunger are closely linked phenomena, which

may account for the satiety effect of food protein following their assimilation.

## DISCUSSION

By combining infusions of MOR effectors in the portal vein in conscious rats and experiments of denervation of the portal vein walls, we demonstrate that MORs associated with portal neuronal fibers initiate a gut-brain neural circuit of induction of intestinal gluconeogenesis, a function controlling food intake (Mithieux et al., 2005). An infusion into the gut lumen would better mimic the in vivo appearance of protein digests. However, the flux of native peptide metabolites is difficult to monitor from the gut lumen due to its high protease content. The neural system immediately surrounding the intestinal mucosa is bypassed under the experimental conditions of portal infusion. Therefore, even if infused metabolites are sensed in the portal area under the experimental conditions studied here, it cannot be excluded that MOR-dependent sensing may also, under



physiological conditions, take place upstream in the neural system surrounding the gut mucosa or in the gut muscular layer (Hedner and Cassuto, 1987; Sternini, 2001).

Neural afferents traveling along the ventral trunk of the vagus nerve are likely to be involved in the transmission of the MOR signal to the brain. In support of this view, the activation of both the NTS and hypothalamus induced by MOR antagonists (revealed by C-FOS expression) is suppressed either by capsaicin treatment or by surgical vagotomy. However, the signals conveyed via the spinal cord, i.e., spino-mesencephalic route (PBN and PAG), are likely to be involved as well. In agreement with this assumption, both the PBN and the PAG, which connect afferents from the spinal cord, are activated via portal MOR antagonists. Moreover, the activation in these nuclei is suppressed via perioral treatment by capsaicin (a treatment that ablates the afferents of either route) and not by surgical vagotomy (a treatment that preserves the spinal afferents). Interestingly, the NTS, hypothalamus, and spino-mesencephalic pathways are all known to be involved in the control of energy homeostasis (see Berthoud, 2004 for a review).

It is established that proteins are partially digested within the gut lumen to oligopeptide moieties mainly composed of di- or tripeptides (Daniel, 2004). These oligopeptides are then transported within enterocytes by means of a specific transporter (PepT1) of the luminal membrane (Boll et al., 1994; Nielsen and Brodin, 2003). A fraction undergoes further proteolysis to amino acids to feed the intestinal amino acid pool. Another fraction is released into the portal blood, together with amino acids, via specific oligopeptide and amino acid transporters located at the basolateral membrane (Lee, 2000). A number of proteins have been shown to release proteolytic digests with  $\mu$ -opioid activity (see above). However, the assumption that any food protein could induce intestinal gluconeogenesis via a MOR-dependent pathway implied that the proteolytic digests or peptides of any protein origin could exhibit MOR antagonist activity. This inference is strongly supported by the observation herein that peptides, either alone or in mixture (peptones), behave as MOR antagonists both in vivo to induce gut gluconeogenesis and in vitro in experiments of coupling to adenylate cyclase. The absence of these regulations in MOR-KO mice and their insensitivity to PED feeding, along with the incapacity of MOR antagonists to modulate food intake in mice with ablated intestinal gluconeogenesis, together confirm a causal link between MOR antagonism by oligopeptides and the satiety effect induced by food protein.

These findings may appear difficult to reconcile with the literature reporting that oligopeptides and food protein digests could behave as either MOR agonists or MOR antagonists (Capasso et al., 1997; Moritoki et al., 1984; Schiller et al., 2002; Shiomi et al., 1981; Zioudrou et al., 1979). However, following ligand-receptor interaction, various MOR-initiated cellular processes occur, such as receptor internalization, intracellular sorting and recycling (Böhm et al., 1997; Sternini et al., 2000). This results in complex adaptations including receptor downregulation, desensitization, and resensitization, depending on the concentration of the ligand and on the time of exposure. These cumulative phenomena make the resulting downstream effects of MOR-modulators (i.e., agonist-like or antagonist-like) almost

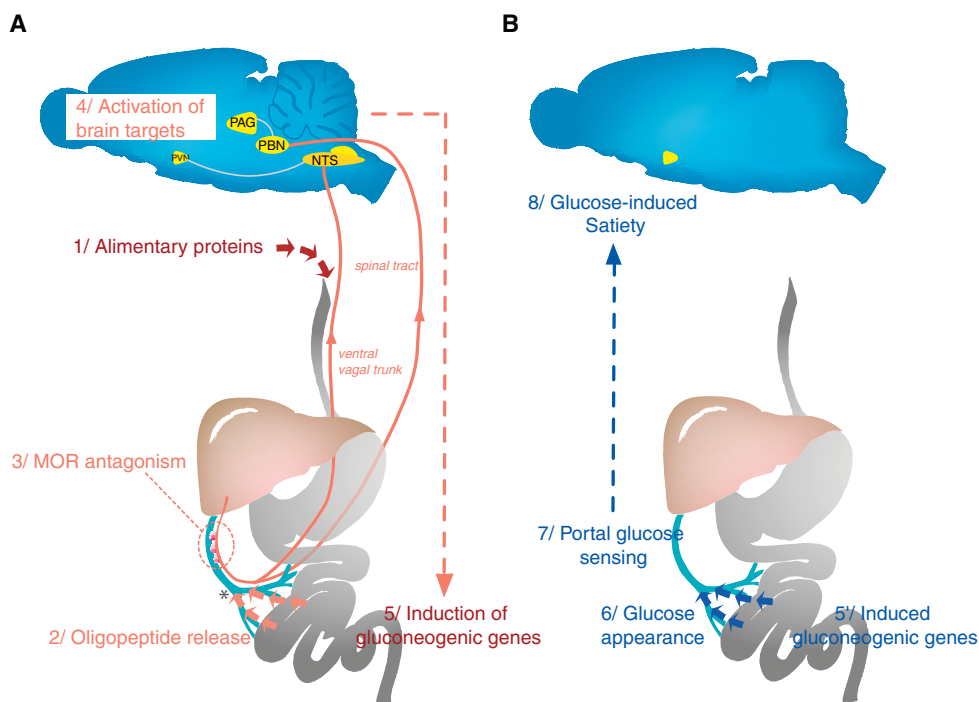
unpredictable (for a review see Taylor and Fleming, 2001). Altogether, this probably accounts for some of the inconsistent results published in the field and may also explain, at least partially, why the different metabolites studied herein did not always elicit clear dose-dependent effects (see e.g., Figure 1 or Figure 5). In addition, the *Mor* gene family is highly complex and includes multiple splice variants and various promoters, depending on its expression site (Pan, 2005). These splice variants may be functionally distinct, regarding their regulation by various agonists or antagonists, or depending on their location (Pan, 2005; Pasternak et al., 2004). Therefore it is possible that the general antagonist behavior of peptides and protein hydrolysates revealed here is a specific feature of MORs expressed in the mesenteric-portal system.

Another intriguing question relates to the complexity of the sequence of events, which allows the alimentary protein to exert their satiety end-point action. Indeed, a number of known factors, e.g., intestinal hormones, arise from the gut driven by the meal and are assumed to affect food intake by binding their receptors directly in the hypothalamus. These are rapidly acting mechanisms. In the case of food proteins, a series of events initiates the gluconeogenesis gene program in the intestine, via a reflex arc with the brain. This is progressive and takes place over the postprandial period (Figure 7). After that, the glucose released may initiate its central action via portal-sensing driven mechanisms (Mithieux et al., 2005). This is a lasting phenomenon because it depends on gene induction and thus may endure after food assimilation. This is in line with the fact that protein feeding decreases hunger some time from the preceding meal, which is the definition of the phenomenon called “satiety” (Booth et al., 1970; Rolls et al., 1988). This might explain why protein feeding decreases food intake in the long term, i.e., for several days or weeks (Jean et al., 2001; Mithieux et al., 2005; Penhoat et al., 2011). Hence, advantages exist in terms of reduction of body weight and adipose tissue mass (Jean et al., 2001, Mithieux et al., 2005). On the contrary, rodents treated before meals with the satiation hormone CCK, which is involved in the meal termination, do not reduce their global food intake. Indeed, they compensate the CCK-initiated decrease of meal size by increasing the number of meals per day (West et al., 1984). To evaluate the long-term potential effect of MOR modulators, lasting portal infusion experiments would have been of interest. It is likely that benefits on the adipose tissue mass and body weight would be similar to those observed with protein feeding. Unfortunately, technical problems (portal catheters blocked or pulled out) are very frequent after a few days, making such experiments infeasible.

In conclusion, we report that MORs expressed in the mesenteric-portal area control a gut-brain neural circuit of regulation of intestinal gluconeogenesis. The latter controls food intake (Mithieux et al., 2005; Penhoat et al., 2011, Troy et al., 2008). The regulatory role of MORs in the control of food intake has been largely documented for the central nervous system, related to their roles in the so-called “reward” system (Glass et al., 1999; Shin et al., 2010). Here, we report that MORs play a role in mediating the satiety effects of alimentary proteins, acting within a neural gut-brain circuit (Figure 7). Remarkably, various  $\mu$ -opioid antagonists given orally decrease hunger in humans (Yeomans







**Figure 7. Sequence of MOR-Dependent Induction of Satiety by Food Protein**

(A) During the postprandial period, the oligopeptides resulting from proteolysis of alimentary proteins are released in the portal blood and antagonize MORs expressed in the periportal neural system. The ascending nerves controlled by MORs, traveling via both the vagus nerve and the spinal cord, convey the information to their respective brain targets, driving the induction of intestinal gluconeogenesis gene expression. \*, refers to the site of appearance of the metabolites infused in this study.

(B) During the postabsorptive period, glucose released in the portal blood is sensed by the portal glucose sensors and exerts its satiety effects (Mithieux et al., 2005).

and Gray, 2002), despite the fact that they do not reach the brain due to extensive first-pass hepatic metabolism (Reimer et al., 2009). Gastric bypass, an increasingly popular surgical operation treating morbid obesity, promotes a dramatic reduction of hunger sensation in a few days. This is true in obese mice (Troy et al., 2008) and in obese humans (for a review see Thaler and Cummings, 2009). Although intestinal gluconeogenesis was revealed to be involved in the decreased food intake after gastric bypass in mice (Troy et al., 2008), a net portal release of glucose under postabsorptive conditions has been observed several days after gastric bypass in nondiabetic obese patients (Hayes et al., 2011). This suggests that intestinal gluconeogenesis could be sufficient to compensate and even surpass gut glucose utilization. As MOR-positive neural fibers are present in the wall of the human portal vein branches (Figure 2A), the mechanisms uncovered here may also take place in humans. This knowledge may thus pave the way for future approaches in the treatment and/or prevention of metabolic diseases.

## EXPERIMENTAL PROCEDURES

### Animals and Tissue Sampling

Adult male Sprague-Dawley rats (Charles River), aged 6 to 8 weeks and weighing 260–280 g at the time of their arrival, were housed in a climate-controlled room ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ) subjected to a 12 hr light/dark cycle with lights on at 7:00 AM and lights off at 7:00 PM, with free access to water and an SED

diet. Mice were housed under similar conditions. A colony of MOR-KO mice (Jackson Laboratories) was generated in our facilities from two couples of mice. I-G6pc-KO mice were described previously (Penhoat et al., 2011). The experiments were performed 5 weeks after gene deletion. PED composition was based on SED (SAFE A04, France), with a modification of starch-glucose: protein ratio from 50:23 to 23:50 (weight basis). Proteins were an equimolar ratio of soy proteins and casein. However, soy proteins were used for only a few experiments. The intestine was sampled as described previously (Mithieux et al., 2004a). Enzyme expression analyses were performed in proximal jejunum in all but a few experiments (Figure 5B). Glc6Pase activity was assayed under conditions of maximal velocity. All procedures were described in detail previously (Mithieux et al., 2004a; Rajas et al., 1999).

### Studies in Conscious Animals

Animals were anesthetized with 2% isoflurane. A catheter was implanted in the inferior left mesenteric vein after laparotomy and secured with biological glue. A passage under the skin up to the neck was done to recover the other end of the catheter, which was secured with a Dacron mesh button tether (Harvard apparatus). The procedure to implant a portal catheter (PE10, Fine-Bore Polyethylene Tubing, Smiths Medical) in WT and I-G6pc-KO mice was comparable. In rats intended for portal vein denervation, a gauze compress moistened with 80  $\mu\text{l}$  of a capsaicin solution (10 mg/ml) dissolved in water, ethanol, and Tween at a ratio of 8:1:1 was applied around the portal vein for 15 min. Regarding vagotomy studies, the left and caudal lobes of the liver were gently deflected, and the hepatic branch of the vagus, along with the fascia surrounding the nerve, was sectioned with fine scissors. Animals were allowed to recover from the surgery for 1 week, with free access to SED and water. A marbocyl/ketofen solution was infused each day, in order to prevent coagulation, infection, and pain.



Portal infusions (at a rate of 125  $\mu\text{l/hr}$  for rats and 15  $\mu\text{l/hr}$  for mice) were carried out for 8 hr, starting at 9 A.M., in animals with free access to food and water. Saline was infused as a control vehicle. The following metabolites were infused: [D-Ala<sub>2</sub>, N<sub>3</sub>-Me-Phe<sub>4</sub>, Gly<sub>5</sub>-ol]-enkephalin (DAMGO), human  $\beta$ 1-7, Nalox, peptones from meat protein (Sigma-Aldrich), CasoC (kindly provided by Damien Ficheux, IBCP, Lyon, France), dipeptides H-Tyr-Ala-OH and H-Gly-Gly-OH, and tri-peptide H-Phe-Pro-Arg-OH (Bachem). Following the infusions, the animals were anesthetized with sodium pentobarbital for tissue sampling.

To study food intake in WT and MOR-KO mice (Figure 6C), basal consumption was determined for 5 days before switching to PED. Then, we measured food intake every day for 15 days. To study the effect of Tyr-Ala in WT and I-G6pc-KO mice (Figure 6E), portal infusions were carried out for 24 hr and the amount of food ingested quantified at the end. Each mouse was studied alternatively for saline or Nalox infusion, including 1 day without experiment between infusions.

#### Determination of Intestinal Glucose Fluxes

After an 8 hr infusion of metabolites, as described above (but with no food for the last 6 hr), rats were anesthetized and fitted with polyethylene catheters inserted into the right jugular vein for  $3[^3\text{H}]\text{glucose}$  infusion and into the left carotid artery for blood sampling, as described previously (Croset et al., 2001; Mithieux et al., 2005; Rajas et al., 1999). At the end of the additional infusion time (for 90 min), blood was sampled from the carotid artery and the portal vein. Blood plasma was separated and deproteinized and used to determine glucose concentration and specific activity (SA). All calculations were done by using the formulas described in detail by Croset et al. (2001).

#### Microscopy Studies

Animals were deeply anesthetized with intraperitoneal injection of sodium pentobarbital, and transcardially perfused with 0.9% NaCl followed by ice-cold phosphate-buffered (pH 7.4) paraformaldehyde (PFA). Tissues were postfixed in PFA for 2–3 hr and cryoprotected in 30% sucrose in phosphate-buffered saline (PBS) with thimerosal (0.01% v/v). Before freezing, the samples were embedded in Tissue-Tek (Sakuro Finetek), and vessels and portions of the intestine were injected with the same substance. Human portal branches were sampled from healthy portions of hepatectomized livers and immediately postfixed by immersion in PFA as described above. Serial 20  $\mu\text{m}$  thick sections were cut on a freezing cryostat.

#### Immunofluorescence

Sections were preincubated in PBS with 0.3% Triton X-100 (PBST) containing 5% bovine serum albumin (blocking solution) for 2 hr and further incubated with the primary antibody in the blocking solution overnight at room temperature. After several rinses in PBST, sections were incubated in the secondary antibody for 2 hr at room temperature. For double labeling, the protocol was repeated with the other antibodies after three 15 min washes in PBST. Staining was absent in the control experiment with omission of primary antibodies. Furthermore, we checked that no cross-reactivity between antibodies occurred, as assessed by inverting the order of staining and omitting the second primary antibody (data not shown). Images were generated by using a fluorescence microscope (Carl Zeiss Axiovert 200M).

See also Table S1.

#### C-FOS Labeling

Prior to any incubation, endogenous tissue peroxidase activities were quenched with 1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in PBS for 30 min. The procedure was then the same as described before for primary and secondary antibody incubations. Following PBS washes, the ABC Elite reagent (Vector Laboratories) was applied for 45 min. The sections were then incubated in 3,3'-diaminobenzidine (DAB), in conjunction with 5 mg/ml nickel and ammonium sulfate (Sigma-Aldrich) for 15 to 30 min at a concentration of 0.5 mg/ml in PBS with 0.03% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Sections were thoroughly washed, air-dried, dehydrated, and coverslipped. For the quantitative assessment of C-FOS expression in the brain, four to six sections were chosen in areas in the hypothalamus, PBN, and PAG, as well as in the brain stem, according to Paxinos and Watson (1998). Images were generated with a light microscope (Nikon Eclipse E400) and FOS-positive

nuclei were counted by using a calibrated macro as described before (Zheng et al., 2002) with ImageJ software (U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://imagej.nih.gov/ij/>). All data are expressed as FOS-positive neurons per hemisphere of the brain.

See also Table S1.

#### Statistical Analyses

Data are expressed as means  $\pm$  SEM. One-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test was used for multiple parametric comparisons. Student's two-tailed paired t test was used for paired comparisons. The nonparametric Kruskal-Wallis test followed by Dunn's post hoc test was used for C-FOS positive neuron counting. Statistical significance was set at  $p \leq 0.05$ .

#### SUPPLEMENTAL INFORMATION

Supplemental Information includes Extended Experimental Procedures, six figures, and one table and can be found with this article online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2012.05.039>.

#### ACKNOWLEDGMENTS

All protocols used in this work were performed according to the recommendations of our local animal ethics committee for animal experimentation, which gave its authorization. The staff members of the animal facility of the University Claude Bernard-Lyon 1 (ALECS) are acknowledged for precious help in housing rats and mice, including Aude Barataud for helpful discussions on the pharmacology of MOR. The authors thank INSERM for funding their work and the Centre National de la Recherche Scientifique (A.S., G.M., F.R.), the Institut National de la Recherche Agronomique (A.G.-S.), the Université Lyon 1 (D.C.) and INSERM (A.P) for funding their positions. The authors also wish to thank the Ministère de la Recherche et de l'Enseignement Supérieur (C.D., D.G.) the Ecole Normale Supérieure de Lyon (B.B., F.D.V.), the Ecole Nationale du Génie Rural des Eaux et Forêts (F.D.) for funding their positions as postgraduate or Ph.D students. A.D. was hired thanks to grants from the Agence Nationale de la Recherche (ANR1.14 [NutriSens project] and ANR-07-PNRA-015 [SensoFat project]). The authors declare that there are no conflicts of interest in relation to this work.

Received: July 6, 2011

Revised: March 2, 2012

Accepted: May 9, 2012

Published online: July 5, 2012

#### REFERENCES

- Berthoud, H.R. (2004). Anatomy and function of sensory hepatic nerves. *Anat. Rec. A Discov. Mol. Cell. Evol. Biol.* 280, 827–835.
- Böhm, S.K., Grady, E.F., and Bunnett, N.W. (1997). Regulatory mechanisms that modulate signalling by G-protein-coupled receptors. *Biochem. J.* 322, 1–18.
- Boll, M., Markovich, D., Weber, W.M., Korte, H., Daniel, H., and Murer, H. (1994). Expression cloning of a cDNA from rabbit small intestine related to proton-coupled transport of peptides, beta-lactam antibiotics and ACE-inhibitors. *Pflugers Arch.* 429, 146–149.
- Booth, D.A., Chase, A., and Campbell, A.T. (1970). Relative effectiveness of protein in the late stages of appetite suppression in man. *Physiol. Behav.* 5, 1299–1302.
- Bullitt, E. (1990). Expression of c-fos-like protein as a marker for neuronal activity following noxious stimulation in the rat. *J. Comp. Neurol.* 296, 517–530.
- Capasso, A., Amodeo, P., Balboni, G., Guerrini, R., Lazarus, L.H., Temussi, P.A., and Salvadori, S. (1997). Design of  $\mu$  selective opioid dipeptide antagonists. *FEBS Lett.* 417, 141–144.
- Chiba, H., Tani, F., and Yoshikawa, M. (1989). Opioid antagonist peptides derived from kappa-casein. *J. Dairy Res.* 56, 363–366.



- Croset, M., Rajas, F., Zitoun, C., Hurot, J.M., Montano, S., and Mithieux, G. (2001). Rat small intestine is an insulin-sensitive gluconeogenic organ. *Diabetes* 50, 740–746.
- Daniel, H. (2004). Molecular and integrative physiology of intestinal peptide transport. *Annu. Rev. Physiol.* 66, 361–384.
- Ding, Y.Q., Kaneko, T., Nomura, S., and Mizuno, N. (1996). Immunohistochemical localization of mu-opioid receptors in the central nervous system of the rat. *J. Comp. Neurol.* 367, 375–402.
- George, S.R., Zastawny, R.L., Briones-Urbina, R., Cheng, R., Nguyen, T., Heiber, M., Kouvelas, A., Chan, A.S., and O'Dowd, B.F. (1994). Distinct distributions of mu, delta and kappa opioid receptor mRNA in rat brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 205, 1438–1444.
- Gibbs, J., Falasco, J.D., and McHugh, P.R. (1976). Cholecystokinin-decreased food intake in rhesus monkeys. *Am. J. Physiol.* 230, 15–18.
- Glass, M.J., Billington, C.J., and Levine, A.S. (1999). Opioids and food intake: distributed functional neural pathways? *Neuropeptides* 33, 360–368.
- Greenwood-Van Meerveld, B., Gardner, C.J., Little, P.J., Hicks, G.A., and Dehaven-Hudkins, D.L. (2004). Preclinical studies of opioids and opioid antagonists on gastrointestinal function. *Neurogastroenterol. Motil.* 16 (Suppl 2), 46–53.
- Hayes, M.T., Foo, J., Besic, V., Tychinskaya, Y., and Stubbs, R.S. (2011). Is intestinal gluconeogenesis a key factor in the early changes in glucose homeostasis following gastric bypass? *Obes. Surg.* 21, 759–762.
- Hedner, T., and Cassuto, J. (1987). Opioids and opioid receptors in peripheral tissues. *Scand. J. Gastroenterol. Suppl.* 130, 27–46.
- Holzer, P. (2009). Opioid receptors in the gastrointestinal tract. *Regul. Pept.* 155, 11–17.
- Jean, C., Rome, S., Mathé, V., Huneau, J.F., Aattouri, N., Fromentin, G., Achagiotis, C.L., and Tomé, D. (2001). Metabolic evidence for adaptation to a high protein diet in rats. *J. Nutr.* 131, 91–98.
- Kotz, C.M., Glass, M.J., Levine, A.S., and Billington, C.J. (2000). Regional effect of naltrexone in the nucleus of the solitary tract in blockade of NPY-induced feeding. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 278, R499–R503.
- Kreil, G., Umbach, M., Brantl, V., and Teschemacher, H. (1983). Studies on the enzymatic degradation of beta-casomorphins. *Life Sci.* 33 (Suppl 1), 137–140.
- Lee, V.H. (2000). Membrane transporters. *Eur. J. Pharm. Sci.* 11 (Suppl 2), S41–S50.
- Lorentz, M., Hedlund, B., and Arhem, P. (1988). Morphine activates calcium channels in cloned mouse neuroblastoma cell lines. *Brain Res.* 445, 157–159.
- Meisel, H., and FitzGerald, R.J. (2000). Opioid peptides encrypted in intact milk protein sequences. *Br. J. Nutr.* 84 (Suppl 1), S27–S31.
- Mithieux, G. (2009). A novel function of intestinal gluconeogenesis: central signaling in glucose and energy homeostasis. *Nutrition* 25, 881–884.
- Mithieux, G., Bady, I., Gautier, A., Croset, M., Rajas, F., and Zitoun, C. (2004a). Induction of control genes in intestinal gluconeogenesis is sequential during fasting and maximal in diabetes. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 286, E370–E375.
- Mithieux, G., Misery, P., Magnan, C., Pillot, B., Gautier-Stein, A., Bernard, C., Rajas, F., and Zitoun, C. (2005). Portal sensing of intestinal gluconeogenesis is a mechanistic link in the diminution of food intake induced by diet protein. *Cell Metab.* 2, 321–329.
- Mithieux, G., Rajas, F., and Gautier-Stein, A. (2004b). A novel role for glucose 6-phosphatase in the small intestine in the control of glucose homeostasis. *J. Biol. Chem.* 279, 44231–44234.
- Moran, T.H. (2000). Cholecystokinin and satiety: current perspectives. *Nutrition* 16, 858–865.
- Moritoki, H., Takei, M., Kotani, M., Kiso, Y., Ishida, Y., and Endoh, K. (1984). Tripeptides acting on opioid receptors in rat colon. *Eur. J. Pharmacol.* 100, 29–39.
- Morley, J.E., Levine, A.S., Yim, G.K., and Lowy, M.T. (1983). Opioid modulation of appetite. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 7, 281–305.
- Nielsen, C.U., and Brodin, B. (2003). Di/tri-peptide transporters as drug delivery targets: regulation of transport under physiological and pathophysiological conditions. *Curr. Drug Targets* 4, 373–388.
- Pan, Y.X. (2005). Diversity and complexity of the mu opioid receptor gene: alternative pre-mRNA splicing and promoters. *DNA Cell Biol.* 24, 736–750.
- Pasternak, D.A., Pan, L., Xu, J., Yu, R., Xu, M.M., Pasternak, G.W., and Pan, Y.X. (2004). Identification of three new alternatively spliced variants of the rat mu opioid receptor gene: dissociation of affinity and efficacy. *J. Neurochem.* 91, 881–890.
- Paxinos, G., and Watson, C. (1998). *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, Fourth Edition (New York: Academic Press).
- Penhoat, A., Mutel, E., Amigo-Correig, M., Pillot, B., Stefanutti, A., Rajas, F., and Mithieux, G. (2011). Protein-induced satiety is abolished in the absence of intestinal gluconeogenesis. *Physiol. Behav.* 105, 89–93.
- Pillot, B., Soty, M., Gautier-Stein, A., Zitoun, C., and Mithieux, G. (2009). Protein feeding promotes redistribution of endogenous glucose production to the kidney and potentiates its suppression by insulin. *Endocrinology* 150, 616–624.
- Rajas, F., Bruni, N., Montano, S., Zitoun, C., and Mithieux, G. (1999). The glucose-6 phosphatase gene is expressed in human and rat small intestine: regulation of expression in fasted and diabetic rats. *Gastroenterology* 117, 132–139.
- Rajas, F., Croset, M., Zitoun, C., Montano, S., and Mithieux, G. (2000). Induction of PEPCK gene expression in insulinopenia in rat small intestine. *Diabetes* 49, 1165–1168.
- Reimer, K., Hopp, M., Zenz, M., Maier, C., Holzer, P., Mikus, G., Bosse, B., Smith, K., Buschmann-Kramm, C., and Leyendecker, P. (2009). Meeting the challenges of opioid-induced constipation in chronic pain management - a novel approach. *Pharmacology* 83, 10–17.
- Rolls, B.J., Hetherington, M., and Burley, V.J. (1988). The specificity of satiety: the influence of foods of different macronutrient content on the development of satiety. *Physiol. Behav.* 43, 145–153.
- Sagar, S.M., Sharp, F.R., and Curran, T. (1988). Expression of c-fos protein in brain: metabolic mapping at the cellular level. *Science* 240, 1328–1331.
- Schiller, P., Weltrowska, G., Nguyen, T., Wilkes, B., Lemieux, C., and Chung, N. (2002). Opioid dipeptide derivatives with a mixed  $\mu$  antagonist/ $\delta$  antagonist, partial  $\mu$  agonist/ $\delta$  antagonist or  $\mu$  agonist/partial  $\delta$  agonist profile. *American Peptide Symposia* 6, 229–270.
- Shin, A.C., Pistell, P.J., Phifer, C.B., and Berthoud, H.R. (2010). Reversible suppression of food reward behavior by chronic mu-opioid receptor antagonism in the nucleus accumbens. *Neuroscience* 170, 580–588.
- Shiomi, H., Ueda, H., and Takagi, H. (1981). Isolation and identification of an analgesic opioid dipeptide kyotorphin (Tyr-Arg) from bovine brain. *Neuropharmacology* 20, 633–638.
- Sternini, C. (2001). Receptors and transmission in the brain-gut axis: potential for novel therapies. III. Mu-opioid receptors in the enteric nervous system. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 281, G8–G15.
- Sternini, C., Brecha, N.C., Minnis, J., D'Agostino, G., Balestra, B., Fiori, E., and Tonini, M. (2000). Role of agonist-dependent receptor internalization in the regulation of mu opioid receptors. *Neuroscience* 98, 233–241.
- Sternini, C., Patierno, S., Selmer, I.S., and Kirchgessner, A. (2004). The opioid system in the gastrointestinal tract. *Neurogastroenterol. Motil.* 16 (Suppl 2), 3–16.
- Taylor, D.A., and Fleming, W.W. (2001). Unifying perspectives of the mechanisms underlying the development of tolerance and physical dependence to opioids. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 297, 11–18.
- Teschemacher, H., Umbach, M., Hamel, U., Praetorius, K., Ahnert-Hilger, G., Brantl, V., Lottspeich, F., and Henschen, A. (1986). No evidence for the presence of beta-casomorphins in human plasma after ingestion of cows' milk or milk products. *J. Dairy Res.* 53, 135–138.
- Thaler, J.P., and Cummings, D.E. (2009). Minireview: Hormonal and metabolic mechanisms of diabetes remission after gastrointestinal surgery. *Endocrinology* 150, 2518–2525.



- Troy, S., Soty, M., Ribeiro, L., Laval, L., Migrenne, S., Fioramonti, X., Pillot, B., Fauveau, V., Aubert, R., Viollet, B., et al. (2008). Intestinal gluconeogenesis is a key factor for early metabolic changes after gastric bypass but not after gastric lap-band in mice. *Cell Metab.* 8, 201–211.
- Turton, M.D., O'Shea, D., Gunn, I., Beak, S.A., Edwards, C.M., Meeran, K., Choi, S.J., Taylor, G.M., Heath, M.M., Lambert, P.D., et al. (1996). A role for glucagon-like peptide-1 in the central regulation of feeding. *Nature* 379, 69–72.
- Vahl, T.P., Tauchi, M., Durler, T.S., Elfers, E.E., Fernandes, T.M., Bitner, R.D., Ellis, K.S., Woods, S.C., Seeley, R.J., Herman, J.P., and D'Alessio, D.A. (2007). Glucagon-like peptide-1 (GLP-1) receptors expressed on nerve terminals in the portal vein mediate the effects of endogenous GLP-1 on glucose tolerance in rats. *Endocrinology* 148, 4965–4973.
- West, D.B., Fey, D., and Woods, S.C. (1984). Cholecystokinin persistently suppresses meal size but not food intake in free-feeding rats. *Am. J. Physiol.* 246, R776–R787.
- Will, M.J., Franzblau, E.B., and Kelley, A.E. (2003). Nucleus accumbens mu-opioids regulate intake of a high-fat diet via activation of a distributed brain network. *J. Neurosci.* 23, 2882–2888.
- Yang, J.C., Shan, J., Ng, K.F., and Pang, P. (2000). Morphine and methadone have different effects on calcium channel currents in neuroblastoma cells. *Brain Res.* 870, 199–203.
- Yeomans, M.R., and Gray, R.W. (2002). Opioid peptides and the control of human ingestive behaviour. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 26, 713–728.
- Zhang, J., Frassetto, A., Huang, R.R., Lao, J.Z., Pasternak, A., Wang, S.P., Metzger, J.M., Strack, A.M., Fong, T.M., and Chen, R.Z. (2006). The mu-opioid receptor subtype is required for the anorectic effect of an opioid receptor antagonist. *Eur. J. Pharmacol.* 545, 147–152.
- Zheng, H., Corkern, M.M., Crousillac, S.M., Patterson, L.M., Phifer, C.B., and Berthoud, H.R. (2002). Neurochemical phenotype of hypothalamic neurons showing Fos expression 23 h after intracranial AgRP. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 282, R1773–R1781.
- Zioudrou, C., Streaty, R.A., and Klee, W.A. (1979). Opioid peptides derived from food proteins. The exorphins. *J. Biol. Chem.* 254, 2446–2449.





## EXTENDED EXPERIMENTAL PROCEDURES

### Binding Studies to MORs in N1E115 Cells

The N1E115 cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) containing 4.5 g/l glucose, 11 g/l sodium pyruvate, supplemented with 15% fetal calf serum (FCS), 2 mM glutamine, penicillin (100 U/ml) and streptomycin (0.1 mg/ml), in a humidified incubator at 37°C and 5% CO<sub>2</sub> in air. All culture products were purchased from Life Technologies SAS (Villebon sur Yvette, France). The cells were seeded onto 12-well dishes at a high density (50,000–65,000 cells/cm<sup>2</sup>) and plated for 48 hr.

[Tyrosyl-3-5-<sup>3</sup>H(N)]-DAMGO (SA: 1.976 TBq/mmol (Perkin Elmer SAS, Courtaboeuf, France) was used to assess peptide binding affinity. After 48 hr plating of N1E115 cells, the medium was removed and the cells were incubated for 1 hr at 37°C with 10 nM [<sup>3</sup>H]-DAMGO, as previously described (Zhang et al., 2006), and increasing concentrations of either unlabeled DAMGO or peptides in DMEM containing 0.5% bovine serum albumin. Binding reactions were stopped on ice by removing the media and quickly washing the cells three times with 0.9% NaCl. The cells were solubilized in 0.5 ml of 0.5M NaOH and 0.4% sodium deoxycholate, as described previously (Penhoat et al., 1989). The radioactivity of the lysate was quantified in a Packard Liquid Scintillation Analyzer (Perkin Elmer) with 60% efficiency.

### Coupling to Adenylate Cyclase in N1E115 Cells

The N1E115 cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) containing 4.5 g/l glucose, 11 g/l sodium pyruvate, supplemented with 15% fetal calf serum (FCS), 2 mM glutamine, penicillin (100 U/ml) and streptomycin (0.1 mg/ml), in a humidified incubator at 37°C and 5% CO<sub>2</sub> in air. All culture products were purchased from Life Technologies SAS (Villebon sur Yvette, France). The cells were seeded onto 12-well dishes at a high density (50,000–65,000 cells/cm<sup>2</sup>) and plated for 48 hr.

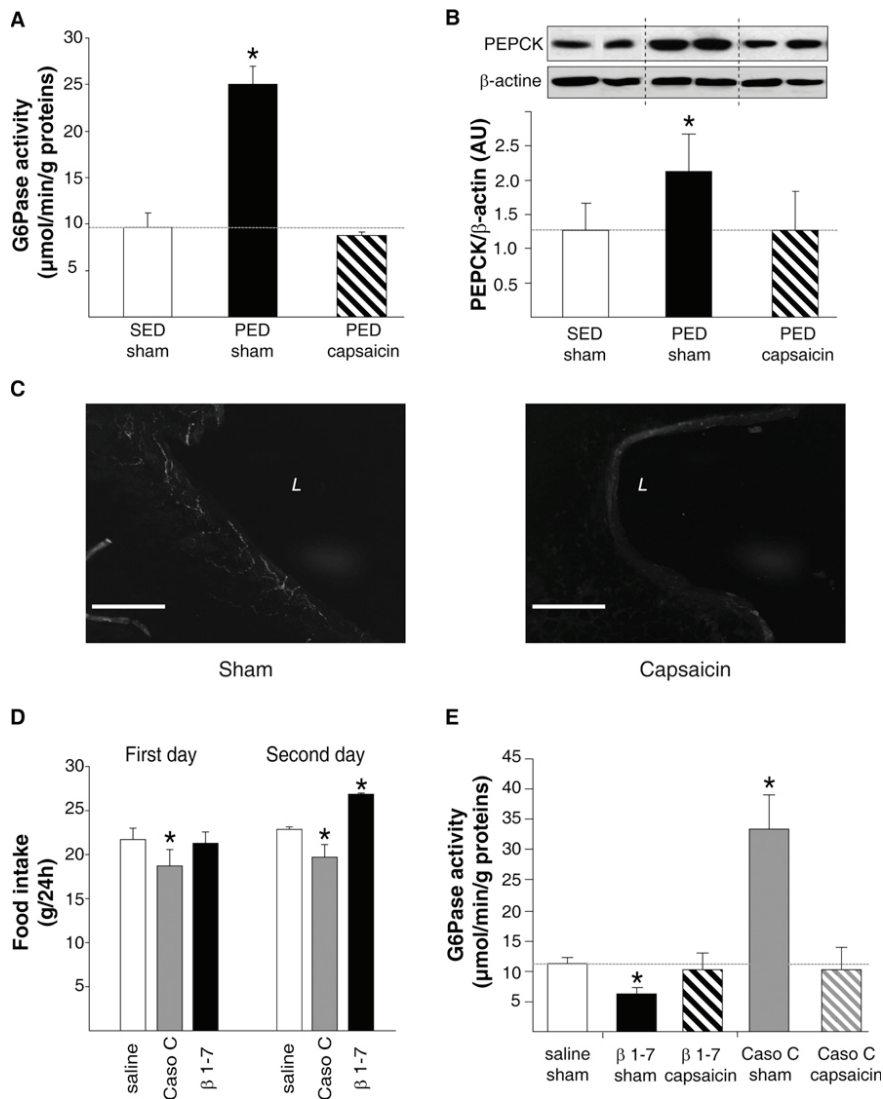
In order to study the coupling of MOR to adenylate cyclase, N1E115 cells were incubated in media containing various metabolites, either alone or in combination at a concentration of 10<sup>-7</sup>M, in the presence of 1 mM 3-isobutyl-1-methyl-xanthine (IBMX) (Sigma-Aldrich) to inhibit the phosphodiesterase activity. After a 20 min incubation at 37°C, the cells were recovered, and solubilized (Penhoat et al., 1989), and the intracellular accumulation of cAMP was measured by using a radioimmunoassay with <sup>125</sup>I-labeled cAMP (Beckman Coulter, Roissy, France).

## SUPPLEMENTAL REFERENCES

Penhoat, A., Jaillard, C., and Saez, J.M. (1989). Corticotropin positively regulates its own receptors and cAMP response in cultured bovine adrenal cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 4978–4981.

Zhang, J., Frassetto, A., Huang, R.R., Lao, J.Z., Pasternak, A., Wang, S.P., Metzger, J.M., Strack, A.M., Fong, T.M., and Chen, R.Z. (2006). The mu-opioid receptor subtype is required for the anorectic effect of an opioid receptor antagonist. *Eur. J. Pharmacol.* 545, 147–152.





**Figure S1. Effect of PED or of MOR-Modulators on Intestinal Gluconeogenesis Enzymes and Food Intake in Normal and Capsaicin-Treated Rats, Related to Figure 1**

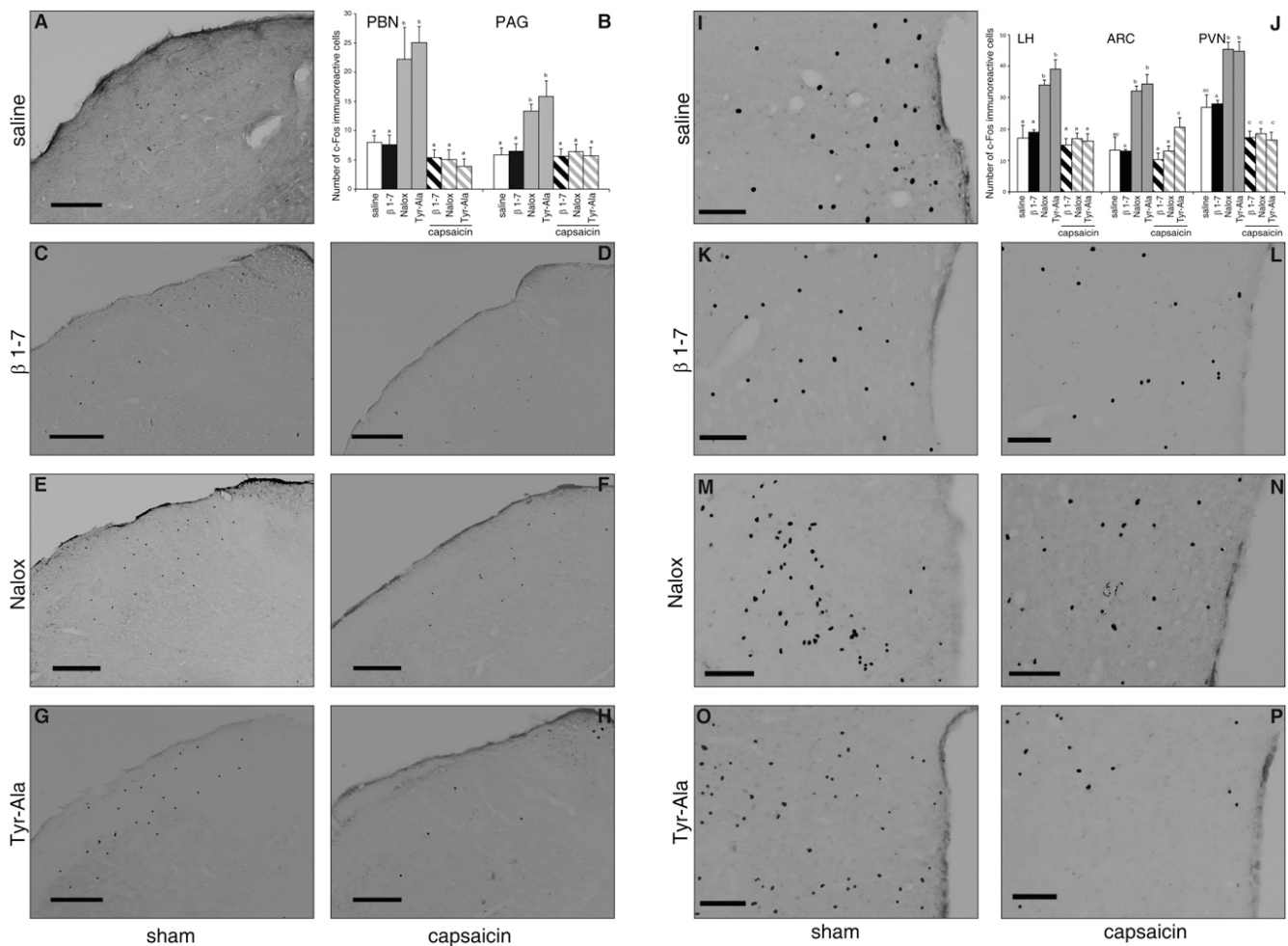
(A and B) Rats were treated by capsaicin around the portal vein or sham-operated. After recovery for 1 week fed on SED, they were switched on PED for 3 days and studied in comparison with a sham-operated group fed on SED. G6Pase activity (A) and PEPCK-c protein (B) were quantified in jejunum. The data are expressed as the means ± SEM of three rats per group. \*, significantly different from SED-sham,  $p < 0.05$ .

(C) Disappearance of nerve fibers in the walls of portal vein after capsaicin treatment. Immunofluorescence labeling of nerve fibers (neuronal marker PGP9.5) of portal vein was carried out in rats after sham (left) or capsaicin (right) treatment. Capsaicin effectively abolished the neural marker PGP9.5 immunoreactivity. L = luminal part of the vein. Scale bar, 200 μm.

(D) Rats with portal catheters were infused for two days with the indicated metabolites at a rate of  $8.3 \times 10^{-6}$  mmol/kg/min and the food intake was monitored at the end of the first and second days. The data are expressed as the means ± SEM of six to eight rats per group. \*, significantly different from saline infusion,  $p < 0.05$ .

(E) Rats underwent surgery for a portal catheter implantation. In rats aimed at portal vein neural inactivation, capsaicin treatment was performed at the time of surgery. After one week of recovery on SED, they were infused with the indicated metabolites for 8h at a rate of  $8.3 \times 10^{-6}$  mmol/kg/min. G6Pase activity was quantified as above. The data are expressed as the means ± SEM of five rats per group. \*, significantly different from saline infusion,  $p < 0.05$ .





**Figure S2. Effects of the Portal Infusion of MOR Modulators on C-FOS Expression in the PBN/ PAG and Hypothalamus of Rats, Related to Figure 3**

(A, C, E, and G) C-FOS immunoreactive cells in the PBN of rats infused via the portal vein with saline only (A),  $\beta$  1-7 (C), Nalox (E) and Tyr-Ala (G). Rate of infusion:  $8.3 \times 10^{-6}$  mmol/kg/min.

(B) Quantification of C-FOS neurons in the PBN and PAG: saline (white bar),  $\beta$  1-7 (black bar), Nalox (gray bar). Open bars: infusions in sham-treated rats; dashed bars: infusions in capsaicin-treated rats. Data are expressed as means  $\pm$  SEM of immunoreactive cells per brain hemisphere ( $n = 3$  per experimental group). The values with different letters differed significantly ( $p < 0.05$ , Kruskal and Wallis nonparametric test, followed by Dunn's post hoc test). PBN: parabrachial nucleus, PAG: periaqueductal gray.

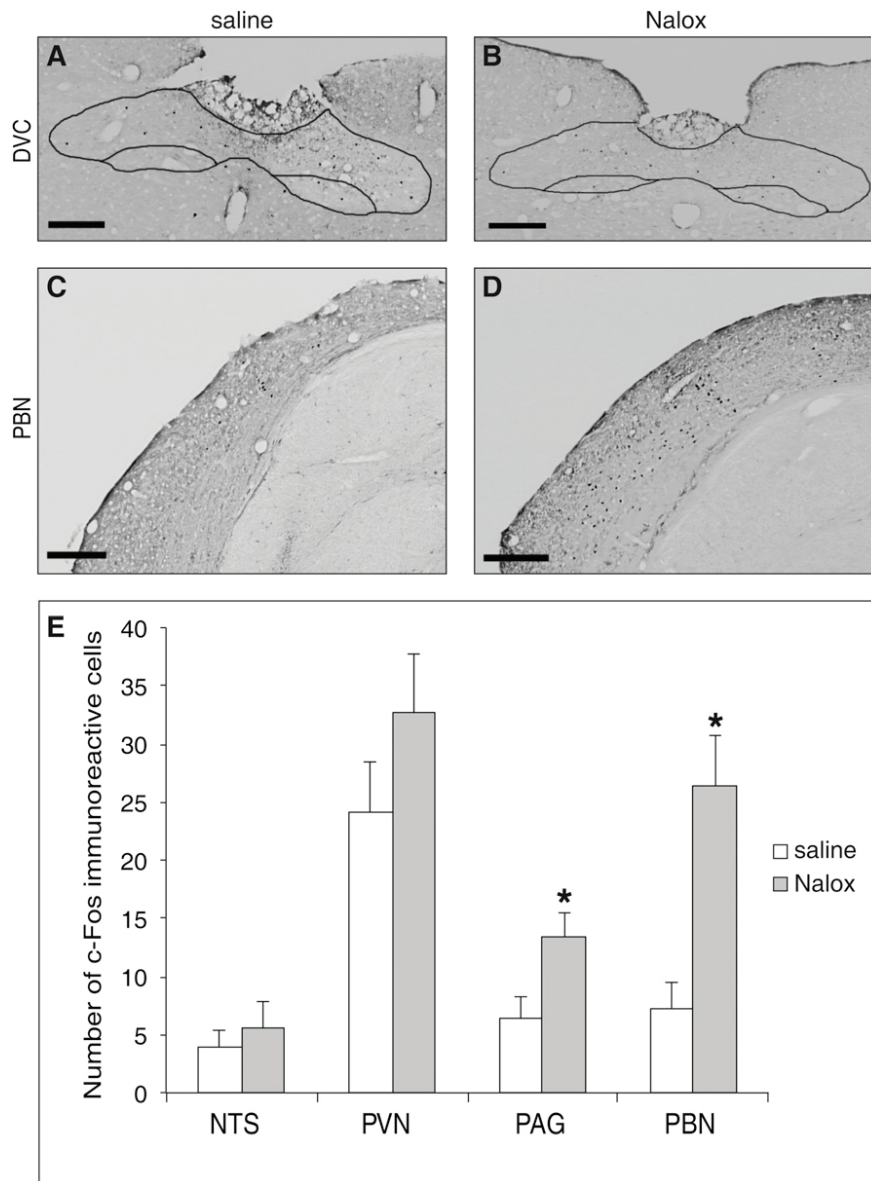
(D, F, and H) Comparable infusions of  $\beta$  1-7 (D), Nalox (F) and Tyr-Ala (H) in rats previously treated by capsaicin around the portal vein. Scale bar, 200  $\mu$ m.

(I, K, M, and O) C-FOS immunoreactive cells in the PVN of rats infused via the portal vein with saline only (I),  $\beta$  1-7 (K), Nalox (M) and Tyr-Ala (O).

(J) Quantification of C-FOS neurons in the LH, ARC and PVN: symbols, expression of data and statistics as above. LH: lateral hypothalamus, ARC: arcuate nucleus, PVN: paraventricular nucleus.

(L, N, and P) Comparable infusions of  $\beta$  1-7 (L), Nalox (N) and Tyr-Ala (P) in rats treated by capsaicin. Scale bar, 100  $\mu$ m.





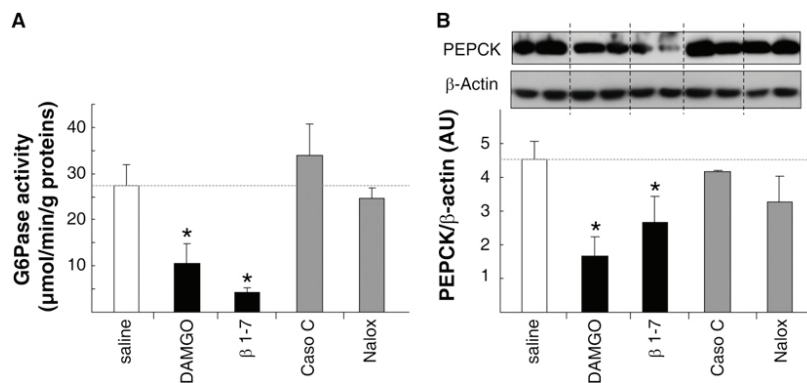
**Figure S3. Effect of Portal Infusion of Nalox on C-FOS Expression in Rats with Surgical Vagotomy, Related to Figure 3**

(A–D) Rats underwent a surgical vagotomy. After recovery, they were infused with saline (left) or Nalox (right). C-FOS immunoreactive cells were quantified in the NTS (A and B) and in the PBN (C and D). Infusion rates were as in Figure 3. Scale bars, 200  $\mu$ m.

(E) Quantification of C-FOS positive cells in the NTS, PVN, PAG and PBN: saline (white bar) and Nalox (gray bar). Data are expressed as means  $\pm$  SEM (n = 3) of immunoreactive cells per brain hemisphere. \*p < 0.05, using Mann-Whitney's nonparametric test.





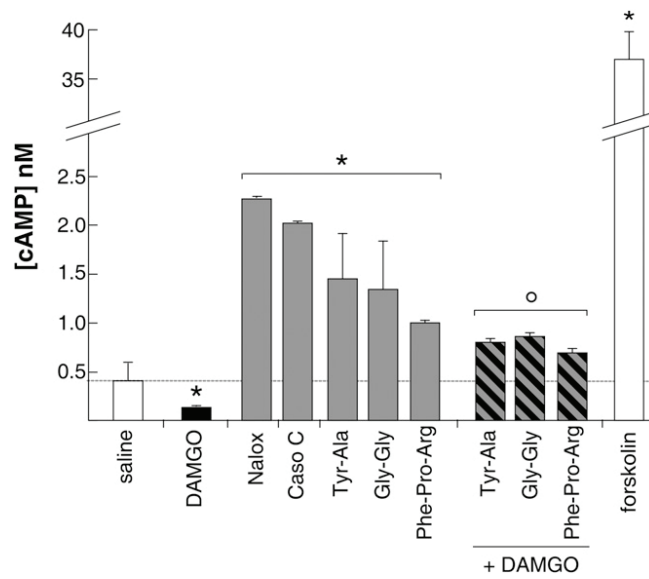


**Figure S4. Effect of Portal Infusions of MOR Modulators on Gut Gluconeogenesis Enzyme Expression in Rats Fed on a PED from Soy Protein, Related to Figure 4**

(A) Rats with portal catheters were fed on a PED from soy protein for two weeks before infusions. Infusions with MOR-effectors were done as described in Figure 4. G6Pase enzyme activity was determined in a jejunum sample.

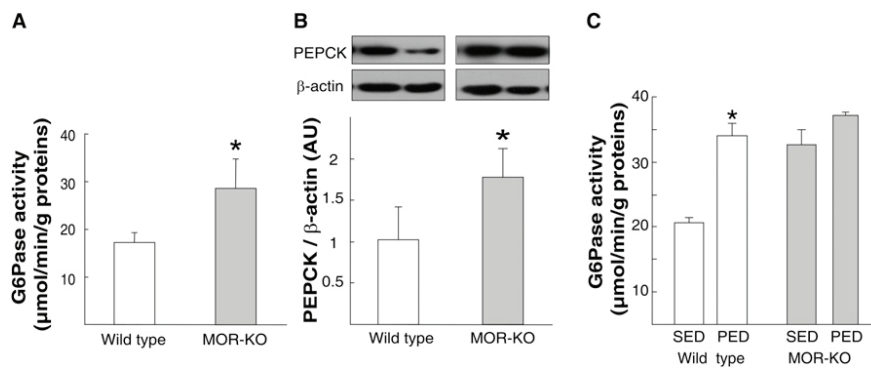
(B) Quantification of PEPCK-C protein by western blotting. The data are expressed as the means ± SEM of five rats per group. \*, significantly different from saline infusion,  $p < 0.05$ .





**Figure S5. Effect of MOR Modulators and Oligopeptides on the Coupling of MOR to Adenylate Cyclase in N1E115 cells, Related to Figures 5**  
 N1E115 cells were incubated for 20 min at 37°C in the presence of the indicated metabolites ( $10^{-7}$ M). cAMP was assayed by radioimmunoassay by using  $^{125}$ I-labeled cAMP. The effect of forskolin was studied as a positive control. The data are expressed as the means  $\pm$  SEM of four incubation experiments. \*, significantly different from saline; °, Significantly different from DAMGO alone;  $p < 0.05$ .





**Figure S6. Determination of Gluconeogenic Enzyme Expression in Wild-Type And MOR-KO Mice, Related to Figure 6**

(A and B) Wild-type and MOR-KO mice (fed on SED) were killed for intestine sampling. G6Pase activity (A) and PEPCK-C protein amount (B) determined from a jejunum sample. The data are expressed as the means  $\pm$  SEM of 5 mice per group. \*, significantly different from WT mice ( $p < 0.05$ ).

(C) Jejunal G6Pase activity was assayed at the end of the experiment in WT and MOR-KO mice fed on PED (relating to Figure 6C) and compared to two groups studied in parallel, continuously fed on SED. The data are expressed as the means  $\pm$  SEM of 6 mice per group. \*, significantly different from SED fed mice ( $p < 0.05$ ).



**De Vadder, F., Kovatcheva-Datchary, P., Goncalves, D., Vinera, J., Zitoun, C., Duchampt, A., Bäckhed, F. et Mithieux, G. (2014). Microbiota-generated metabolites promote metabolic benefits via gut-brain neural circuits. *Cell* 156, 84-96.**





Des facteurs extrinsèques tels qu'un mode de vie sédentaire et une prise alimentaire hypercalorique augmentent grandement le risque de développer des maladies telles que l'obésité et le diabète de type 2. Il est bien établi que la qualité du régime alimentaire peut être améliorée par une réduction de la consommation de graisses et de sucres rapides, tout en augmentant la consommation de fibres alimentaires. Les fibres alimentaires constituent la portion non digestible des aliments végétaux. Elles peuvent être séparées en deux composantes : les fibres insolubles (cellulose et lignine) et les fibres solubles telles que les fructo-oligosaccharides (FOS). Comme discuté précédemment, ce dernier type de fibres est fermenté par le microbiote en AGCC : acétate, propionate et butyrate principalement. Les régimes riches en fibres améliorent la sensibilité à l'insuline et la tolérance au glucose chez des sujets maigres (Robertson et al., 2003, 2005) et obèses diabétiques (Mendeloff, 1977; Ray et al., 1983).

Les AGCC sont souvent considérés comme étant responsables des effets bénéfiques des fibres alimentaires solubles, à travers la régulation de l'homéostasie énergétique (Layden et al., 2013). Les AGCC sont également des molécules de signalisation, agissant non seulement comme des modulateurs de l'épigénome à travers l'acétylation d'histones mais également comme des ligands endogènes des récepteurs FFAR2 et FFAR3 (Brown et al., 2003). La signalisation à travers ces récepteurs induit de nombreux effets comme la synthèse de GLP-1 dans les cellules L entéroendocrines (Tolhurst et al., 2012), la modulation de l'adiposité et des changements dans le transit intestinal (Samuel et al., 2008).

A certains égards, les bénéfices des fibres solubles sur les homéostasies glucidique et énergétique paraissent paradoxaux. D'une part, le butyrate est en effet un substrat énergétique préférentiel des colonocytes et des entérocytes (Donohoe et al., 2011). Comment une augmentation de la récolte énergétique pourrait-elle être réconciliée avec un bénéfice sur l'homéostasie énergétique ? Des études récentes ont décrit un rôle bénéfique du butyrate dans l'induction de la dépense énergétique (Gao et al., 2009; Lin et al., 2012), mais les mécanismes sous-jacents restaient mal compris. D'autre part, le propionate est classiquement décrit comme un substrat de la néoglucogenèse (Anderson et Bridges, 1984). Une augmentation de la production hépatique de glucose est reconnue comme étant un facteur causal de la résistance à l'insuline (Clore et al., 2000; Magnusson et al., 1992), aboutissant au diabète de type 2. Cet aspect est donc en contradiction avec les effets bénéfiques des fibres solubles sur le métabolisme.

Il faut souligner que la plupart des études sur la capacité du propionate à être transformé en glucose ont été menées avant la découverte de l'intestin comme organe



néoglucogénique (Croset et al., 2001; Mithieux et al., 2004a; Rajas et al., 1999). Des études de notre laboratoire suggèrent que la NGI induit des effets bénéfiques sur la balance glycémique et l'homéostasie énergétique. Nous avons montré que la NGI est détectée par un capteur de glucose portal qui transmet ce signal au cerveau via le SNP, aboutissant à terme à des effets bénéfiques (Delaere et al., 2012). Comme indiqué précédemment, cette voie de signalisation est particulièrement importante lors des régimes riches en protéines (Duraffourd et al., 2012; Mithieux et al., 2005; Pillot et al., 2009) et suite à un by-pass gastrique (Troy et al., 2008). Nous avons formulé l'hypothèse que le propionate est un substrat de la NGI parce que les métabolites produits lors de son catabolisme entrent dans la voie de la néoglucogénèse par la voie du cycle de Krebs, qui est la voie majeure de formation du glucose dans l'intestin (Croset et al., 2001; Mithieux et al., 2004b), et parce que le propionate est produit dans la lumière de l'intestin.

De nombreuses études s'intéressent à nouveau aux effets métaboliques des AGCC depuis la découverte de l'association entre la composition du microbiote intestinale et l'incidence de l'obésité (Flint et al., 2012). Comparé au microbiote d'individus maigres, le microbiote des individus obèses a une capacité de récolte d'énergie accrue (Schwiertz et al., 2010; Turnbaugh et al., 2009a). De plus, plusieurs études montrent une influence majeure des régimes riches en graisses dans la composition du microbiote des rongeurs (Hildebrandt et al., 2009; Parks et al., 2013; Turnbaugh et al., 2008, 2009b). Une autre étude récente chez des humains obèses montre que la composition du microbiote peut être associée à des défauts d'homéostasie glucidique (Karlsson et al., 2013).

Dans cette étude, nous combinons des études d'expression de gènes et de traceurs métaboliques pour évaluer si les fibres solubles et/ou les AGCC peuvent induire la NGI, soit par la régulation des gènes de la NGI, soit, pour le propionate, en agissant comme précurseur du glucose produit. Nous avons également évalué si la NGI avait un rôle causal dans les bénéfices associés aux fibres solubles et aux AGCC. En utilisant des souris spécifiquement invalidées pour le gène de la *G6pc* dans l'intestin, nous avons également déterminé la part relative de la NGI de l'hôte et de la composition du microbiote dans les bénéfices métaboliques conférés par la présence de fibres solubles dans le régime alimentaire.



# Microbiota-Generated Metabolites Promote Metabolic Benefits via Gut-Brain Neural Circuits

Filipe De Vadder,<sup>1,2,3</sup> Petia Kovatcheva-Datchary,<sup>4</sup> Daisy Goncalves,<sup>1,2,3</sup> Jennifer Vinera,<sup>1,2,3</sup> Carine Zitoun,<sup>1,2,3</sup> Adeline Duchamp,<sup>1,2,3</sup> Fredrik Bäckhed,<sup>4,5</sup> and Gilles Mithieux<sup>1,2,3,\*</sup>

<sup>1</sup>Institut de la Santé et de la Recherche Médicale, U855, Lyon 69372, France

<sup>2</sup>Université de Lyon, Lyon 69008, France

<sup>3</sup>Université Lyon 1, Villeurbanne 69622, France

<sup>4</sup>Wallenberg Laboratory and Department of Molecular and Clinical Medicine, University of Gothenburg 41345, Sweden

<sup>5</sup>Novo Nordisk Foundation Center for Basic Metabolic Research, Section for Metabolic Receptology and Enteroendocrinology, Faculty of Health Sciences, University of Copenhagen, Copenhagen 2200, Denmark

\*Correspondence: [gilles.mithieux@inserm.fr](mailto:gilles.mithieux@inserm.fr)

<http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2013.12.016>

## SUMMARY

Soluble dietary fibers promote metabolic benefits on body weight and glucose control, but underlying mechanisms are poorly understood. Recent evidence indicates that intestinal gluconeogenesis (IGN) has beneficial effects on glucose and energy homeostasis. Here, we show that the short-chain fatty acids (SCFAs) propionate and butyrate, which are generated by fermentation of soluble fiber by the gut microbiota, activate IGN via complementary mechanisms. Butyrate activates IGN gene expression through a cAMP-dependent mechanism, while propionate, itself a substrate of IGN, activates IGN gene expression via a gut-brain neural circuit involving the fatty acid receptor FFAR3. The metabolic benefits on body weight and glucose control induced by SCFAs or dietary fiber in normal mice are absent in mice deficient for IGN, despite similar modifications in gut microbiota composition. Thus, the regulation of IGN is necessary for the metabolic benefits associated with SCFAs and soluble fiber.

## INTRODUCTION

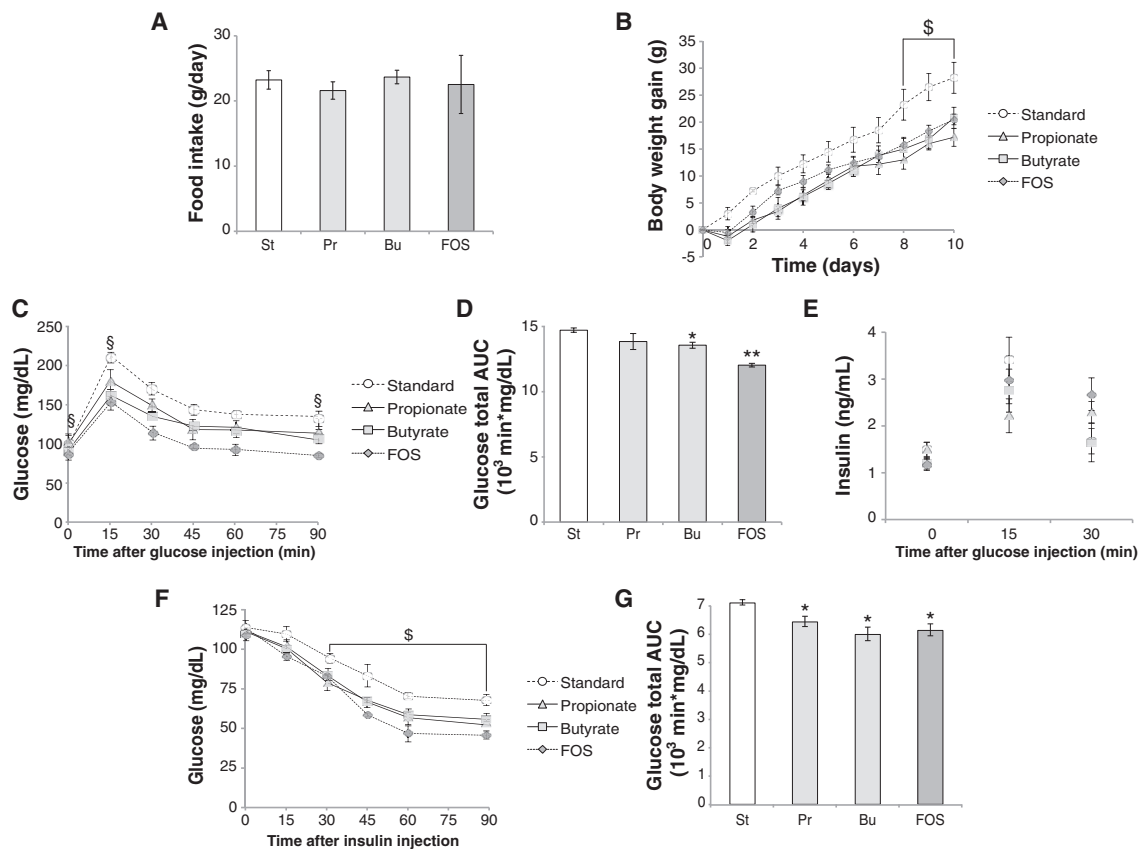
Extrinsic factors such as a sedentary lifestyle and excessive caloric intake contribute to the increasing incidence of obesity and type 2 diabetes. It is well-established that diet quality can be improved by reducing the intake of fat and simple sugars while increasing the intake of dietary fiber. Dietary fiber is the indigestible portion of plant foods and has two main components: insoluble fiber (principally cellulose and lignin) and soluble fiber such as galacto-oligosaccharides and fructo-oligosaccharides (FOS), which are fermented by the gut microbiota into short-chain fatty acids (SCFAs) acetate, propionate, and butyrate (Flint et al., 2012). Fiber-enriched diets improve insulin sensi-

tivity and glucose tolerance in lean (Robertson et al., 2003, 2005) and obese diabetic subjects (Mendeloff, 1977; Ray et al., 1983).

The beneficial effects of soluble fiber are often considered to be mediated by SCFAs through regulation of whole-body energy homeostasis (Layden et al., 2013). SCFAs are also signaling molecules, acting not only as important modulators of the epigenome through altering histone acetylation but also as endogenous ligands for the G-protein-coupled receptors FFAR3 and FFAR2 (Brown et al., 2003). Signaling through these receptors mediates numerous effects such as synthesis of glucagon-like peptide 1 in enteroendocrine cells (Tolhurst et al., 2012), modulation of adiposity, and changes in gut transit time (Samuel et al., 2008). In some aspects, the benefits of soluble fiber on glucose and energy homeostasis appear paradoxical. First, butyrate is a key energy substrate for both colonocytes and enterocytes (Donohoe et al., 2011). How could an increase in energy harvest be reconciled with a benefit on energy homeostasis? Recent studies have described a role of butyrate in enhancing energy expenditure (Gao et al., 2009; Lin et al., 2012), but mechanistic insights into how this is achieved are less understood. Second, propionate is classically described as an efficient hepatic gluconeogenic substrate (Anderson and Bridges, 1984). An increase in hepatic glucose production is recognized as a causal factor of insulin resistance (Clore et al., 2000; Magnusson et al., 1992), leading to type 2 diabetes, and thus it is unclear how this could be reconciled with a metabolic benefit of soluble fibers.

It is noteworthy that most studies featuring propionate as a gluconeogenic substrate were carried out before the intestine was described as a gluconeogenic organ (Croset et al., 2001; Mithieux et al., 2004a; Rajas et al., 1999). Studies from our lab suggest that intestinal gluconeogenesis (IGN) induces beneficial effects on glucose and energy homeostasis. We have shown that glucose released by IGN is detected by a portal vein glucose sensor that transmits its signal to the brain by the peripheral nervous system to promote beneficial effects on food intake and glucose metabolism (Delaere et al., 2012). This chain of events is of particular relevance with protein-enriched diets





**Figure 1. Effects of Dietary SCFAs and FOS on Body Weight and Glucose Homeostasis in Rats**

(A–G) Food intake (A) and body weight gain (B) of rats fed standard or butyrate-, propionate- or FOS-enriched diet. Glucose (C) and insulin (F) tolerance tests were performed respectively 11 and 13 days after switching to the indicated diets. Blood glucose levels and total glucose area under the curve (AUC) (D and G) are shown. (E) Insulin plasma levels were determined in samples taken during the glucose tolerance test. \$,  $p < 0.05$  standard versus all groups; §,  $p < 0.05$  standard versus butyrate and FOS; \* $p < 0.05$  versus standard; \*\* $p < 0.01$  versus standard (ANOVA followed by Dunnett's post hoc test). Data are mean  $\pm$  SEM,  $n = 6$  rats per group. St, standard; Pr, propionate; Bu, butyrate; FOS, fructo-oligosaccharides. See also [Figure S1](#).

(Duraffourd et al., 2012; Mithieux et al., 2005; Pillot et al., 2009) and after gastric bypass surgery (Troy et al., 2008). We hypothesized that propionate is a substrate for IGNE because its downstream metabolites enter the gluconeogenic pathway via the citric acid cycle, which is the main route of glucose formation in the small intestine (Croset et al., 2001; Mithieux et al., 2004b), and because propionate is produced in the gut lumen.

Renewed interest in SCFAs has emerged because of the recently identified association between gut microbiota composition and obesity and associated pathologies (Flint et al., 2012). Microbiota from obese individuals might have a higher capacity for energy harvest than those from lean individuals (Schwartz et al., 2010; Turnbaugh et al., 2009a), and several studies have shown a major influence of high-fat diets on the composition of gut microbiota in rodents (Hildebrandt et al., 2009; Parks et al., 2013; Turnbaugh et al., 2008, 2009b). Furthermore, a recent study in obese humans indicates that specific microbiota compositions may be associated with impaired glucose control (Karlsson et al., 2013).

Here we combined gene expression and metabolic tracer studies to evaluate whether soluble fiber and/or SCFAs could

induce intestinal glucose production, either by regulating gluconeogenic gene expression, or, for propionate, by serving as a substrate. We also tested whether IGNE might account for the benefits of soluble fiber, and specifically whether it had a causal role in the protection against diet-induced deregulation of glucose homeostasis. Finally, using mice with an intestinal-specific knockout of the catalytic subunit (*G6pc*) of glucose-6-phosphatase (G6Pase, the essential enzyme of gluconeogenesis), we evaluated the respective roles of the host IGNE function and the gut microbiota composition in the metabolic benefits conferred by the presence of soluble fiber in the diet.

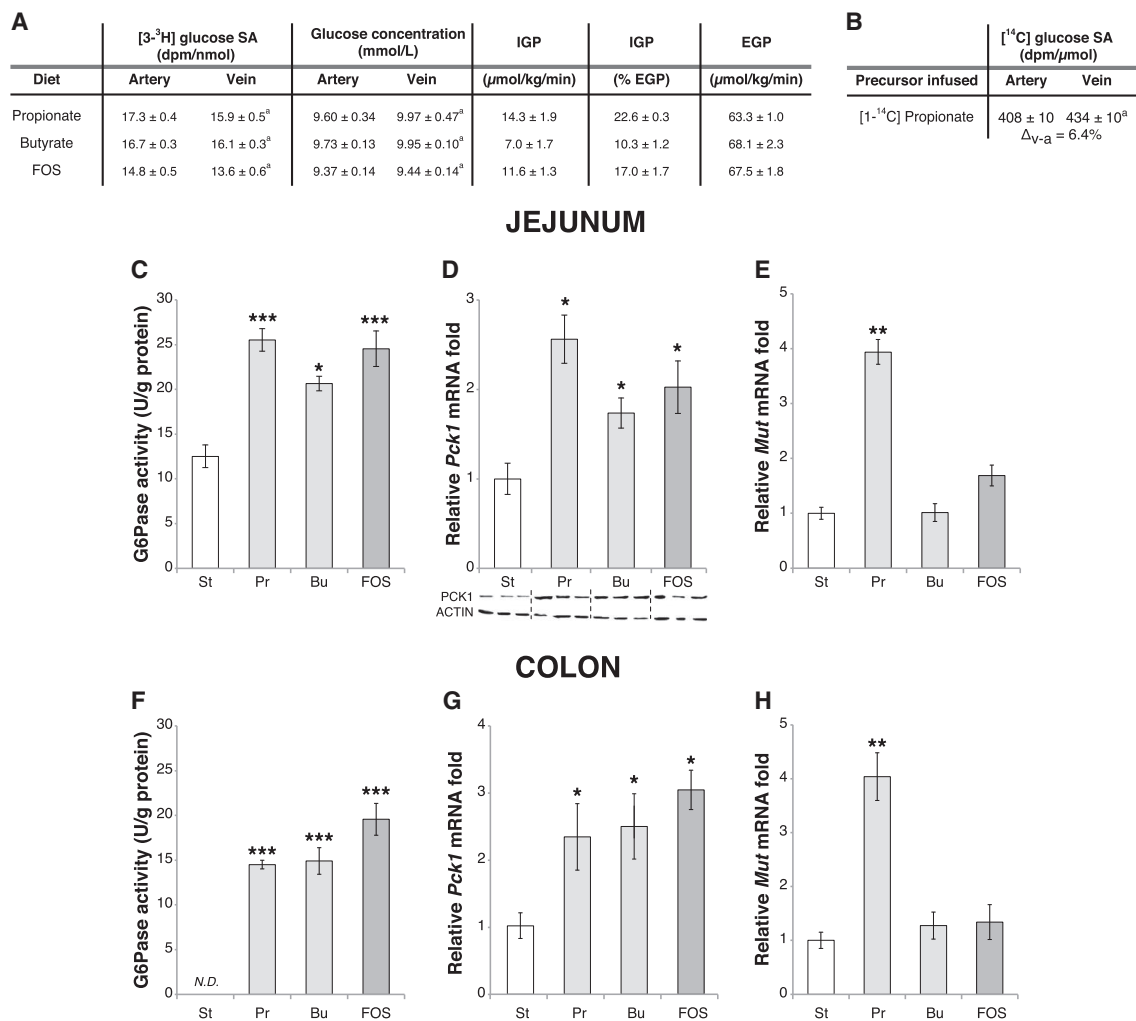
## RESULTS

### Dietary SCFAs and FOS Increase Glucose Tolerance and Insulin Sensitivity in Rats

We first confirmed the beneficial effects of SCFAs (propionate and butyrate) and FOS on body weight gain in rats. Body weight of rats on a standard diet increased by  $30 \pm 2.5$  g over 10 days; despite a similar food intake, SCFA- and FOS-fed rats showed significantly less weight gain over this time period ([Figures 1A](#)







**Figure 2. Effect of Dietary SCFAs and FOS on IGN in Rats**

(A) Endogenous glucose production (EGP) and intestinal glucose fluxes were determined in rats fed a standard, butyrate-, propionate-, or FOS-enriched diet for 2 weeks.

(B) Determination of intestinal incorporation of  $^{14}\text{C}$ -labeled propionate into glucose in 24-hr-fasted rats. <sup>a</sup>Different from value in artery ( $p < 0.05$ , Student's two-tailed test for paired values). SA, specific activity.

(C–H) G6Pase activity and *Pck1* and *Mut* expression were evaluated in the jejunum (C to E) and colon (F to H) of rats fed the indicated diets. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$  versus standard (ANOVA followed by Dunnett's post hoc test).

Data are mean  $\pm$  SEM of  $n = 6$  rats per group. St, standard; Pr, propionate; Bu, butyrate; FOS, fructo-oligosaccharides; N.D., not detected.

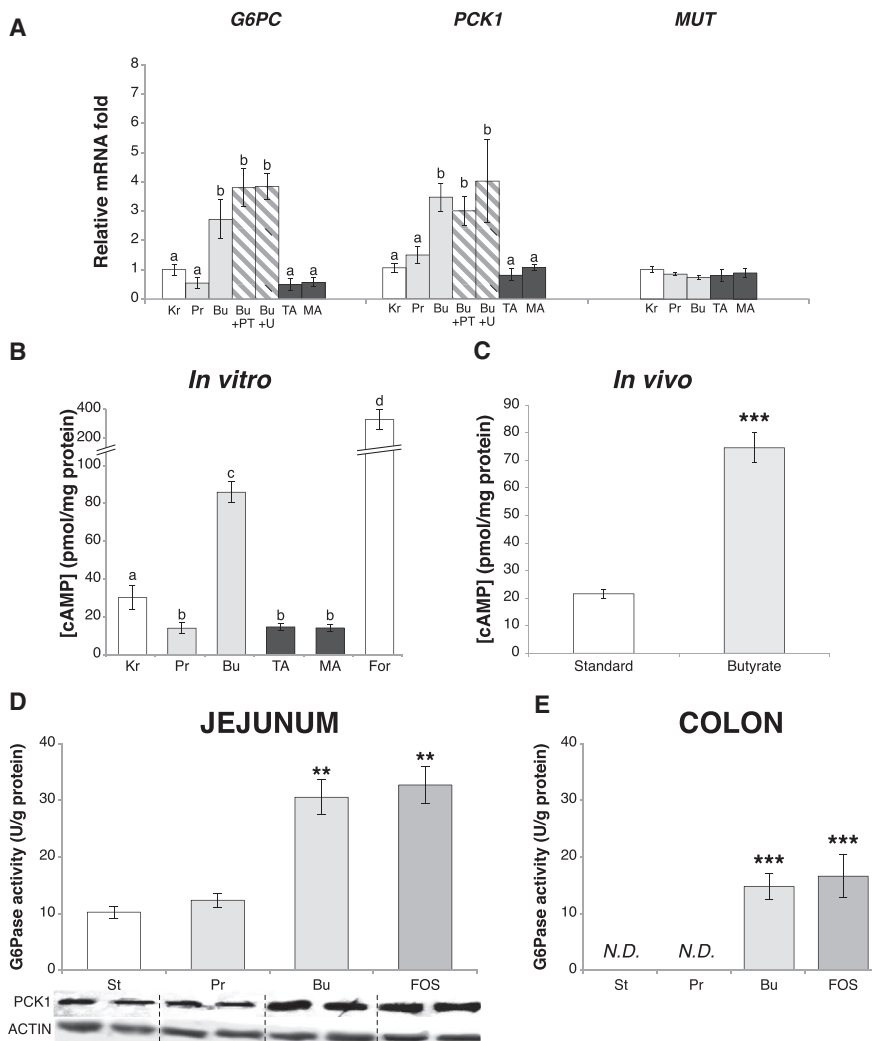
and 1B). Importantly, SCFAs and FOS did not influence fat absorption by the gastrointestinal tract (data not shown). To confirm that SCFAs and FOS also improve glucose homeostasis, we performed intraperitoneal glucose (GTT) and insulin (ITT) tolerance tests. The SCFA- and FOS-fed rats exhibited improved glucose tolerance compared with rats fed a standard diet (Figures 1C and 1D), with no associated increase of insulin secretion (Figure 1E). In addition, basal glucose levels after a 16 hr fast were about 15% lower in butyrate- and FOS-fed rats compared with rats fed a standard diet (Figure 1C, time 0). Similarly, insulin tolerance was significantly enhanced in the SCFA- and FOS-fed rats (Figures 1F and 1G). Furthermore, hepatic G6Pase activity was lower in FOS-fed rats compared with rats on a standard diet (Figure S1 available online), which was in line with the

improvement of glucose control, as previously observed after IGN induction by gastric bypass surgery (Troy et al., 2008).

#### Dietary SCFAs and FOS Induce Intestinal Glucose Production and IGN Gene Expression

We next quantified intestinal glucose production (IGP) in rats fed propionate, butyrate or FOS for 2 weeks. In all three groups,  $[3\text{-}^3\text{H}]$  glucose specific activity was lower in the portal vein than in the artery (Figure 2A). This indicated that newly synthesized, unlabeled glucose had been released by the intestine. Moreover, plasma glucose concentrations were slightly higher in the portal vein than in the artery (Figure 2A), indicating that IGP was able to counterbalance intestinal glucose utilization. Of note, propionate had the strongest capacity to induce IGP,





**Figure 3. Butyrate Directly Activates IG N Genes, Whereas Propionate Action Is Dependent on the Integrity of Periportal Afferents**

(A and B) Caco-2 cells were cultured at confluence for 3 weeks and mRNA levels of *G6PC*, *PCK1* and *MUT* were evaluated using quantitative RT-PCR (A) and intracellular cAMP was measured (B). Kr, Krebs-Ringer; Pr, propionate; Bu, butyrate; PT, pertussis toxin; U, U73122; TA, tiglic acid; MA, 1-methylcyclopropanecarboxylic acid; For, forskolin. Values with different letters differ significantly ( $p < 0.05$ , ANOVA followed by Tukey's post hoc test).  $n = 9$  wells per experimental group.

(C) Rats were fed standard or butyrate-enriched diet for two weeks and cAMP content was measured in the jejunum.

(D and E) G6Pase activity and *PCK1* protein expression were analyzed in the jejunum (D) and colon (E) of capsaicin-treated animals fed the indicated diets. \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$  versus standard (ANOVA followed by Dunnett's post hoc test). Data are mean  $\pm$  SEM,  $n = 6$  rats per group. St, standard; Pr, propionate; Bu, butyrate; FOS, fructo-oligosaccharides; N.D., not detected. See also Figure S2.

accounting for 23% of total endogenous glucose production (Figure 2A). We therefore investigated whether [ $^{14}$ C]-propionate carbons could be incorporated into newly synthesized glucose. [ $^{14}$ C]-glucose specific activity after a 24 hr fast was significantly higher in portal venous blood than in arterial blood (Figure 2B), suggesting that the small intestine is able to efficiently convert propionate into glucose.

We then studied the effect of SCFA- and FOS-enriched diets on G6Pase activity and IG N gene expression. Rats fed SCFAs or FOS for 2 weeks had about 2-fold higher G6Pase activity in the jejunum compared with rats fed a standard diet (Figure 2C); similar increases in both mRNA and protein levels of phosphoenolpyruvate carboxykinase (cytosolic form, *Pck1*) in response to SCFAs and FOS were also observed (Figure 2D). Interestingly, only propionate induced the expression of methylmalonyl-coA mutase (*Mut*), the key enzyme for its incorporation into glucose (Figure 2E). In rats fed SCFAs or FOS for 2 weeks, there was a dramatic induction of G6Pase activity in the colon (where the microbiota produces SCFAs in greatest concentrations), resulting in an activity similar to that observed in the jejunum of rats fed a standard diet; G6Pase activity was not detected in the colon

of rats fed a standard diet (Figure 2F). The pattern of induction of *Pck1* and *Mut* expression in the colon in response to SCFAs and FOS was similar to that observed in the jejunum (Figures 2G and H).

### Butyrate but Not Propionate Is Able to Directly Induce IG N Genes

We next investigated if SCFAs could directly induce IG N genes using Caco-2 cells, which have a phenotype that resembles the enterocytes of the small intestine (Hidalgo et al., 1989). Expression of *G6PC*, *PCK1*, and *MUT* in Caco-2 cells was not affected by 24 hr incubation with propionate or specific agonists of FFAR2 (tiglic acid [TA]) or FFAR3 (1-methylcyclopropanecarboxylic acid [MA]) (Schmidt et al., 2011) (Figure 3A). However, expression of *G6PC* and *PCK1* was increased 2- to 3-fold in cells incubated with butyrate (Figure 3A). Neither pertussis toxin nor U73122 (inhibitors of Gi- and Gq-mediated signaling, respectively) was able to counterbalance the effect of butyrate (Figure 3A, dashed bars), indicating that induction of *G6PC* and *PCK1* expression by butyrate was not dependent on any Gi- or Gq-mediated mechanism. Intracellular cAMP content was increased 3-fold in butyrate-treated cells compared with control cells, while no cAMP increase was observed in cells treated with propionate, TA, or MA (Figure 3B). Interestingly, a similar cAMP increase was observed in the jejunum of rats fed a butyrate-enriched diet (Figure 3C). These data suggest that butyrate-mediated induction of *G6PC* and *PCK1* gene expression could be mediated by cAMP, a known activator of these genes (Gautier-Stein et al., 2006; Mutel et al., 2011).



### Propionate Induction of IGN Depends on Gut-Brain Neural Communication

Since only butyrate can directly activate IGN genes *in vitro*, we hypothesized that propionate-mediated induction of IGN could depend upon a gut-brain communication axis. To question the role of the portal neural afferents in the induction of IGN gene expression by propionate, we performed periportal nervous deafferentiation with capsaicin in rats before feeding with SCFAs- and FOS-enriched diets for 2 weeks. G6Pase activity and PCK1 protein expression were not increased in the intestine of capsaicin-treated rats fed propionate compared with the expression in rats fed a standard diet (Figures 3D and 3E). By contrast, dietary butyrate and FOS could still increase G6Pase activity and PCK1 expression in capsaicin-treated rats (Figures 3D and 3E). However, these responses were clearly not associated with improvements in glucose homeostasis since the beneficial effects of dietary SCFAs and FOS on body weight gain and improvement in glucose and insulin tolerance were abolished by denervation (Figures S2A–S2E). These results are consistent with the crucial role of the periportal nervous system in transducing the beneficial effects of IGN and portal glucose sensing (Mithieux et al., 2005; Troy et al., 2008). Moreover, no inhibition of G6Pase activity was observed in the liver of capsaicin-treated rats fed SCFAs or FOS; in fact, a slight increase was observed in propionate-fed animals (Figure S2F).

Since the propionate receptor FFAR3 is expressed in the peripheral nervous system (Kimura et al., 2011; Nøhr et al., 2013), we used immunofluorescence studies to examine the presence of FFAR3 in the nerve fibers of the portal vein. As shown in Figure 4A, the neuronal marker PGP9.5 (left) and FFAR3 (right) were expressed in the rat portal vein wall and found in close proximity (bottom, in yellow).

Next, we tested whether propionate-induced IGN activation depended on FFAR3 signaling *in vivo*. When propionate was infused in the portal vein at a rate mimicking that of a FOS-enriched meal, G6Pase activity showed a 2.5-fold increase in the jejunum when compared to the activity level after a saline infusion (Figure 4B). In contrast, the ketone body  $\beta$ -hydroxybutyrate ( $\beta$ -HB), an antagonist of FFAR3 (Kimura et al., 2011), induced a slight decrease in G6Pase activity when infused alone and reversed the propionate-mediated induction when infused together with propionate (Figure 4B).

Lastly, we evaluated the impact of propionate feeding on the regions of the central nervous system implicated in signaling from the portal area: the dorsal vagal complex (DVC), which receives inputs from the vagal pathway, the C1 segment of the spinal cord and the parabrachial nucleus (PBN), which receive inputs from the spinal pathway, and the hypothalamus, which receives inputs from both the PBN and the DVC (Berthoud, 2004). Dietary propionate caused a 2- to 3-fold induction of c-Fos (a well-recognized marker of neuronal activation; Sagar et al., 1988) in all areas of the DVC (Figures 4C–4E), as well as in the spinal C1 segment and the PBN (Figures S3A–S3D). Interestingly, such activation was absent in capsaicin-treated rats (Figures 4D and 4F). A similar pattern of c-Fos activation (and of denervation effect) occurred in the main hypothalamic regions, which receive inputs from both the PBN and

the DVC, namely the paraventricular nucleus (PVN), the lateral hypothalamus (LH) and the arcuate nucleus (ARC) (Figures S3E–S3H).

Taken together, these data suggest that FFAR3 is a major actor in the gut-brain communication mechanism leading to propionate-mediated induction of IGN.

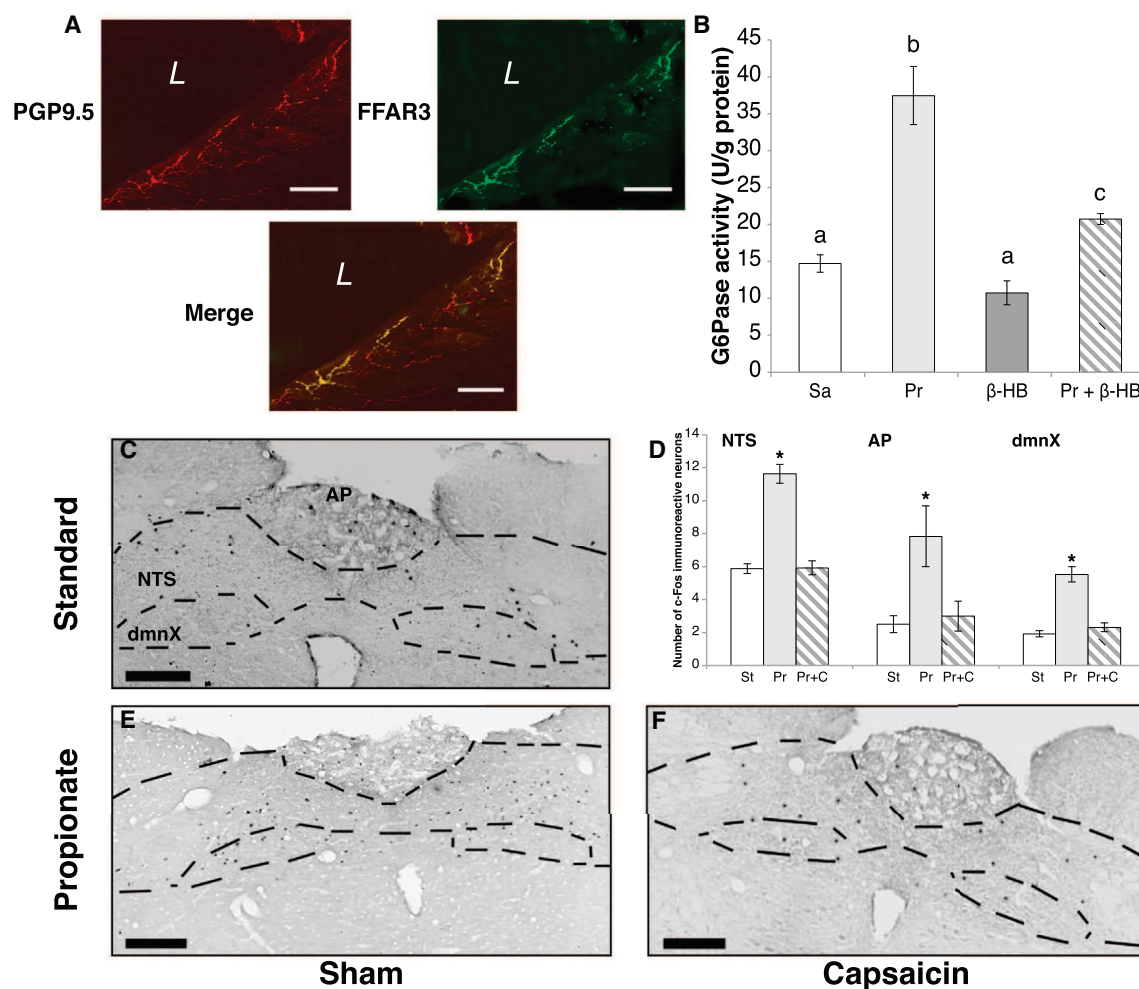
### IGN Plays a Causal Role in SCFA- and FOS-Induced Metabolic Benefits under Both Normal and Insulin-Resistant Conditions

To determine whether IGN has a causal role in SCFA- and FOS-induced metabolic improvements, we used mice deficient in IGN (*i.e.*, with specific disruption of the G6Pase catalytic subunit in the intestine, I-G6pc<sup>-/-</sup> mice, Penhoat et al., 2011). When fed SCFA- or FOS-enriched diets, wild-type (WT) mice exhibited the same metabolic benefits as those observed in rats, *i.e.*, enhanced glucose and insulin tolerance (Figure 5, left). In contrast, these metabolic benefits were not observed in I-G6pc<sup>-/-</sup> mice (Figure 5, right), and glucose tolerance was even slightly impaired in I-G6pc<sup>-/-</sup> mice fed a propionate-enriched diet (Figures 5B and 5D). We observed no differences in body weight gain on standard diet (data not shown) or food intake between I-G6pc<sup>-/-</sup> and WT mice (Figure S4A). Furthermore, when compared to WT mice, body weight gain in I-G6pc<sup>-/-</sup> mice was significantly higher after switching to SCFA- and FOS-enriched diets (Figure S4B).

To elucidate the role of IGN in the well-known FOS-mediated resistance to diet-induced obesity and deregulation of glucose control, we fed WT and I-G6pc<sup>-/-</sup> mice a high-fat/high-sucrose (HF-HS) diet (composition available in Table S1) with or without FOS. In WT mice, addition of FOS to a HF-HS diet abolished the development of diet-induced obesity without an effect on food intake (Figures 6A and 6B), dramatically improved glucose and insulin tolerance (Figures 6C–6F), and significantly decreased fat mass in the subcutaneous, epididymal and visceral adipose tissues (Figures S5A–S5C). In contrast, in I-G6pc<sup>-/-</sup> mice fed a HF-HS diet, FOS supplementation resulted in increased body weight (Figure 6A), no change in glucose tolerance (Figures 6C and 6D), decreased insulin tolerance (Figures 6E and 6F), and no change in fat mass in the subcutaneous and visceral adipose tissues (Figures S5A–S5C). Thus, the FOS-mediated resistance to diet-induced obesity and improvement of glucose control was absent in I-G6pc<sup>-/-</sup> mice. In fact, these mice experienced increased body weight gain and worsened insulin tolerance in response to FOS supplementation.

We used two-way ANOVA to evaluate the relative effects of genotype and diet on the total observed variability between WT and I-G6pc<sup>-/-</sup> mice on a HF-HS diet with or without FOS. Regarding glucose tolerance and insulin sensitivity, there was a strong interaction between diet and genotype ( $p = 0.0261$  for GTT;  $p = 0.0004$  for ITT), with genotype accounting for almost 50% of the total variance. This strong effect of genotype was also found for adiposity (29.43% of variance,  $p = 0.0017$  in visceral adipose tissue), suggesting that IGN accounts for most of the metabolic improvements observed in FOS feeding. Moreover, intestinal G6Pase activity was induced in FOS-fed WT mice, whereas only residual nonspecific activity





**Figure 4. Propionate Initiates a Gut-Brain Circuit Dependent on FFAR3 in the Portal Nerves**

(A) Neuronal marker PGP9.5 (red, left) colocalized with FFAR3 (green, right) in the walls of the portal vein of rats. Lower, merged image. Scale bar, 50  $\mu$ m. L, vein lumen.

(B) G6Pase activity in the jejunum of rats after a 6 hr-perfusion of saline (Sa), propionate (Pr) or  $\beta$ -hydroxybutyrate ( $\beta$ -HB). Values with different letters differ significantly ( $p < 0.05$ , one-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test). Data are mean  $\pm$  SEM,  $n = 5$  rats per group.

(C, E and F) c-Fos immunoreactive cells in the DVC of rats fed standard (C) or propionate-enriched diet, after treatment of the portal area with vehicle (E) or capsaicin (F).

(D) Quantification of c-Fos neurons in all areas of the DVC.

St, standard, Pr, propionate, Pr+C, propionate + capsaicin. AP, area postrema; NTS, nucleus of the solitary tract; dmNX, dorsal motor nucleus of the vagus. Scale bar, 200  $\mu$ m. Data are mean  $\pm$  SEM per hemisphere, on 4 to 6 sections per area,  $n = 3$  rats per group. \* $p < 0.05$  versus all groups (Kruskal-Wallis test followed by Dunn's post hoc test). See also Figure S3.

was observed in I-G6pc $^{-/-}$  mice (Figure 6G). We also observed a weak decrease in hepatic G6Pase activity ( $p = 0.07$ ) accompanied by dramatic increases in liver glucose-6-phosphate (G6P) and glycogen content in FOS-fed WT mice (Figures S5D–S5F), suggesting a suppression of hepatic glucose release. By contrast, FOS supplementation did not induce a change in the parameters of hepatic glucose release in I-G6pc $^{-/-}$  mice (Figures S5D–S5F). Again, there was a strong interaction between diet and genotype accounting for FOS feeding-induced changes in these parameters (e.g., 26.94% of total variance,  $p < 0.0001$  for liver G6P content). Taken together, these data strongly suggest that IGN plays a

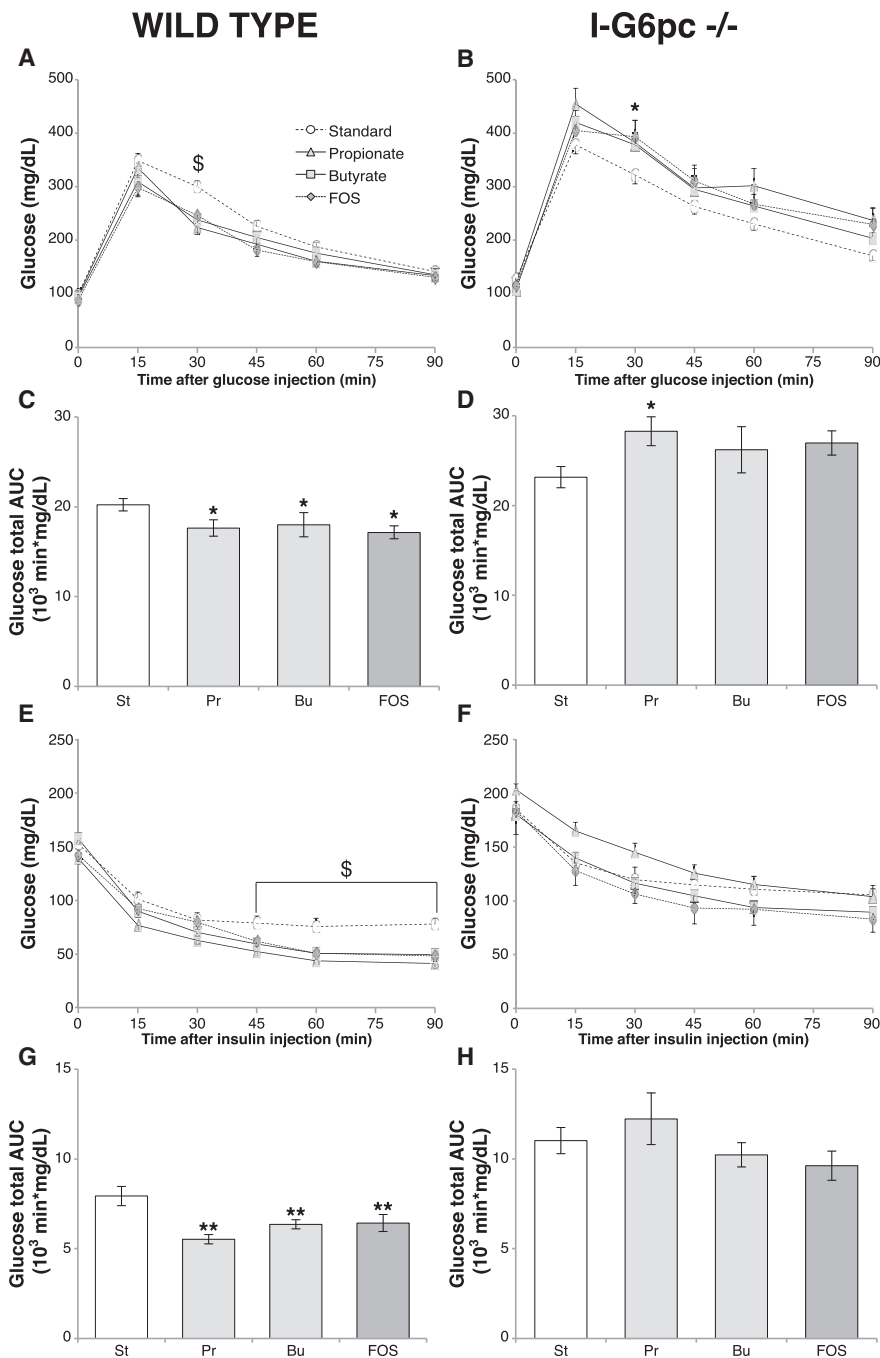
mandatory role in the beneficial metabolic effects of SCFA- and FOS-enriched diets.

**FOS Feeding Induces a Genotype-Independent Shift in the Microbiota Composition**

Diet is a major factor that drives gut microbiota composition and its fermentative capacity. To investigate how FOS supplementation of HF-HS diet affected the colonic microbial ecology in WT and I-G6pc $^{-/-}$  mice, we performed 454-based pyrosequencing. By estimating  $\beta$ -diversity between samples with pairwise unweighted Unifrac distance (Lozupone and Knight, 2005) and performing principal coordinates analysis, we found that







**Figure 5. SCFA- and FOS-Mediated Metabolic Improvements Are Absent in I-G6pc<sup>-/-</sup> Mice**

(A–D) Glucose tolerance tests were performed in 16-hr-fasted wild-type (A) or I-G6pc<sup>-/-</sup> (B) mice after 11 days on standard or butyrate-, propionate- or FOS-enriched diet. Blood glucose levels and total glucose area under the curve (AUC) (C and D) are shown.

(E–H) Insulin tolerance tests were performed on 6-hr-fasted wild-type (E) or I-G6pc<sup>-/-</sup> (F) mice after 13 days of indicated diet. Blood glucose levels and total glucose AUC (G and H) are shown. \$,  $p < 0.05$  standard versus all groups; \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$  versus standard (ANOVA followed by Dunnett's post hoc test). Data are mean  $\pm$  SEM,  $n = 6$  mice per group.

St, standard; Pr, propionate; Bu, butyrate; FOS, fructo-oligosaccharides. See also Figure S4.

only in I-G6pc<sup>-/-</sup> mice (Figure 7E), with a significant interaction between diet and genotype (two-way ANOVA,  $p = 0.0155$ ).

To assess the metabolic consequences of FOS incorporation in the diet, we measured total SCFA content in portal and peripheral blood from WT and I-G6pc<sup>-/-</sup> mice. As expected, total SCFA content was higher in portal blood after FOS supplementation, with diet accounting for almost 60% of the variance ( $p = 0.001$ , two-way ANOVA) and no influence of the mouse genotype ( $p = 0.66$ , two-way ANOVA) (Figure 7F). Butyrate proportions did not vary in any of the groups (Figure 7G). However, the contribution of propionate to the total content of SCFAs in portal blood increased with FOS supplementation in I-G6pc<sup>-/-</sup> mice but not in WT mice (Figure 7G); this result is consistent with the assumption that propionate is used as a substrate of gluconeogenesis in the gut of WT but not I-G6pc<sup>-/-</sup> mice. Notably, the abundance of Bacteroidetes positively correlated with the changes in portal blood propionate (Figure 7H,  $R^2 = 0.53$ ,  $p =$

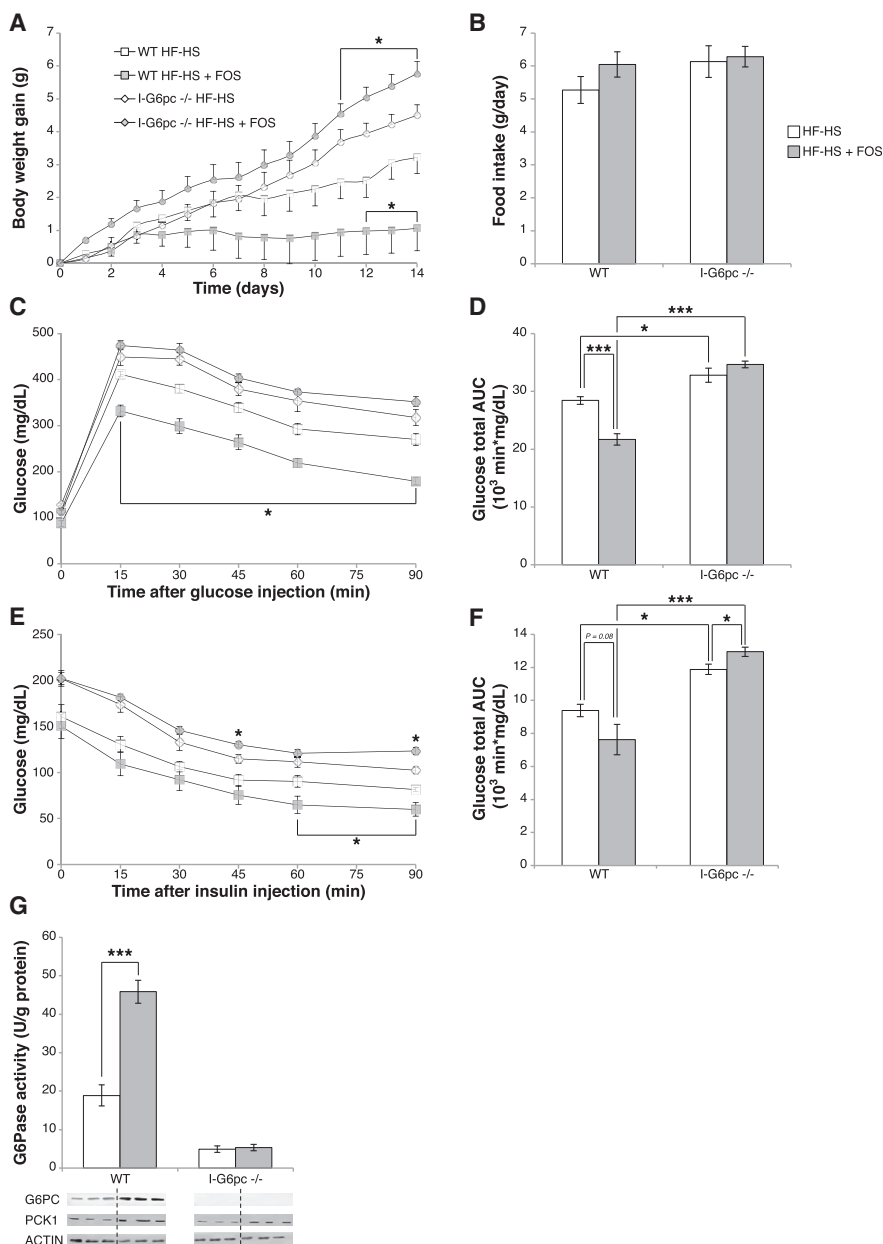
diet had a profound effect on the ecology in both genotypes (Figure 7A). The changes associated with diet (PC1, 41%) were preponderant compared to those associated with genotype (PC2, 11%). Firmicutes and Bacteroidetes were the most abundant phyla, representing more than 80% of the reads (Figure 7B). Diet had a major effect on the relative abundance of the main phyla in the colonic microbiota and FOS feeding was associated with a significant decrease in Firmicutes and increase in Bacteroidetes in both WT and I-G6pc<sup>-/-</sup> mice (Figures 7C and 7D). Actinobacteria abundance was significantly increased by FOS

0.0002). No significant variation of SCFA content was observed in peripheral blood (Figure S6), which is consistent with the fact that most SCFAs are metabolized by the liver (Cummings et al., 1987).

## DISCUSSION

Here we examined the metabolic activities of SCFAs and FOS, focusing particularly on IGN, a regulator of glucose and energy homeostasis (Mithieux et al., 2005; Troy et al., 2008). We found





**Figure 6. Effect of FOS Enrichment on Body Weight and Glucose Homeostasis in WT and I-G6pc<sup>-/-</sup> Mice Fed a HF-HS Diet**

(A) Evolution of body weight gain in mice fed high-fat/high-sucrose (HF-HS) or FOS-supplemented (HF-HS + FOS) diet.

(B) Mean food intake over 2 weeks.

(C–F) Glucose (C) and insulin (E) tolerance tests were performed 16 and 18 days after switching to indicated diets, respectively. Total glucose areas under the curve (AUC) (D and F) were calculated.

(G) Effect of FOS enrichment on intestinal G6Pase activity in wild-type and I-G6pc<sup>-/-</sup> mice fed a high-fat/high-sucrose diet. Immunoblotting was performed to confirm the deletion.

\* $p < 0.05$  (when not indicated versus HF-HS); \*\*\* $p < 0.001$ , two-way ANOVA followed by Bonferroni's post hoc test. Data are mean  $\pm$  SEM of  $n = 5$  to 6 mice per group. WT, wild-type mice. See also Figure S5.

via an increase in cAMP and not via FFAR2 (Figures 3A–3C). An FFAR2-independent butyrate-initiated intracellular increase of cAMP has been described earlier in enterocytes and shown to be driven by the increase in ATP that accompanies utilization of butyrate as a key energy substrate (Wang et al., 2012). In contrast, we show that propionate acts as an agonist of FFAR3 in the periportal afferent neural system to induce IGN via a gut-brain neural circuit. The brain targets of the portal propionate signal include the DVC, which receive inputs from the ventral vagus nerve, and the C1 segment of the spinal cord and the PBN, which transmit inputs from the dorsal sympathetic ganglions and the spinal pathway. Such a double neural transmission has been observed for portal signals initiated by protein-digests via the  $\mu$ -opioid receptors (Duraffourd et al., 2012). Thus, our data highlight the key role of the spinal pathway in nutrient

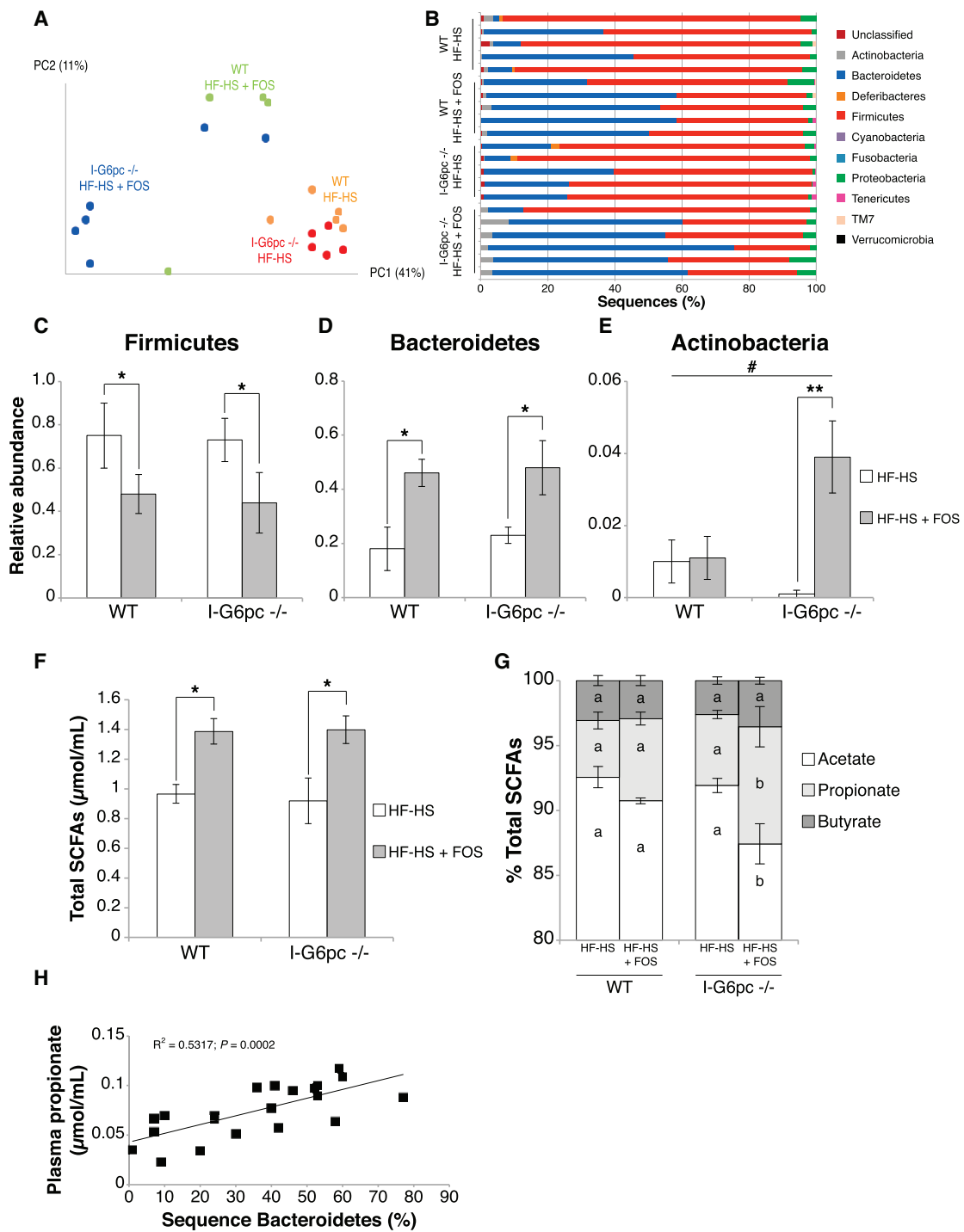
signaling to the brain in addition to the vagal pathway, which is often considered as preponderant (Mithieux, 2013).

Beneficial effects of dietary fiber and SCFAs have been described in several studies, all showing resistance to diet-induced obesity and increased energy expenditure (Cani et al., 2007; Gao et al., 2009; Lin et al., 2012; Neyrinck et al., 2012). Propionate has long been described as a hepatic gluconeogenic substrate (Anderson and Bridges, 1984). However, here we show that propionate is converted into glucose by IGN (i.e., in the intestine before it reaches the liver). This promotes metabolic benefits in energy homeostasis, illustrated here through decreased adiposity and body weight despite comparable food intake, and better glucose control, including a decrease

that SCFAs produced from microbial fermentation of polysaccharides improve various features of energy metabolism both in insulin-sensitive and insensitive states through stimulation of IGN. A major finding is that propionate can directly initiate a gut-brain neural circuit that has beneficial effects on host physiology.

SCFAs have been described as key signaling molecules, with activation of both FFAR2 and FFAR3 (preferentially activated by propionate) leading to modulation of host adiposity (Samuel et al., 2008) or GLP-1 secretion (Tolhurst et al., 2012). Here, we show that propionate and butyrate activate IGN genes using different and complementary processes. Our data suggest that butyrate directly activates IGN gene expression in enterocytes





**Figure 7. Effect of FOS-Enrichment on Colonic Microbiota Composition and Portal SCFAs in WT and I-G6pc<sup>-/-</sup> Mice Fed a HF-HS Diet**  
 (A) Principal coordinates analysis (PCoA) plot of unweighted UniFrac distances. Each dot represents a colonic community. The percentage of variation explained by each principal coordinate is shown in parentheses.  
 (B) Abundance plot of the most important phyla in each mouse.  
 (C–E) Relative abundance of phyla in the colonic microbiota.  
 (F and G). Total SCFA content in portal blood of mice fed regular high-fat/high-sucrose (HF-HS) or FOS-supplemented (HF-HS + FOS) diet (F) and SCFA proportions (G) in the portal blood of aforementioned mice.  
 (H) Bacteroidetes abundance positively correlates with the plasma propionate measured in the portal blood circulation.  
 \*p < 0.05; \*\*p < 0.01; # indicates statistical significance in the interaction between diet and mouse genotype; values with different letters differ significantly, two-way ANOVA followed by Bonferroni's post hoc test. Data are mean ± SEM of n = 5 to 6 mice per group. WT: Wild-type mice. See also Figure S6.



of hepatic glucose production, as described earlier (Mithieux et al., 2005; Troy et al., 2008). We directly confirmed the role of IGN in promoting the metabolic benefits of propionate by using I-G6pc<sup>-/-</sup> mice (i.e., mice that cannot convert propionate into glucose in the intestine), and show that metabolism is even slightly impaired by FOS feeding in these mice. We also show that FOS addition to a HF-HS diet increases the proportion of propionate in the total SCFA content in the portal blood of I-G6pc<sup>-/-</sup> mice. We thus propose that increased conversion of propionate into glucose by the liver contributes to the worsening of glucose tolerance in I-G6pc<sup>-/-</sup> mice.

Dietary fibers have been linked to marked alterations in the gut microbiota composition (Neyrinck et al., 2012). In addition, recent studies have shown a strong interaction between gut microbiota and host metabolism (El Aidy et al., 2013a, 2013b), including modulation of intestinal G6pc expression (Larsson et al., 2012, data available at <http://microbiota.wall.gu.se>). Here we show that the abundance of the two major phyla in the colonic microbiota is dramatically altered by FOS supplementation, regardless of the genetic background. FOS feeding increases the abundance of Bacteroidetes while decreasing the abundance of Firmicutes. Interestingly, the elevated levels of Bacteroidetes observed after FOS feeding strongly correlate with the increased levels of propionate in the plasma, confirming previous observations (Bindels et al., 2012). Although comparable changes in microbiota composition have been previously associated with beneficial effects for the host (Bindels et al., 2012; Roberfroid et al., 2010; Schwartz et al., 2010; Turnbaugh et al., 2006), our data show that these changes are not sufficient to induce improvements in glucose and energy homeostasis in the absence of IGN. We also show that FOS feeding strongly increases the abundance of Actinobacteria, but only in I-G6pc<sup>-/-</sup> mice in which the beneficial effects of SCFAs or FOS are not observed. To date, we have no explanation for the link between FOS feeding and Actinobacteria levels, but as this association was not observed in WT mice, it is unlikely to have a role in the benefits linked to FOS feeding.

In conclusion, we report a mechanism linking microbial degradation of dietary fiber into SCFAs and host nutrient sensing through induction of IGN. We show that IGN has a causal role in the metabolic benefits that have long been ascribed to fiber-enriched diets. This reveals a key mechanistic rationale by which SCFAs, and especially propionate, may positively influence host metabolism. Since both the beneficial effects of dietary fiber on glucose control (Mendeloff, 1977; Ray et al., 1983; Robertson et al., 2003, 2005) and IGN (Battezzati et al., 2004; Hayes et al., 2011; Mithieux, 2012) are known to be present in humans, these findings may open novel perspectives in the treatment as well as prevention of metabolic diseases.

## EXPERIMENTAL PROCEDURES

### Animals

Adult male Sprague-Dawley rats (Charles River), aged 6 to 8 weeks and weighing 275–300 g at the time of their arrival, were housed in a climate-controlled room (22 ± 2°C) subjected to a 12 hr light/dark cycle (7:00 AM–7:00 PM), with free access to water and food. Mice were housed under similar conditions. I-G6pc<sup>-/-</sup> mice were generated as described previously (Penhoat et al., 2011), and experiments were performed 5 weeks after gene deletion.

Sodium propionate, sodium butyrate (Sigma) or FOS (Orafti P95, kindly donated by Beneo) was incorporated into the diet at 5% wt/wt (SCFAs) or 10% wt/wt (FOS). Standard diet was SAFE A04 (Augis, France) and HF-HS diet was prepared at Unité de Préparation des Aliments Expérimentaux (INRA Jouy-en-Josas, France; see also Table S1). Prior to diet change, animals were fed standard diet and groups were designed to match food intake and body weight.

### Glucose and Insulin Tolerance Tests

After 10 to 14 days of special or standard diet, animals were fasted for 16 (GTT) or 6 hr (ITT) and then received an injection of glucose (1 g/kg b.w., i.p.) or insulin (0.5 U/kg b.w., Insulatard, Novo Nordisk). Blood glucose was monitored for 90 min using a glucometer (Accu-Check, Roche) on samples collected from the tip of the tail vein. Insulin was quantified using an ELISA kit (Merckodia).

### Tissue Sampling

Rats were fasted for 6 hr and were then euthanized by pentobarbital injection (100 mg/kg b.w., i.p.). The intestine and liver were sampled as described previously (Mithieux et al., 2004a). G6Pase activity was assayed under maximal velocity conditions. Western blot was performed using antibodies described in Table S2, using  $\beta$ -actin as a housekeeping gene. All procedures were described in detail previously (Mithieux et al., 2004a; Rajas et al., 1999).

### Surgical Procedures

Rats were anesthetized with 2% isoflurane. Portal catheter implantation was performed as described earlier (Duraffourd et al., 2012). For portal denervation, a gauze compress moistened with either a capsaicin (10 mg/ml in saline, DMSO and Tween at a ratio of 8:1:1) or a vehicle solution was applied around the portal vein for denervation. Sodium propionate and  $\beta$ -hydroxybutyrate (Sigma) were dissolved in saline and perfused at a rate of 2.5  $\mu$ mol/min for 6 hr in fasted rats. Rats were allowed to recover for 1 week, with free access to food and water. A marbocyl/ketofen solution was injected each day to prevent coagulation, infection, and pain.

### Determination of Intestinal Glucose Fluxes

After a 6 hr fast, rats were anesthetized with 2% isoflurane and fitted with polyethylene catheters inserted into the right jugular vein for [ $^3$ - $^3$ H] glucose (Perkin-Elmer) infusion and the left carotid artery for blood sampling. For propionate incorporation studies, rats were fasted for 24 hr to enhance IGN (Mithieux et al., 2004b) and fitted with catheters as described above. [ $^1$ - $^{14}$ C] Propionic acid sodium salt (Hartmann Analytic) was infused for 90 min. Sampling and calculations are described in detail by Croset et al. (2001).

### Immunofluorescence

Immunofluorescence was performed as described by Duraffourd et al. (2012), with prior incubation of slides in citrate buffer at 95°C for 40 min for antigen retrieval.

See also Table S1.

### c-Fos Labeling

Brain sampling, labeling, and counting are described in detail by Duraffourd et al. (2012).

### Sample Collection for Microbial and SCFA Analysis

Mice were fasted for 6 hr and euthanized by cervical dislocation. Blood samples were collected from the portal vein and via intracardiac puncture. The intestine (including the colon) and liver were sampled and immediately put in liquid nitrogen. For plasma analysis, blood samples were centrifuged and plasma collected and stored at -80°C before the assay.

### SCFA Assay

SCFAs were measured in 50  $\mu$ l of plasma samples after acidification and extraction into diethyl ether by gas chromatograph coupled with mass spectrometer detector (7890A and 5975C, Agilent Technologies). A mix of 1 M [ $^1$ - $^{13}$ C] acetate, 0.2 M [ $^6$ - $^2$ H] propionate, and 0.2 M [ $^4$ - $^{13}$ C] butyrate was added as internal standard. Prior to injection, the samples were derivatized with *N*-tert-butyltrimethylsilyl-*N*-methyltrifluoroacetamide (MTBSTFA; Sigma) at





room temperature. Quantitation of the measured metabolites was completed in selected ion monitoring acquisition mode by comparison to labeled internal standards. The *m/z* ratios of monitored ions were as follows: 117 (acetic acid), 131 (propionic acid), 145 (butyric acid), 121 ([1-<sup>13</sup>C]-acetate), 136 ([6-<sup>2</sup>H] propionate), and 149 ([4-<sup>13</sup>C] butyrate).

#### Genomic DNA Purification, 16S rRNA Gene Amplification, and Sequence Analyses

After isolation of genomic DNA from colon segments (repeated bead-beating method, Salonen et al., 2010), the V1-V2 region of bacterial 16S rRNA gene was amplified using the 27F and 338R primers fused with 454 Titanium sequencing adapters. Three independent 25  $\mu$ l PCR reactions were performed for each sample using 1.5 U of FastStart Taq DNA Polymerase (Roche) and PCR was performed at conditions: one cycle of 3 min at 95°C, 25 cycles: 20 s at 95°C, 30 s at 52°C, and 60 s at 72°C, and 10 min at 72°C. The resulting product was checked for size and purity on 0.8% Agarose-GelRed gel, further purified (NucleoSpin 740609, Macherey-Nagel, Germany), and quantified with the Quant-iT PicoGreen dsDNA kit (Invitrogen, Carlsbad, CA). All samples were pooled in equal amounts (20 ng/ $\mu$ l) and purified again with magnetic beads (AMPure XP, Beckman, Danvers, MA) to remove short amplification products. The purified pooled products were sequenced (Roche 454 GS-FLX system, Titanium chemistry, by GATC, Konstanz, Germany). 454 reads were denoised using the denoiser\_preprocess.py and denoiser.py, tools available in QIIME and sequences were further analyzed as described in detail by Larsson et al. (2012). We retained 111,693 sequences for 21 mouse colon samples with an average of 5,320 sequences per sample (2,892 to 8,810 sequences). One of the colonic samples from a WT mouse on FOS diet contained a very low number of sequences (1,982 before denoising and 930 after); this sample was not included in the  $\beta$ -diversity analysis, but was included in all other analyses.

#### Cell Culture

Caco-2 cells were purchased from ECACC and cultured as suggested by the supplier. The cells were seeded into 6-well plates at 10<sup>6</sup> cells/well and cultured at confluence at 37°C for 3 weeks. After that time, the culture medium was changed to Krebs-Ringer buffer with 1 mM sodium propionate, 1 mM tiglic acid, 1 mM 1-methylcyclopropanecarboxylic acid, or 1 mM sodium butyrate (Sigma) alone or in conjunction with 0.2  $\mu$ g/ml pertussis toxin or 10  $\mu$ M U73122 (Tocris). 24 hr later, cells were lysed for molecular analysis.

#### cAMP Assay

cAMP in the lysates was quantified by a direct cAMP enzyme immunoassay kit according to the manufacturer's instructions (ENZO Life Sciences ADI-900-163). Protein concentrations of the lysates were determined using traditional Bradford assay. The concentration of cAMP was normalized to that of protein in the same lysates. A medium containing 10  $\mu$ M forskolin was used as a positive control.

#### Quantitative RT-PCR

Total RNA was extracted from frozen tissues and cells using Trizol reagent (Invitrogen), according to the manufacturer's instructions. Fast-Start SYBR Green PCR reagents (Roche) were used to determine mRNA levels. Ribosomal protein L19 (*RPL19*) was used as a housekeeping gene. Calculations were made based on the comparative cycle threshold method (2<sup>- $\Delta\Delta$ C<sub>t</sub></sup>). Primer sequences are given in Table S3.

#### Statistical Analyses

All data are presented as mean  $\pm$  SEM. Two-group comparisons were analyzed using paired or unpaired t test. Groups were compared using one-way ANOVA followed by Tukey's (against all groups) and Dunnett's post hoc tests (against a control group). Two-way ANOVA followed by Bonferroni's post hoc test was used in experiments using I-G6pc<sup>-/-</sup> mice. The nonparametric Kruskal-Wallis test followed by Dunn's post hoc test was used for c-Fos neuron counting. *p* < 0.05 was considered as statistically significant.

#### SUPPLEMENTAL INFORMATION

Supplemental Information includes six figures and three tables and can be found with this article online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2013.12.016>.

#### ACKNOWLEDGMENTS

All protocols in this work were performed according to the recommendations of our local animal ethics committee for animal experimentation, which gave its authorization. Chantal Watrin and Jérôme Honnorat (ONCOFLAM, INSERM U1028, CNRS UMR5292, Lyon) are acknowledged for valuable help regarding c-Fos studies. Rosie Perkins (University of Gothenburg) is greatly acknowledged for editing the paper. The authors thank the INSERM, the Fondation Louis Bonduelle (F.D.V.) and the Torsten Söderberg and the Knut and Alice Wallenberg foundation (F.B.) for funding their work and the CNRS (G.M.), INSERM (C.Z., A.D.) for funding their positions. The authors also thank the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche (F.D.V., D.G., J.V.) for funding their positions as PhD students. F.B. is cofounder and shareholder in Metabogen AB.

Received: July 16, 2013

Revised: October 15, 2013

Accepted: December 11, 2013

Published: January 9, 2014

#### REFERENCES

- Anderson, J.W., and Bridges, S.R. (1984). Short-chain fatty acid fermentation products of plant fiber affect glucose metabolism of isolated rat hepatocytes. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 177, 372–376.
- Battezzati, A., Caumo, A., Martino, F., Sereni, L.P., Coppa, J., Romito, R., Ammatuna, M., Regalia, E., Matthews, D.E., Mazzaferro, V., and Luzi, L. (2004). Nonhepatic glucose production in humans. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 286, E129–E135.
- Berthoud, H.-R. (2004). Anatomy and function of sensory hepatic nerves. *Anat. Rec. A Discov. Mol. Cell. Evol. Biol.* 280, 827–835.
- Bindels, L.B., Porporato, P., Dewulf, E.M., Verrax, J., Neyrinck, A.M., Martin, J.C., Scott, K.P., Buc Calderon, P., Feron, O., Muccioli, G.G., et al. (2012). Gut microbiota-derived propionate reduces cancer cell proliferation in the liver. *Br. J. Cancer* 107, 1337–1344.
- Brown, A.J., Goldsworthy, S.M., Barnes, A.A., Eilert, M.M., Tcheang, L., Daniels, D., Muir, A.I., Wigglesworth, M.J., Kinghorn, I., Fraser, N.J., et al. (2003). The Orphan G protein-coupled receptors GPR41 and GPR43 are activated by propionate and other short chain carboxylic acids. *J. Biol. Chem.* 278, 11312–11319.
- Cani, P.D., Neyrinck, A.M., Fava, F., Knauf, C., Burcelin, R.G., Tuohy, K.M., Gibson, G.R., and Delzenne, N.M. (2007). Selective increases of bifidobacteria in gut microflora improve high-fat-diet-induced diabetes in mice through a mechanism associated with endotoxaemia. *Diabetologia* 50, 2374–2383.
- Clore, J.N., Stillman, J., and Sugerman, H. (2000). Glucose-6-phosphatase flux in vitro is increased in type 2 diabetes. *Diabetes* 49, 969–974.
- Croset, M., Rajas, F., Zitoun, C., Hurot, J.M., Montano, S., and Mithieux, G. (2001). Rat small intestine is an insulin-sensitive gluconeogenic organ. *Diabetes* 50, 740–746.
- Cummings, J.H., Pomare, E.W., Branch, W.J., Naylor, C.P., and Macfarlane, G.T. (1987). Short chain fatty acids in human large intestine, portal, hepatic and venous blood. *Gut* 28, 1221–1227.
- Delaere, F., Duchamp, A., Mounien, L., Seyer, P., Duraffourd, C., Zitoun, C., Thorens, B., and Mithieux, G. (2012). The role of sodium-coupled glucose co-transporter 3 in the satiety effect of portal glucose sensing. *Mol. Metab.* 2, 47–53.
- Donohoe, D.R., Garge, N., Zhang, X., Sun, W., O'Connell, T.M., Bunker, M.K., and Bultman, S.J. (2011). The microbiome and butyrate regulate energy metabolism and autophagy in the mammalian colon. *Cell Metab.* 13, 517–526.



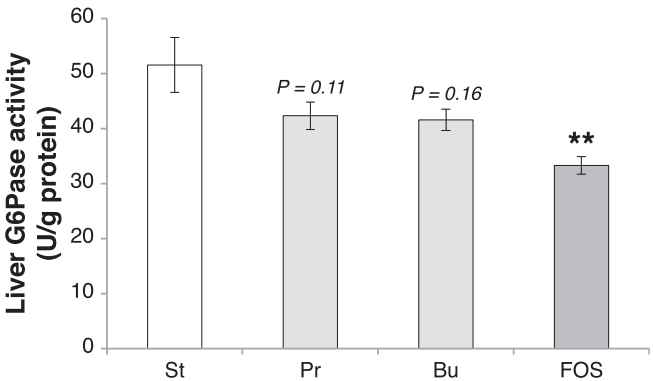
- Duraffourd, C., De Vadder, F., Goncalves, D., Delaere, F., Penhoat, A., Brusset, B., Rajas, F., Chassard, D., Duchamp, A., Stefanutti, A., et al. (2012). Mu-opioid receptors and dietary protein stimulate a gut-brain neural circuitry limiting food intake. *Cell* 150, 377–388.
- El Aidy, S., Derrien, M., Merrifield, C.A., Levenez, F., Doré, J., Boekschoten, M.V., Dekker, J., Holmes, E., Zoetendal, E.G., van Baarlen, P., et al. (2013a). Gut bacteria-host metabolic interplay during conventionalisation of the mouse germfree colon. *ISME J.* 7, 743–755.
- El Aidy, S., Merrifield, C.A., Derrien, M., van Baarlen, P., Hooiveld, G., Levenez, F., Doré, J., Dekker, J., Holmes, E., Claus, S.P., et al. (2013b). The gut microbiota elicits a profound metabolic reorientation in the mouse jejunal mucosa during conventionalisation. *Gut* 62, 1306–1314.
- Flint, H.J., Scott, K.P., Louis, P., and Duncan, S.H. (2012). The role of the gut microbiota in nutrition and health. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 9, 577–589.
- Gao, Z., Yin, J., Zhang, J., Ward, R.E., Martin, R.J., Lefevre, M., Cefalu, W.T., and Ye, J. (2009). Butyrate improves insulin sensitivity and increases energy expenditure in mice. *Diabetes* 58, 1509–1517.
- Gautier-Stein, A., Zitoun, C., Lalli, E., Mithieux, G., and Rajas, F. (2006). Transcriptional regulation of the glucose-6-phosphatase gene by cAMP/vasoactive intestinal peptide in the intestine. Role of HNF4alpha, CREM, HNF1alpha, and C/EBPalpha. *J. Biol. Chem.* 281, 31268–31278.
- Hayes, M.T., Foo, J., Besic, V., Tychinskaya, Y., and Stubbs, R.S. (2011). Is intestinal gluconeogenesis a key factor in the early changes in glucose homeostasis following gastric bypass? *Obes. Surg.* 21, 759–762.
- Hidalgo, I.J., Raub, T.J., and Borchardt, R.T. (1989). Characterization of the human colon carcinoma cell line (Caco-2) as a model system for intestinal epithelial permeability. *Gastroenterology* 96, 736–749.
- Hildebrandt, M.A., Hoffmann, C., Sherrill-Mix, S.A., Keilbaugh, S.A., Hamady, M., Chen, Y.-Y., Knight, R., Ahima, R.S., Bushman, F., and Wu, G.D. (2009). High-fat diet determines the composition of the murine gut microbiome independently of obesity. *Gastroenterology* 137, 1716–1724, e1–e2.
- Karlsson, F.H., Tremaroli, V., Nookaew, I., Bergström, G., Behre, C.J., Fagerberg, B., Nielsen, J., and Bäckhed, F. (2013). Gut metagenome in European women with normal, impaired and diabetic glucose control. *Nature* 498, 99–103.
- Kimura, I., Inoue, D., Maeda, T., Hara, T., Ichimura, A., Miyauchi, S., Kobayashi, M., Hirasawa, A., and Tsujimoto, G. (2011). Short-chain fatty acids and ketones directly regulate sympathetic nervous system via G protein-coupled receptor 41 (GPR41). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 108, 8030–8035.
- Larsson, E., Tremaroli, V., Lee, Y.S., Koren, O., Nookaew, I., Fricker, A., Nielsen, J., Ley, R.E., and Bäckhed, F. (2012). Analysis of gut microbial regulation of host gene expression along the length of the gut and regulation of gut microbial ecology through MyD88. *Gut* 61, 1124–1131.
- Layden, B.T., Angeira, A.R., Brodsky, M., Durai, V., and Lowe, W.L., Jr. (2013). Short chain fatty acids and their receptors: new metabolic targets. *Transl. Res.* 161, 131–140.
- Lin, H.V., Frassetto, A., Kowalik, E.J., Jr., Nawrocki, A.R., Lu, M.M., Kosinski, J.R., Hubert, J.A., Szeto, D., Yao, X., Forrest, G., and Marsh, D.J. (2012). Butyrate and propionate protect against diet-induced obesity and regulate gut hormones via free fatty acid receptor 3-independent mechanisms. *PLoS ONE* 7, e35240.
- Lozupone, C., and Knight, R. (2005). UniFrac: a new phylogenetic method for comparing microbial communities. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 8228–8235.
- Magnusson, I., Rothman, D.L., Katz, L.D., Shulman, R.G., and Shulman, G.I. (1992). Increased rate of gluconeogenesis in type II diabetes mellitus. A <sup>13</sup>C nuclear magnetic resonance study. *J. Clin. Invest.* 90, 1323–1327.
- Mendeloff, A.I. (1977). Dietary fiber and human health. *N. Engl. J. Med.* 297, 811–814.
- Mithieux, G. (2012). Comment about intestinal gluconeogenesis after gastric bypass in human in relation with the paper by Hayes et al., *Obes. Surg.* 2011. *Obes. Surg.* 22, 1920–1922, author reply 1923–1924.
- Mithieux, G. (2013). Nutrient control of hunger by extrinsic gastrointestinal neurons. *Trends Endocrinol. Metab.* 24, 378–384.
- Mithieux, G., Bady, I., Gautier, A., Crosset, M., Rajas, F., and Zitoun, C. (2004a). Induction of control genes in intestinal gluconeogenesis is sequential during fasting and maximal in diabetes. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 286, E370–E375.
- Mithieux, G., Rajas, F., and Gautier-Stein, A. (2004b). A novel role for glucose 6-phosphatase in the small intestine in the control of glucose homeostasis. *J. Biol. Chem.* 279, 44231–44234.
- Mithieux, G., Misery, P., Magnan, C., Pillot, B., Gautier-Stein, A., Bernard, C., Rajas, F., and Zitoun, C. (2005). Portal sensing of intestinal gluconeogenesis is a mechanistic link in the diminution of food intake induced by diet protein. *Cell Metab.* 2, 321–329.
- Mutel, E., Gautier-Stein, A., Abdul-Wahed, A., Amigó-Correig, M., Zitoun, C., Stefanutti, A., Houberdon, I., Tourette, J.-A., Mithieux, G., and Rajas, F. (2011). Control of blood glucose in the absence of hepatic glucose production during prolonged fasting in mice: induction of renal and intestinal gluconeogenesis by glucagon. *Diabetes* 60, 3121–3131.
- Neyrinck, A.M., Possemiers, S., Verstraete, W., De Backer, F., Cani, P.D., and Delzenne, N.M. (2012). Dietary modulation of clostridial cluster XIVa gut bacteria (*Roseburia* spp.) by chitin-glucan fiber improves host metabolic alterations induced by high-fat diet in mice. *J. Nutr. Biochem.* 23, 51–59.
- Nøhr, M.K., Pedersen, M.H., Gille, A., Egerod, K.L., Engelstoft, M.S., Husted, A.S., Sichlau, R.M., Grunddal, K.V., Poulsen, S.S., Han, S., et al. (2013). GPR41/FFAR3 and GPR43/FFAR2 as cosensors for short-chain fatty acids in enteroendocrine cells vs FFAR3 in enteric neurons and FFAR2 in enteric leukocytes. *Endocrinology* 154, 3552–3564.
- Parks, B.W., Nam, E., Org, E., Kostem, E., Norheim, F., Hui, S.T., Pan, C., Civelek, M., Rau, C.D., Bennett, B.J., et al. (2013). Genetic control of obesity and gut microbiota composition in response to high-fat, high-sucrose diet in mice. *Cell Metab.* 17, 141–152.
- Penhoat, A., Mutel, E., Amigo-Correig, M., Pillot, B., Stefanutti, A., Rajas, F., and Mithieux, G. (2011). Protein-induced satiety is abolished in the absence of intestinal gluconeogenesis. *Physiol. Behav.* 105, 89–93.
- Pillot, B., Soty, M., Gautier-Stein, A., Zitoun, C., and Mithieux, G. (2009). Protein feeding promotes redistribution of endogenous glucose production to the kidney and potentiates its suppression by insulin. *Endocrinology* 150, 616–624.
- Rajas, F., Bruni, N., Montano, S., Zitoun, C., and Mithieux, G. (1999). The glucose-6 phosphatase gene is expressed in human and rat small intestine: regulation of expression in fasted and diabetic rats. *Gastroenterology* 117, 132–139.
- Ray, T.K., Mansell, K.M., Knight, L.C., Malmud, L.S., Owen, O.E., and Boden, G. (1983). Long-term effects of dietary fiber on glucose tolerance and gastric emptying in noninsulin-dependent diabetic patients. *Am. J. Clin. Nutr.* 37, 376–381.
- Roberfroid, M., Gibson, G.R., Hoyle, L., McCartney, A.L., Rastall, R., Rowland, I., Wolvers, D., Watzl, B., Szajewska, H., Stahl, B., et al. (2010). Prebiotic effects: metabolic and health benefits. *Br. J. Nutr.* 104 (Suppl 2), S1–S63.
- Robertson, M.D., Currie, J.M., Morgan, L.M., Jewell, D.P., and Frayn, K.N. (2003). Prior short-term consumption of resistant starch enhances postprandial insulin sensitivity in healthy subjects. *Diabetologia* 46, 659–665.
- Robertson, M.D., Bickerton, A.S., Dennis, A.L., Vidal, H., and Frayn, K.N. (2005). Insulin-sensitizing effects of dietary resistant starch and effects on skeletal muscle and adipose tissue metabolism. *Am. J. Clin. Nutr.* 82, 559–567.
- Sagar, S.M., Sharp, F.R., and Curran, T. (1988). Expression of c-fos protein in brain: metabolic mapping at the cellular level. *Science* 240, 1328–1331.
- Salonen, A., Nikkilä, J., Jalanka-Tuovinen, J., Immonen, O., Rajčić-Stojanović, M., Kekkonen, R.A., Palva, A., and de Vos, W.M. (2010). Comparative analysis of fecal DNA extraction methods with phylogenetic microarray: effective recovery of bacterial and archaeal DNA using mechanical cell lysis. *J. Microbiol. Methods* 81, 127–134.
- Samuel, B.S., Shaito, A., Motoike, T., Rey, F.E., Bäckhed, F., Manchester, J.K., Hammer, R.E., Williams, S.C., Crowley, J., Yanagisawa, M., and Gordon, J.I. (2008). Effects of the gut microbiota on host adiposity are modulated by the



- short-chain fatty-acid binding G protein-coupled receptor, Gpr41. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *105*, 16767–16772.
- Schmidt, J., Smith, N.J., Christiansen, E., Tikhonova, I.G., Grundmann, M., Hudson, B.D., Ward, R.J., Drewke, C., Milligan, G., Kostenis, E., and Ulven, T. (2011). Selective orthosteric free fatty acid receptor 2 (FFA2) agonists: identification of the structural and chemical requirements for selective activation of FFA2 versus FFA3. *J. Biol. Chem.* *286*, 10628–10640.
- Schwartz, A., Taras, D., Schäfer, K., Beijer, S., Bos, N.A., Donus, C., and Hardt, P.D. (2010). Microbiota and SCFA in lean and overweight healthy subjects. *Obesity (Silver Spring)* *18*, 190–195.
- Tolhurst, G., Heffron, H., Lam, Y.S., Parker, H.E., Habib, A.M., Diakogiannaki, E., Cameron, J., Grosse, J., Reimann, F., and Gribble, F.M. (2012). Short-chain fatty acids stimulate glucagon-like peptide-1 secretion via the G-protein-coupled receptor FFAR2. *Diabetes* *61*, 364–371.
- Troy, S., Soty, M., Ribeiro, L., Laval, L., Migrenne, S., Fioramonti, X., Pillot, B., Fauveau, V., Aubert, R., Viollet, B., et al. (2008). Intestinal gluconeogenesis is a key factor for early metabolic changes after gastric bypass but not after gastric lap-band in mice. *Cell Metab.* *8*, 201–211.
- Turnbaugh, P.J., Ley, R.E., Mahowald, M.A., Magrini, V., Mardis, E.R., and Gordon, J.I. (2006). An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature* *444*, 1027–1031.
- Turnbaugh, P.J., Bäckhed, F., Fulton, L., and Gordon, J.I. (2008). Diet-induced obesity is linked to marked but reversible alterations in the mouse distal gut microbiome. *Cell Host Microbe* *3*, 213–223.
- Turnbaugh, P.J., Hamady, M., Yatsunenko, T., Cantarel, B.L., Duncan, A., Ley, R.E., Sogin, M.L., Jones, W.J., Roe, B.A., Affourtit, J.P., et al. (2009a). A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature* *457*, 480–484.
- Turnbaugh, P.J., Ridaura, V.K., Faith, J.J., Rey, F.E., Knight, R., and Gordon, J.I. (2009b). The effect of diet on the human gut microbiome: a metagenomic analysis in humanized gnotobiotic mice. *Sci. Transl. Med.* *1*, ra14.
- Wang, A., Si, H., Liu, D., and Jiang, H. (2012). Butyrate activates the cAMP-protein kinase A-cAMP response element-binding protein signaling pathway in Caco-2 cells. *J. Nutr.* *142*, 1–6.



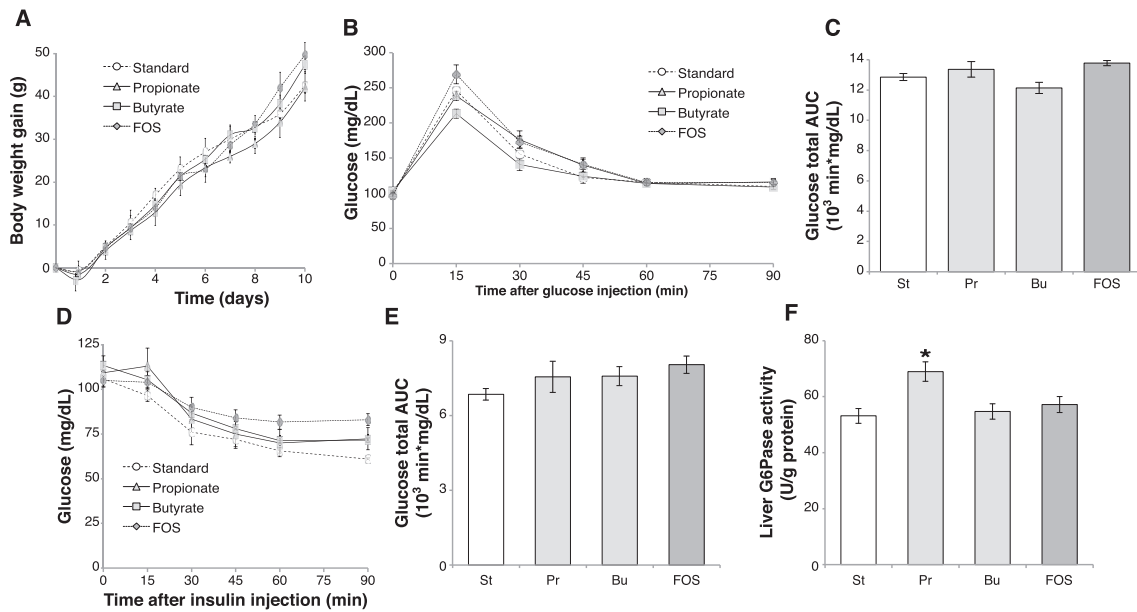
# Supplemental Information



**Figure S1. Effect of SCFA- or FOS-Enriched Diets on Liver Glucose-6 Phosphatase Activity, Related to Figure 1**  
 Liver G6Pase activity of rats fed standard or propionate-, butyrate- or FOS-enriched diets. \*\* $p < 0.01$  versus standard (ANOVA followed by Dunnett's post hoc test). Data are mean  $\pm$  SEM,  $n = 6$  rats per group. St: standard; Pr: propionate; Bu: butyrate; FOS: fructo-oligosaccharides.







**Figure S2. Importance of Periportal Nervous System in SCFA- and FOS-Mediated Metabolic Effects, Related to Figure 3**

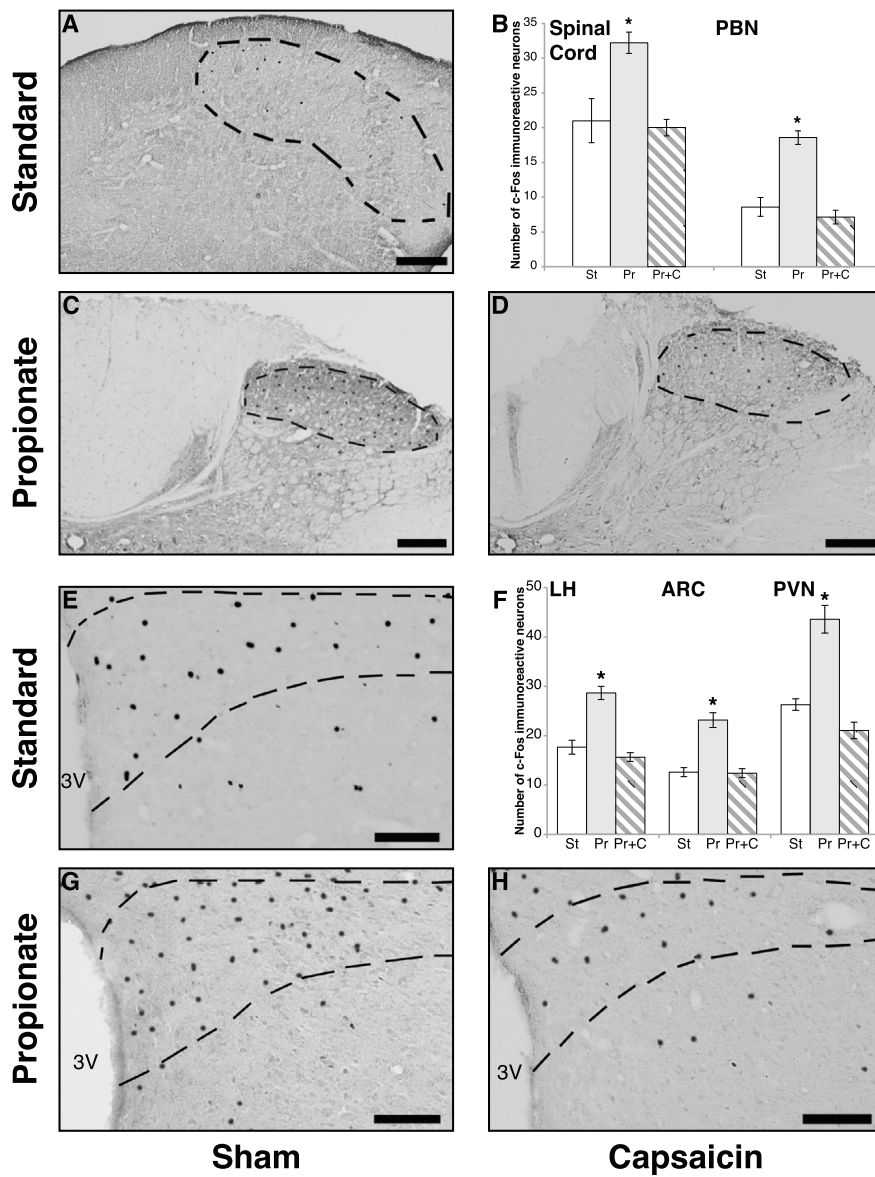
(A) Evolution of body weight gain of rats fed standard or butyrate-, propionate- or FOS-enriched diet, after portal denervation with capsaicin.

(B–E) Glucose (B) and insulin (D) tolerance tests were performed in capsaicin-treated rats fed standard or propionate-, butyrate- or FOS-enriched diets. Blood glucose levels and total glucose area under the curve (AUC) (C and E) are shown.

(F) Liver G6Pase activity was analyzed in capsaicin-treated animals fed the aforementioned diets. \* $p < 0.05$  versus standard (ANOVA followed by Dunnett's post hoc test). Data are mean  $\pm$  SEM,  $n = 6$  rats per group.

St: standard; Pr: propionate; Bu: butyrate; FOS: fructo-oligosaccharides.





**Figure S3. Effect of Propionate Feeding on c-Fos Expression in the Spinal Cord and Hypothalamus of Rats, Related to Figure 4**

(A, C, and D) c-Fos immunoreactive cells in the C1 segment of the spinal cord of rats fed standard (A) or propionate-enriched diet, after treatment of the portal area with vehicle (C) or capsaicin (D).

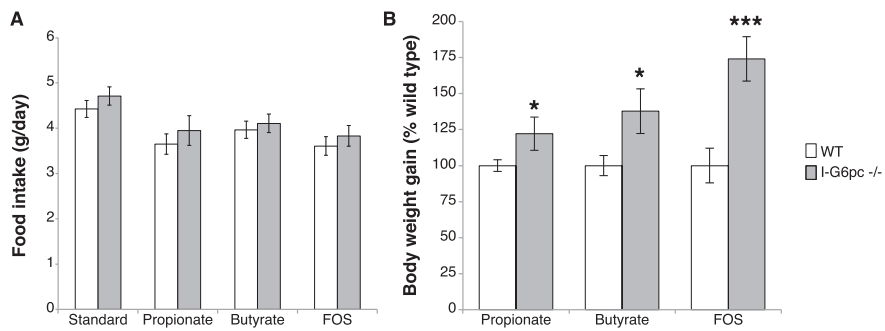
(B) Quantification of c-Fos neurons in the spinal cord and the parabrachial nucleus (PBN): standard (white bar), propionate (gray bar) or propionate + capsaicin treatment (dashed bar).

(E, G and H) c-Fos immunoreactive cells in the paraventricular nucleus of the hypothalamus (PVN) of rats fed standard (E) or propionate-enriched diet, after treatment of the portal area with vehicle (G) or capsaicin (H).

(F) Quantification of c-Fos neurons in selected areas of the hypothalamus: standard (white bar), propionate (gray bar) or propionate + capsaicin treatment (dashed bar).

Data are mean ± SEM per hemisphere, on 4 to 6 sections per area, n = 3 rats per group. \*p < 0.05 versus all groups (Kruskal-Wallis test followed by Dunn's post hoc test). Scale bar, 200 μm. LH, lateral hypothalamus; ARC, arcuate nucleus; PVN, paraventricular nucleus; 3V, third ventricle.





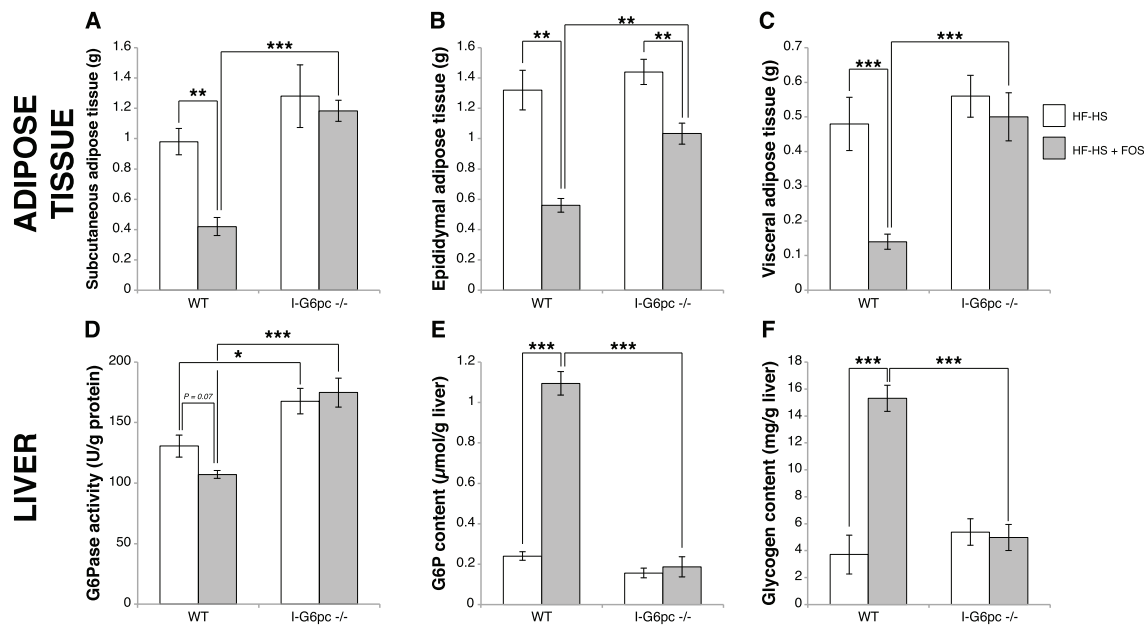
**Figure S4. Effect of SCFA and FOS Feeding on Food Intake and Body Weight in Wild-Type and I-G6pc<sup>-/-</sup> Mice, Related to Figure 5**

(A) Food intake was monitored daily for 10 days in mice fed a standard or a propionate-, butyrate- or FOS-enriched diet.

(B) Relative changes in body weight after two weeks of propionate-, butyrate- or FOS-enriched diet.

\* $p < 0.05$ ; \*\*\* $p < 0.001$ , Student's two tailed t test for unpaired data. Data are mean  $\pm$  SEM,  $n = 6$  mice per group. WT, wild-type mice.





**Figure S5. Effect of FOS Supplementation on Hepatic Glucose Production and Adiposity in Wild-Type and I-G6pc<sup>-/-</sup> Mice Fed a High Fat/High Sucrose Diet, Related to Figure 6**

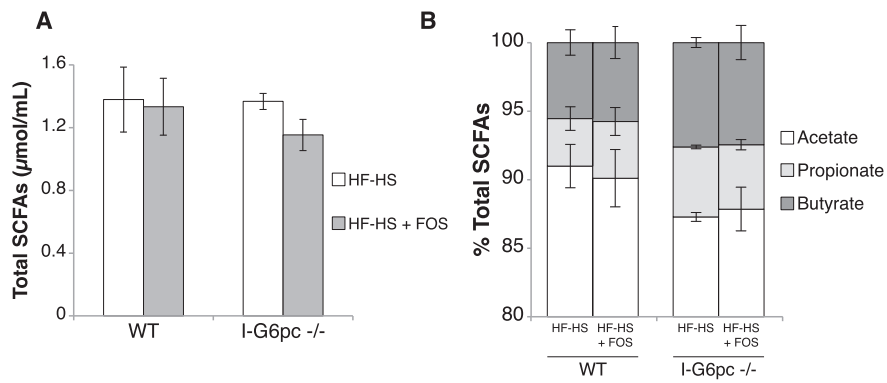
(A–C) Effect of FOS supplementation on subcutaneous (A), epididymal (B) and visceral (C) fat weights in wild-type and I-G6pc<sup>-/-</sup> mice fed a high-fat/high-sucrose diet.

(D–F) Effect of FOS supplementation on liver G6Pase activity (D) and G6P (E) and glycogen (F) contents in wild-type and I-G6pc<sup>-/-</sup> mice fed a high-fat/high-sucrose diet.

\*p < 0.05; \*\*p < 0.01; \*\*\*p < 0.001, two-way ANOVA followed by Bonferroni's post hoc test. Data are mean  $\pm$  SEM of n = 5 to 6 mice per group. WT, Wild-type mice.







**Figure S6. Effect of FOS Supplementation on Systemic SCFAs in Wild-Type and I-G6pc<sup>-/-</sup> Mice Fed a High Fat/High Sucrose Diet, Related to Figure 7**

(A) Total SCFA content in peripheral blood of mice fed regular high-fat/high-sucrose (HF-HS) or FOS-supplemented (HF-HS + FOS) diet.

(B) SCFA proportions in the peripheral blood of aforementioned mice.

Data are mean  $\pm$  SEM of n = 5 to 6 mice per group.



**De Vadder, F., Plessier, F., Gautier-Stein, A. et Mithieux, G. Vasoactive intestinal peptide is a local mediator in a gut-brain neural axis activating intestinal gluconeogenesis.**



L'axe intestin-cerveau joue un rôle critique dans la régulation de l'homéostasie métabolique. La NGI est une fonction physiologique qui induit une diminution de la sensation de faim et une augmentation de la sensibilité périphérique à l'insuline, et qui diminue la production hépatique de glucose (Mithieux et al., 2009). La NGI est décrite chez l'Homme, spécialement après un by-pass gastrique ou lors de la phase anhépatique de transplantation hépatique (Mithieux, 2013). La NGI est activée lors des régimes riches en protéines (Duraffourd et al., 2012; Mithieux et al., 2005) ou en fibres solubles (De Vadder et al., 2014).

Spécifiquement, dans le cas des régimes riches en fibres, le propionate produit par la fermentation bactérienne se lie au récepteur FFAR3 dans les terminaisons nerveuses de la veine porte. Ceci conduit à l'activation d'un arc réflexe intestin-cerveau, aboutissant à terme à l'induction des gènes de la NGI (G6Pase et PEPCK) (De Vadder et al., 2014). Cependant, le relais entérique local responsable de l'activation des gènes de la NGI dans les entérocytes n'a à ce jour pas été identifié. Nous avons formulé l'hypothèse que la libération d'un neurotransmetteur local par le système nerveux entérique en réponse à un signal provenant du SNC pourrait être impliqué.

Le peptide vasoactif intestinal (VIP) est un petit peptide qui agit comme neurotransmetteur et comme neurohormone paracrine dans des neurones non-cholinergiques non-adrénergiques du système nerveux entérique (Furness et al., 2004). Le VIP augmente spécifiquement la concentration intracellulaire d'AMPc dans les entérocytes, par la liaison au récepteur VPAC1 (Zimmerman et al., 1989). Des études *in vitro* sur des cellules Caco-2 surexprimant la G6PC ont montré que la transcription du gène de la *G6PC* est activée par une signalisation dépendante de l'AMPc (Gautier-Stein et al., 2006). De façon intéressante, des cellules intestinales de rat isolées présentent une forte sensibilité de l'adénylate cyclase au VIP (Prieto et al., 1979), et la culture de cellules Caco-2 surexprimant la G6PC en présence de VIP induit la transcription du gène (Gautier-Stein et al., 2006). Ces données suggèrent que la libération locale de VIP par les neurones entériques pourrait être impliquée dans l'activation des gènes de la NGI dans l'épithélium intestinal.

Afin de tester cette hypothèse, nous avons nourri des rats pendant deux semaines avec un régime standard ou un régime enrichi en propionate pour induire l'expression des gènes de la NGI. Nous avons étudié les implications *in vivo* du VIP sur l'expression des gènes de la NGI et la signalisation dépendante de l'AMPc dans l'intestin.



# VASOACTIVE INTESTINAL PEPTIDE IS A LOCAL MEDIATOR IN A GUT-BRAIN NEURAL AXIS ACTIVATING INTESTINAL GLUCONEOGENESIS

Filipe De Vadder<sup>1,2,3</sup>, Flora Plessier<sup>1,2,3</sup>, Amandine Gautier-Stein<sup>1,2,3</sup>, Gilles Mithieux<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup> Institut de la Santé et de la Recherche Médicale, U855, Lyon, 69372, France

<sup>2</sup> Université de Lyon, Lyon, 69008, France

<sup>3</sup> Université Lyon 1, Villeurbanne, 69622, France

Correspondence to Gilles Mithieux, UMR INSERM 855, Faculté de Médecine Laennec Lyon-Est, 7-11 rue Paradin, 69372 Lyon Cedex 08, France.

Tel: +33 4 78 77 87 88. Fax: +33 4 78 77 87 62

[gilles.mithieux@inserm.fr](mailto:gilles.mithieux@inserm.fr)

## ABSTRACT

Intestinal gluconeogenesis (IGN) promotes metabolic benefits through activation of a gut-brain neural axis. However, the local mediator activating gluconeogenic genes in the enterocytes remained unknown. We show that (1) VIP signaling through VPAC1 receptor activates the intestinal glucose-6-phosphatase gene *in vivo*, (2) the activation of IGN by propionate is counteracted by VPAC1 antagonism, and (3) that VIP-positive intrinsic neurons are increased under the action of propionate. These elements support the role of VIP as a local neuromodulator released by intrinsic enteric neurons and responsible for the induction through a VPAC1 receptor-dependent mechanism in enterocytes.

## KEYWORDS

Intestinal gluconeogenesis; vasoactive intestinal peptide; gut-brain axis; glucose-6-phosphatase





## INTRODUCTION

The gut-brain axis plays a critical role in the regulation of metabolic homeostasis. Intestinal gluconeogenesis (IGN) is a newly described process that promotes a decrease of hunger and an improvement of insulin sensitivity, while decreasing hepatic glucose production[1]. The IGN function is described in humans, especially after gastric bypass surgery or during the an-hepatic phase of liver transplantation[2]. Intestinal gluconeogenesis is activated when feeding protein[3,4]- or dietary fiber[5]-enriched diets. Specifically, in the case of dietary fiber, microbial-generated propionate binds to free fatty acid receptor 3 (FFAR3) in the nerve ends of the portal vein wall. This leads to the activation of a gut-brain reflex arc, inducing in the end the expression of gluconeogenic genes (glucose-6-phosphatase, G6Pase; phosphoenolpyruvate carboxykinase, PEPCK)[5]. However, the local enteric relay responsible for the activation of IGN genes in the enterocytes remains to be elucidated. We hypothesized that the release of a local gut neurotransmitter by enteric nervous plexuses in response to a signal from the central nervous system could be involved.

Vasoactive intestinal peptide (VIP) is a small peptide that acts as a neurotransmitter and paracrine neurohormone in non-adrenergic and non-cholinergic neurons of the enteric nervous system[6]. VIP neurons innervate the gut epithelium, and VIP specifically increases cAMP levels in enterocytes through binding to G<sub>s</sub>-coupled VPAC1 receptor[7]. *In vitro* studies in Caco-2 cells overexpressing the catalytic subunit of G6Pase (G6PC) have shown that transcription of *G6PC* is activated by cAMP-mediated signaling in the intestine[8]. Interestingly, isolated intestinal epithelial cells from rat exhibit a high adenylate cyclase sensitivity to VIP[9], and culturing Caco-2 cells overexpressing *G6PC* in the presence of VIP up-regulates the transcription of the gene[8]. These data suggest that local release of VIP by enteric neurons may be involved in activation of IGN genes in the gut epithelium.

To test this hypothesis, we fed rats for two weeks with either standard chow or propionate-enriched chow to induce IGN gene expression (see Methods). We investigated the *in vivo* implications of VIP on IGN gene expression and cAMP-mediated signaling in the intestine.

## RESULTS AND DISCUSSION

Rats that were fed on standard chow and received a VIP injection had about 2.5-fold higher G6Pase activity in the jejunum compared with rats that received a saline injection. In



line with previous data[5], propionate feeding strongly induced G6Pase activity. It is noteworthy that an injection of VPAC1 antagonist PG 97-269 reversed this induction (Figure 1A). Western blot analysis revealed that protein levels of PEPCK did not change throughout the experiment (Supplementary Figure 1), suggesting that the main target gene of VIP-mediated IGN regulation is *G6pc*.

We next investigated whether IGN induction was associated to an *in vivo* activation of cAMP-mediated signaling. After VIP injection, the intracellular cAMP content was increased 4-fold compared with saline-injected animals on standard diet. Similar cAMP levels were found in propionate-fed animals. Again, antagonism of VPAC1R abolished this increase (Figure 1B). The increase in cAMP is a key signal triggering the phosphorylation of cAMP responsive element binding protein (CREB). We determined the effect of the aforementioned conditions on the phosphorylation state of CREB. Both VIP injection and propionate feeding increased the levels of phosphorylated CREB, while not affecting the expression of CREB protein. As was the case before, treatment with PG 97-269 in propionate-fed animals reversed the induction (Figure 1C). *G6pc* gene is endowed with CREB binding sites[10]. To further document the regulation of this gene in the intestine, we studied the binding of phosphorylated CREB to the *G6pc* promoter by chromatin immunoprecipitation (ChIP). As shown in Figure 1D, the same pattern of activation/no activation was observed when studying the binding of phosphorylated CREB to the *G6pc* promoter.

Since VIP is expressed in enteric neurons, we examined if there was a variation of VIP expression specifically in the enteric nervous plexuses, which innervate the enteric mucosa. Using VIP immunostaining, we quantified VIP-positive cells in the myenteric and submucosal plexuses, in standard- and propionate-fed rats. Propionate feeding effectively increased the ratio of VIP-positive neurons in the enteric plexuses (Figure 2), in agreement with the observation that VIP is involved in propionate-mediated activation of IGN.

The purpose of this study was to investigate whether VIP was an enteric relay in the activation of gluconeogenic genes in the intestine in response to portal glucose signals relayed by the central nervous system (here activated by propionate). We show that VIP can induce G6Pase activity *in vivo*. Moreover, our data strongly suggest that VIP is necessary for propionate-mediated activation of IGN, since blocking of VPAC1 receptors in propionate-fed animals reverses the activation. These elements support the role of VIP as a local neuromodulator released by intrinsic neurons and responsible for the induction of IGN through a VPAC1-dependent mechanism in enterocytes.



If the proportion of VIP-positive enteric neurons correlates with IGN activation, the projection and type of these neurons is not obvious. VIP neurons are present in submucosal and myenteric plexuses. VIP neurons of the myenteric plexus receive strong vagal inputs[11]. Given the fact that propionate feeding activates neurons of the dorsal motor nucleus of the vagus[5] and that the secretomotor activity of VIP has been linked to VPAC1 activation in either enterocytes or cholinergic enteric neurons of the myenteric plexus[12], it is very likely that activation of IGN may take place through the same pathway.

The involvement of VIP signaling in glucose and energy homeostasis is not restricted to the intestinal area. For example, VIP signaling is needed for normal glucose-mediated insulin release in the endocrine pancreas[13]. Interestingly, VIP-null mice have elevated plasma glucose and enhanced taste preference for sweet[14], and streptozotocin-treated diabetic mice have decreased levels of gastrointestinal VIP[15]. All these alterations point to a crucial role of gastrointestinal VIP signaling in maintaining whole body glucose homeostasis.

In conclusion, we report here the deciphering of a crucial mechanism by which a nervous signal from the central nervous system activates intestinal glucose production, a function promoting numerous metabolic benefits<sup>1-4</sup>. These findings provide a novel understanding of the brain-gut neural relationships. Given the beneficial outcomes deriving from the activation of IGN, this may open novel perspectives in the treatment and prevention of metabolic diseases.

## **METHODS**

### **Animals and housing**

Adult male Sprague-Dawley rats (Charles River, France), aged 6 to 8 weeks and weighing 260-280 g at the time of their arrival, were housed in a climate-controlled room ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ) subjected to a 12-hour light/dark cycle with lights on at 7:00 AM, with free access to food and water. Standard diet was SAFE A04 (Augis, France). Sodium propionate (Sigma-Aldrich) was incorporated into the diet at 5% weight/weight. After two weeks of diet, animals were fasted for 3 hours and given an injection of either 0.9% NaCl (saline), or 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$  body weight VIP (Bachem) or PG 97-269 (Bachem). Rats were euthanized 3 hours after the injection and tissue was sampled.

### **Intestine sampling and G6Pase activity**



Rats were anesthetized with a single intraperitoneal injection of sodium pentobarbital (100 mg/kg) and the intestine was sampled as described previously[16]. 20  $\mu$ m-thick sections of the jejunum were used in histology experiments.

Frozen intestine samples were grinded to powder with a stainless steel mortar bathing in liquid nitrogen. The powder was further homogenized in 10 mM HEPES and 0.25 M sucrose, pH 7.4 (in a 9:1 volume ratio) and sonicated. G6Pase activity and non-specific phosphatase activity were assessed at maximum velocity in duplicates for each homogenate after addition of respectively 20 mM glucose-6-phosphate or  $\beta$ -glycerophosphate (Sigma-Aldrich). After 10 minutes at 30°C, the reaction was arrested by addition of excess 0.11 M ascorbic acid in 10% trichloroacetic acid (Sigma-Aldrich). After centrifugation for 10 minutes at 2,000 g, the supernatant was collected. The released inorganic phosphate was assayed by spectrophotometry at 700 nm by complexation with molybdate ions (excess molybdate ions were precipitated by sodium meta-arsenite). Specific G6Pase activity was computed as the G6Pase activity minus the non-specific phosphatase activity in each sample. Protein concentrations were assayed by Bradford's method and activity was expressed in U/g of protein.

### **Western Blot**

Tissue was either grinded in HEPES-sucrose (PEPCK) or 0.1 M HCl (CREB and pCREB). After denaturing electrophoresis, western blot was performed using rabbit anti-PEPCK (sc-32879, Santa Cruz, 1:7,000), rabbit anti- $\beta$  actin (D6A8, Cell Signaling, 1:10,000) or rabbit anti-phospho CREB (1113-1, Epitomics, 1:5,000). For CREB blotting, pCREB membrane was stripped and western blot was performed using rabbit anti-CREB (1496-1, Epitomics, 1:1,000). Secondary antibody was goat anti-rabbit IgG, HRP-conjugated (170-5046, Bio-Rad, 1:10,000).

### **cAMP assay**

cAMP in the intestine was quantified using a direct cAMP enzyme immunoassay kit according to the manufacturer's instructions (ADI-900-066, Enzo Life Sciences).

### **Chromatin immunoprecipitation (ChIP)**





ChIP was performed using Active Motif ChIP-IT® Express Enzymatic kit (53009), according to the manufacturer's instructions. Briefly, 50 to 100 mg of frozen intestine was fixed in 1% formaldehyde in PBS-protein inhibitory cocktail. After chromatin harvesting and fragmentation, an input was prepared as a load control. After removing cross-links, DNA was purified by phenol/chloroform method and quantified using a NanoDrop®. DNA integrity was verified by agarose gel electrophoresis. For immunoprecipitation, 10  $\mu$ g of chromatin were used with a rabbit anti-phospho CREB antibody (9191, Cell Signaling, 1:50). GFP antibody (Abcam Ab6556) was used as a negative control. Q-PCR was performed using Fast-start SYBR Green PCR reagents (Roche) with the following sequences on *G6pc* promoter:

- Forward GTTTGCTATTTTACGTAAATCACCCCT
- Reverse CCTCTGCTATCAGTCTGTGCCTTGC.

### **VIP immunohistochemistry**

Jejunum sections were cleared of paraffin, rehydrated and incubated for 35 minutes at 95°C in citrate buffer for antigen retrieval. After 30 minutes of incubation with a peroxidase blocking solution, sections were incubated in PBS with 0.3% Triton X-100 with 5% bovine serum albumin and 5% goat serum for 2 hours and further incubated with the primary antibody (rabbit anti-VIP, Abcam Ab78536, 1:1,000) overnight at room temperature. After several PBS rinses, sections were incubated with the secondary antibody (biotinylated goat anti-rabbit IgG, Vector BA-1000, 1:300) for 2 hours at room temperature. After several rinses in PBS, staining was performed using streptavidin-HRP and a chromogen reagent for 30 seconds (Dako kit K0690). Specific staining was absent in the control experiment with omission of primary antibodies. Sections were then counterstained with hematoxylin.

Images were acquired using a light microscope (Nikon Eclipse E400) and Histolab software (Microvision Instruments). Enteric plexuses were circled and manually labeled VIP-positive (with a halo of staining around the nucleus) and negative cells were counted in each plexus.

### **Statistical analysis**



GraphPad Prism® was used for statistical analysis. Groups were compared using one-way ANOVA followed by Dunnett's post-hoc test. The non-parametric Mann-Whitney's test was used for cell counting.  $P < 0.05$  was considered as statistically significant.

## FIGURE LEGENDS

**Figure 1.** VIP signaling mediates induction of intestinal gluconeogenesis. After two weeks on a standard or propionate-enriched diet, 3h-fasted rats were injected with VIP, VPAC1 antagonist PG 97-269 or only a saline solution.

**A.** Glucose-6-phosphatase activity in the jejunum of the rats. **B.** Intracellular cAMP in the jejunum of the rats. **C.** Effect of VIP signaling on CREB phosphorylation. Total CREB and pCREB proteins were assessed with western blots on intestinal lysates. **D.** ChIP assay of CREB occupancy over the rat *G6pc* promoter.

Data are mean  $\pm$  SEM of N = 6 rats per group. \*\*\*,  $P < 0.001$  vs. standard + saline, one-way ANOVA followed by Dunnett's post-hoc test.

**Figure 2.** Increase in VIP-positive neurons in myenteric and submucosal plexuses by propionate feeding.

**A.** Box plot showing 5 to 95 percentiles. Points below and above the whiskers are drawn as individual dots. VIP-positive cells were counted in 32-49 enteric plexuses of N = 3 rats per group. \*\*\*,  $P < 0.001$ , Mann-Whitney's sum of rank test. **B and C.** Representative jejunal sections of VIP-positive and hematoxylin-stained cells of rats fed a standard (B) or a propionate-enriched (C) diet. Myenteric plexuses are lined in yellow, VIP-positive and negative neurons are tagged respectively with green and red dots. Scale bar: 20  $\mu$ m.

## ACKNOWLEDGEMENTS

All protocols were performed in accordance to our local ethics committee at Claude Bernard University Lyon 1.

The authors thank the CNRS (G.M.), the INRA (A.G.-S.), the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche (F.D.V.), and the Ecole Normale Supérieure de Lyon (F.P.) for funding their positions. This work was funded by the INSERM.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS



Filipe De Vadder and Gilles Mithieux were responsible for the study concept; Filipe De Vadder and Flora Plessier performed the experiments; Filipe De Vadder, Flora Plessier, Amandine Gautier-Stein and Gilles Mithieux analyzed and interpreted the data; Filipe De Vadder, Flora Plessier and Gilles Mithieux wrote the manuscript.

## CONFLICTS OF INTEREST

The authors disclose no conflicts.

## REFERENCES

1. Mithieux G, Andreelli F, Magnan C (2009) Intestinal gluconeogenesis: key signal of central control of energy and glucose homeostasis. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* **12**: 419–423.
2. Mithieux G (2013) Nutrient control of hunger by extrinsic gastrointestinal neurons. *Trends Endocrinol Metab* **24**: 378–384.
3. Mithieux G, Misery P, Magnan C, Pillot B, Gautier-Stein A, Bernard C, Rajas F, Zitoun C (2005) Portal sensing of intestinal gluconeogenesis is a mechanistic link in the diminution of food intake induced by diet protein. *Cell Metab* **2**: 321–329.
4. Duraffourd C, De Vadder F, Goncalves D, Delaere F, Penhoat A, Brusset B, Rajas F, Chassard D, Duchamp A, Stefanutti A, et al. (2012) Mu-opioid receptors and dietary protein stimulate a gut-brain neural circuitry limiting food intake. *Cell* **150**: 377–388.
5. De Vadder F, Kovatcheva-Datchary P, Goncalves D, Vinera J, Zitoun C, Duchamp A, Bäckhed F, Mithieux G (2014) Microbiota-Generated Metabolites Promote Metabolic Benefits via Gut-Brain Neural Circuits. *Cell* **156**: 84–96.
6. Furness JB, Jones C, Nurgali K, Clerc N (2004) Intrinsic primary afferent neurons and nerve circuits within the intestine. *Prog Neurobiol* **72**: 143–164.
7. Zimmerman RP, Gates TS, Mantyh CR, Vigna SR, Welton ML, Passaro EP Jr, Mantyh PW (1989) Vasoactive intestinal polypeptide receptor binding sites in the human gastrointestinal tract: localization by autoradiography. *Neuroscience* **31**: 771–783.
8. Gautier-Stein A, Zitoun C, Lalli E, Mithieux G, Rajas F (2006) Transcriptional regulation of the glucose-6-phosphatase gene by cAMP/vasoactive intestinal peptide in the intestine. Role of HNF4alpha, CREM, HNF1alpha, and C/EBPalpha. *J Biol Chem* **281**: 31268–31278.
9. Prieto JC, Laburthe M, Rosselin G (1979) Interaction of vasoactive intestinal peptide with isolated intestinal epithelial cells from rat. 1. Characterization, quantitative aspects and structural requirements of binding sites. *Eur J Biochem* **96**: 229–237.
10. Gautier-Stein A, Mithieux G, Rajas F (2005) A distal region involving hepatocyte nuclear factor 4alpha and CAAT/enhancer binding protein markedly potentiates the protein kinase A stimulation of the glucose-6-phosphatase promoter. *Mol Endocrinol* **19**: 163–174.
11. Berthoud HR (1996) Morphological analysis of vagal input to gastrin releasing peptide and vasoactive intestinal peptide containing neurons in the rat glandular stomach. *J Comp Neurol* **370**: 61–70.



12. Fung C, Unterweger P, Parry LJ, Bornstein JC, Foong JPP (2014) VPAC1 receptors regulate intestinal secretion and muscle contractility by activating cholinergic neurons in guinea pig jejunum. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. doi: 10.1152/ajpgi.00416.2013
13. Winzell MS, Ahrén B (2007) Role of VIP and PACAP in islet function. *Peptides* **28**: 1805–1813.
14. Martin B, Shin Y-K, White CM, Ji S, Kim W, Carlson OD, Napora JK, Chadwick W, Chapter M, Waschek JA, et al. (2010) Vasoactive intestinal peptide-null mice demonstrate enhanced sweet taste preference, dysglycemia, and reduced taste bud leptin receptor expression. *Diabetes* **59**: 1143–1152.
15. Adeghate E, Ponery AS, Sharma AK, El-Sharkawy T, Donáth T (2001) Diabetes mellitus is associated with a decrease in vasoactive intestinal polypeptide content of gastrointestinal tract of rat. *Arch Physiol Biochem* **109**: 246–251.
16. Croset M, Rajas F, Zitoun C, Hurot JM, Montano S, Mithieux G (2001) Rat small intestine is an insulin-sensitive gluconeogenic organ. *Diabetes* **50**: 740–746.

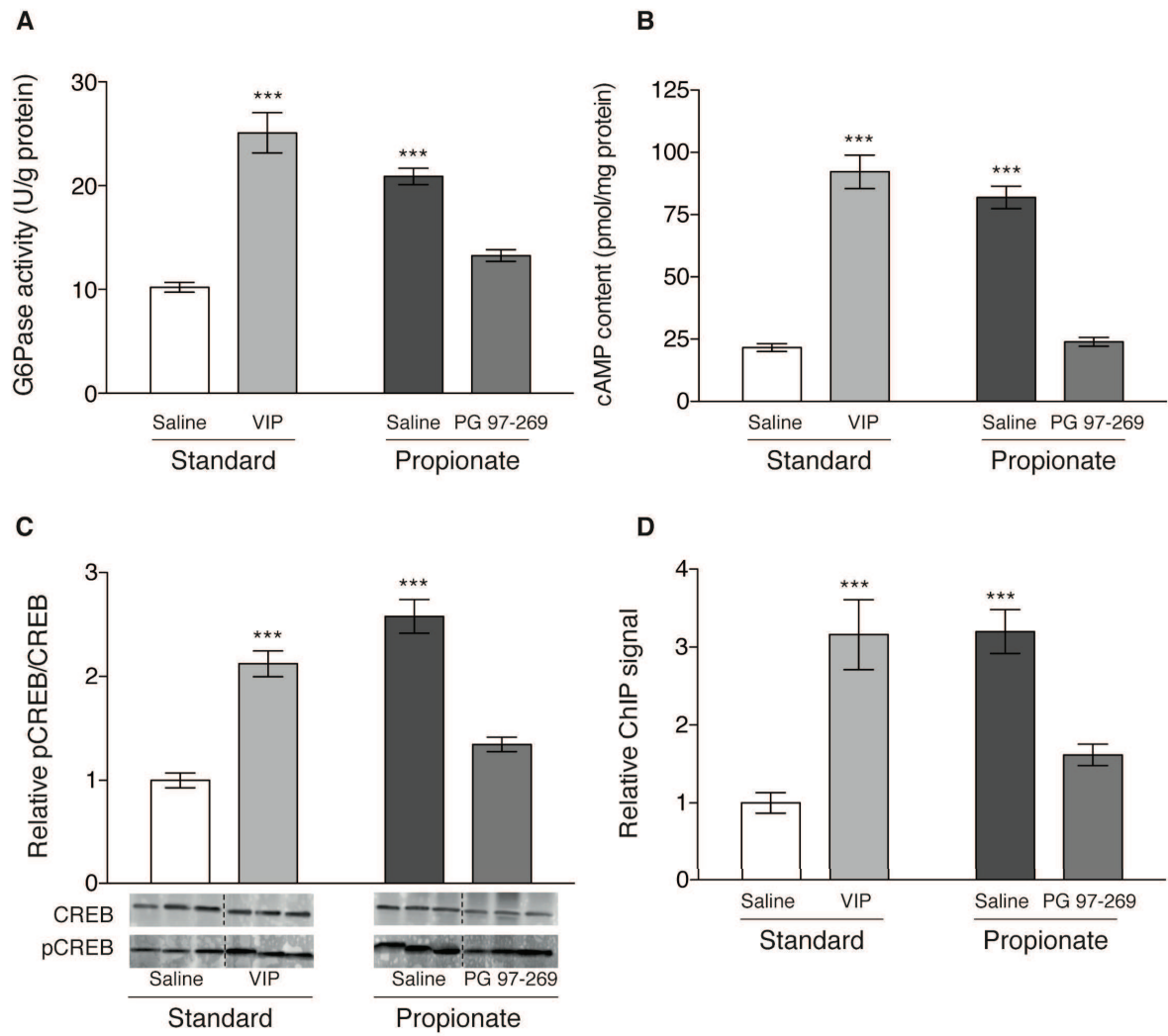
## EXPANDED VIEW

**Figure E1.** Western blot of PEPCK in jejunal rat protein extracts 3 hours after the injection.

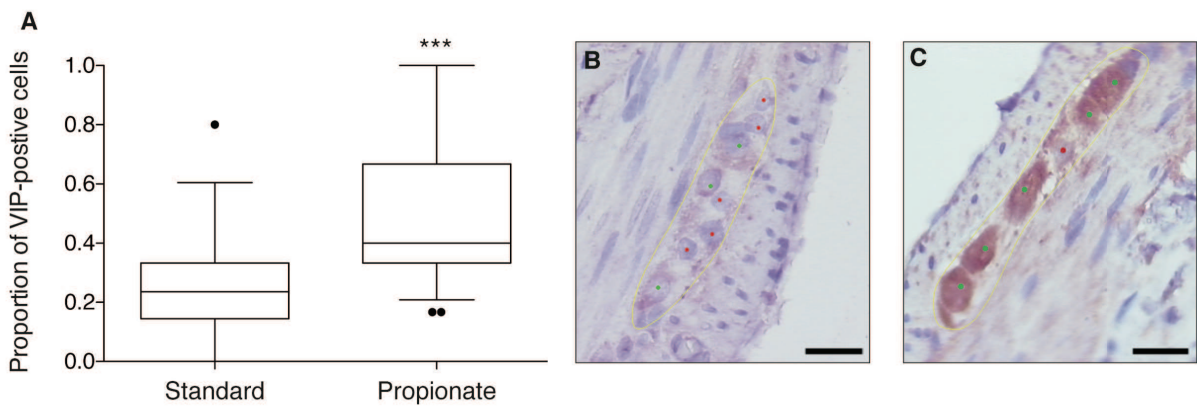
Top panel: PEPCK (72 kDa); bottom panel  $\beta$  actin (55 kDa).





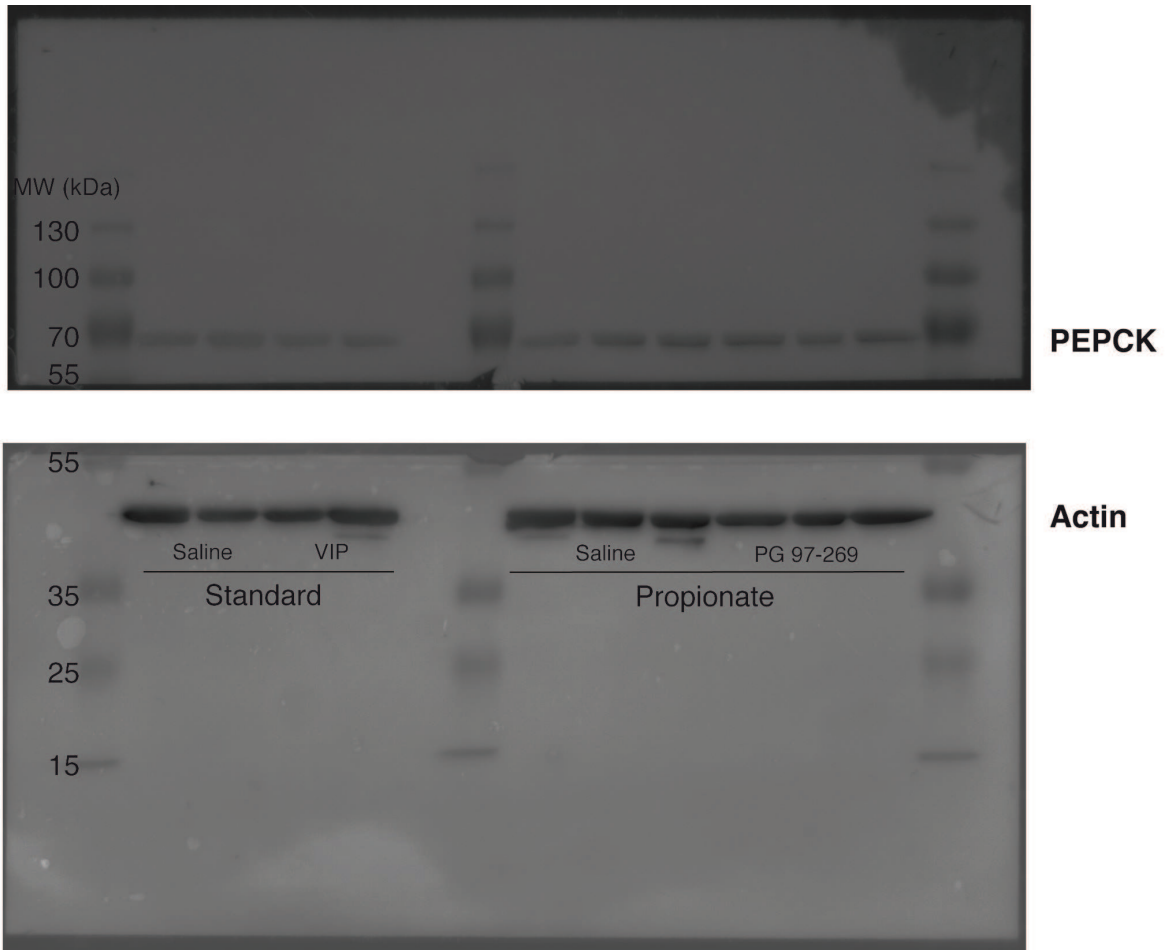


**Figure 1**



**Figure 2**





**Figure E1**



## **DISCUSSION GÉNÉRALE**



Les objectifs de ces travaux de thèse étaient d'étudier deux types de régimes connus pour leurs effets bénéfiques (au moins à court terme) sur le métabolisme énergétique. Bien que de nombreuses études aient prouvé l'efficacité de ces régimes, aucune étude de biologie fondamentale ne proposait de mécanisme par lesquels étaient exercés les effets bénéfiques.

La découverte de la NGI, il y a environ 15 ans (Croset et al., 2001; Rajas et al., 1999), a permis de démontrer un rôle crucial de l'intestin, d'une part dans le maintien de la glycémie, d'autre part dans la régulation globale de la balance énergétique. En particulier, l'importance du « signal glucose portal » a été démontrée lors des régimes riches en protéines (Mithieux et al., 2005) et lors de la rémission du diabète suite à un by-pass gastrique (Troy et al., 2008).

Le modèle original de la souris invalidée pour la G6Pase dans l'intestin (Penhoat et al., 2011) a été un outil considérable pour définir clairement les rôles de la NGI dans la régulation de la balance énergétique de l'organisme. Le fait que ces souris soient insensibles à l'effet coupe-faim des protéines a permis de démontrer que la NGI avait un rôle causal dans les améliorations liées aux régimes riches en protéines.

La première étude a donc permis de mettre en évidence un système de régulation complexe de la prise alimentaire, à partir de la signalisation par les récepteurs  $\mu$ -opioïdes exprimés dans les terminaisons nerveuses de la veine porte : lorsque ceux-ci sont inhibés par les résidus protéolytiques provenant de la digestion des protéines, un arc-réflexe central est initié, aboutissant *in fine* à la satiété.

Les afférences nerveuses provenant du tronc ventral du nerf vague sont probablement impliquées dans la transmission du signal MOR au cerveau. En accord avec cette hypothèse, l'activation du NTS et de l'hypothalamus induite par la perfusion portale d'antagonistes MOR est supprimée par le traitement à la capsaïcine et la vagotomie chirurgicale. Cependant, les signaux transportés par la moelle épinière, c'est-à-dire les signaux de la voie spino-mésencéphalique (activant le PBN notamment) semblent également impliqués. En accord avec cette idée, le PBN et la matière grise périaqueducale, qui reçoivent des signaux en provenance de la moelle épinière, sont activés par les perfusions d'antagonistes MOR portaux. De plus, l'activation de ces régions est supprimée par la capsaïcine et non par la vagotomie (qui laisse intactes les afférences spinales). De façon intéressante, le NTS, l'hypothalamus et la voie spino-mésencéphalique sont impliqués dans le contrôle de l'homéostasie énergétique (Berthoud, 2004) En accord avec une autre étude de notre laboratoire (Delaere et al., 2013), la voie spinale semble prépondérante dans la transmission





des signaux entre l'intestin et le cerveau. Cette idée représente un nouveau paradigme dans la compréhension des dialogues cerveau-intestin, largement considérés jusque là comme étant dépendants d'une communication par le nerf vague (Mithieux, 2013).

La complexité de la séquence des événements aboutissant à l'effet coupe-faim des protéines restait jusque là assez mal comprise. Un grand nombre de facteurs, tels que les hormones intestinales, sont sécrétés par l'intestin suite à un repas. On considère généralement que la liaison de ces hormones à leurs récepteurs présents dans l'hypothalamus modifie alors la sensation de faim. Tous ces mécanismes prennent place rapidement. Dans le cas des protéines, les événements sont plus complexes. Il s'agit de processus progressifs qui prennent place pendant la période postprandiale. Après cela, le glucose portal peut initier son action centrale coupe-faim (Delaere et al., 2012; Mithieux et al., 2005). Ceci est un phénomène durable qui dépend de l'induction des gènes de la NGI et qui peut donc durer après l'assimilation des nutriments. Cette hypothèse est en accord avec le fait que les régimes hyperprotéiques coupent la faim à distance du repas précédent, ce qui caractérise la satiété par rapport au rassasiement (Booth et al., 1970; Rolls et al., 1988). Les rongeurs traités avant un repas avec l'hormone de rassasiement CCK ne réduisent pas leur prise alimentaire globale. En effet, ils compensent la réduction de la valeur calorique de chaque repas par une plus grande fréquence de prise alimentaire (West et al., 1984). Pour évaluer le potentiel à long terme des modulateurs MOR sur la prise alimentaire, une idée intéressante serait d'inhiber spécifiquement les neurones MOR présents dans la veine porte. L'avènement de techniques tels que l'optogénétique (Miller, 2006) pourrait apporter une réponse à ces questions.

La deuxième étude propose pour la première fois un mécanisme par lequel les fibres alimentaires solubles exercent leurs effets bénéfiques. Elle résout le double paradoxe posé précédemment en proposant, d'une part que le propionate est utilisé comme substrat néoglucogénique par l'intestin (donc avant d'atteindre le foie), d'autre part que la production accrue d'ATP par le butyrate permet la synthèse d'AMPc. En utilisant les souris décrites précédemment, nous montrons que la NGI a un rôle causal dans les améliorations observées chez les rongeurs.

Les AGCC ont été décrits comme des molécules de signalisation, se liant à FFAR2 et FFAR3, dont l'activation réduit l'adiposité (Samuel et al., 2008) et active la sécrétion de GLP-1 (Tolhurst et al., 2012). Dans cette étude, nous montrons que le propionate et le butyrate activent les gènes de la NGI en utilisant des mécanismes différents mais complémentaires. Nos données suggèrent que le butyrate active directement l'expression des



gènes de la NGI dans les entérocytes via une augmentation de l'AMPc et non via FFAR2. Un tel mécanisme indépendant de FFAR2 a déjà été décrit précédemment dans les cellules Caco-2, et est rendu possible grâce à une augmentation de l'ATP induite par l'utilisation du butyrate comme substrat énergétique (Wang et al., 2012). Au contraire, nous montrons que le propionate agit comme ligand de FFAR3 dans la veine porte, induisant la NGI via un circuit de communication neuronale intestin-cerveau. Les régions activées par le propionate sont notamment le DVC (donc la voie vagale) et la région C1 de la moelle épinière (donc la voie spinale). Il semble donc que l'activation de la NGI par le propionate répond à un mode d'action similaire à celui décrit pour les protéines (Duraffourd et al., 2012). Ces données représentent un argument supplémentaire pour l'importance de la voie spinale dans la transmission des informations en provenance de l'intestin. Un argument définitif sur la prépondérance de cette voie proviendrait de l'étude de la dénervation chirurgicale des ganglions cœliaque et mésentérique.

Les effets bénéfiques des AGCC et des fibres alimentaires solubles ont été décrits dans plusieurs études, montrant toutes une augmentation de la dépense énergétique et une résistance au développement de l'obésité induite par le régime (Cani et al., 2007; Gao et al., 2009; Lin et al., 2012; Neyrinck et al., 2012). Contrairement aux données montrant que le propionate est un précurseur de glucose dans le foie, nous montrons que le propionate est converti en glucose par la NGI, donc avant l'arrivée dans le foie. Ceci induit des bénéfices métaboliques, démontrés par une diminution de l'adiposité et du poids, malgré une prise alimentaire semblable. L'utilisation des souris invalidées pour la G6Pase dans l'intestin a permis de démontrer le rôle causal de la NGI dans les améliorations observées. Chez ces souris, la nourriture riche en fibres est même légèrement délétère pour l'équilibre glycémique. Ces effets sont associés à une augmentation du propionate dans le sang portal. Nous proposons donc que la conversion accrue de propionate en glucose dans le foie contribue aux effets néfastes des régimes riches en fibres observés chez ces souris.

Toutes les études précédentes de notre laboratoire avaient montré que l'induction de la NGI aboutissait à une diminution de la prise alimentaire (Duraffourd et al., 2012; Mithieux et al., 2005; Troy et al., 2008). Cependant, dans cette étude, les rongeurs gardent une prise alimentaire constante, quel que soit le régime. Cette différence dans le comportement alimentaire est probablement due à l'induction très forte de la dépense énergétique par les fibres via la NGI, un effet dont l'importance n'avait pas été démontrée dans nos précédentes études. Il est probable que, en réponse à l'induction de la NGI et de l'augmentation de la dépense énergétique, les rongeurs compensent cet effet par une absence de diminution de la



prise alimentaire, aboutissant à un mécanisme de sauvegarde énergétique. Des études plus précises de calorimétrie et d'échanges respiratoires, notamment comparatives vis-à-vis des régimes riches en protéines, sont nécessaires afin de confirmer cette hypothèse. Il restera à comprendre les mécanismes à la base de ces effets différents des protéines et des fibres.

Les fibres alimentaires induisent des altérations notables de la composition du microbiote intestinal (Neyrinck et al., 2012). De plus, plusieurs études récentes suggèrent une interaction forte entre microbiote et métabolisme de l'hôte (El Aidy et al., 2013a, 2013b). Par exemple, l'expression de la *G6pc* intestinale est modifiée chez des souris axéniques (Larsson et al., 2012). Nous montrons ici que l'abondance des deux phylums majeurs du microbiote est fortement altérée par les régimes riches en fibres, quel que soit le génotype de la souris. Les régimes riches en fibres augmentent la proportion de Bacteroidetes et réduisent la proportion de Firmicutes. Bien que des modifications comparables aient été précédemment associés à des effets bénéfiques pour l'hôte (Bindels et al., 2012; Roberfroid et al., 2010; Schwartz et al., 2010; Turnbaugh et al., 2006), nos données montrent que ces changements ne sont pas suffisants pour induire les effets bénéfiques sur les équilibres glucidique et énergétique en absence de NGI. Au regard de l'intérêt croissant dans le rôle du microbiote dans les maladies métaboliques, notre étude apporte un nouveau concept où la NGI joue un rôle clé par son interaction avec les métabolites bactériens. Notre étude suggère donc que les nouvelles perspectives d'étude du microbiote doivent prendre en compte la réponse métabolique de l'hôte et doivent passer d'une simple prise en compte phylotypique à une étude métabolique et fonctionnelle du microbiote.

Ces deux études étaient limitées par la compréhension du mécanisme nerveux responsable de l'activation de la NGI lors des régimes riches en protéines et en fibres (particulièrement l'activation par le propionate). La troisième étude suggère un mécanisme impliquant la libération de VIP par les neurones sécrétomoteurs entériques, induisant l'augmentation de l'AMPc intracellulaire dans les entérocytes et *in fine* l'activation de l'expression de la G6Pase intestinale. Le système nerveux entérique semble donc jouer un rôle clé dans les processus homéostatiques de régulation de la NGI. Cependant, cette régulation pourrait dépendre de signaux efférents provenant du cerveau. Comme expliqué précédemment, ce système nerveux est largement indépendant, avec des arcs réflexes propres indépendants de toute innervation par le SNC (Furness, 2012). Il est donc tout à fait plausible que la détection des nutriments ait lieu dans les neurones entériques qui, par l'intermédiaire d'interneurones, activeraient un arc réflexe entérique d'activation des neurones VIPergiques.



Au vu des techniques actuelles d'étude du système nerveux entérique, cette hypothèse est difficilement testable. Cependant, l'utilisation future de l'optogénétique dans le système nerveux entérique (Boesmans et al., 2013) pourrait ouvrir la voie à la compréhension de la ou des voies nerveuses entériques de régulation de la NGI.

Au regard des similarités d'effet entre les deux études (protéines vs. fibres alimentaires), ces données renforcent l'idée d'un rôle clé de la NGI dans le maintien de l'homéostasie énergétique. Etant donné que ce processus physiologique est également présent chez l'Homme (Battezzati et al., 2004; Hayes et al., 2011; Mithieux, 2012), ceci pourrait ouvrir des perspectives à de nouvelles thérapies contre les maladies métaboliques.





## **TRAVAUX PERSONNELS**



## Articles originaux

**De Vadder, F.**, Plessier, F., Gautier-Stein, A., et Mithieux, G. Vasoactive intestinal peptide is a local mediator in a gut-brain neural axis activating intestinal gluconeogenesis. Soumis à *Neurogastroenterology & Motility*.

**De Vadder, F.**, Kovatcheva-Datchary, P., Goncalves, D., Vinera, J., Zitoun, C., Duchamp, A., Bäckhed, F., et Mithieux, G. (2014) Microbiota-derived metabolites promote metabolic benefits via gut-brain neural circuits. *Cell*, 186, 84-96.

Duraffourd, C., **De Vadder, F.**, Goncalves, D., Delaere, F., Penhoat, A., Brusset, B., Rajas, F., Chassard, D., Duchamp, A., Stefanutti, A., Gautier-Stein, A., et Mithieux, G. (2012). Mu-opioid receptors and dietary protein stimulate a gut-brain neural circuitry limiting food intake. *Cell* 150, 377–388. **(Co-premier auteur)**

Delaere, F., Akaoka, H., **De Vadder, F.**, Duchamp, A., et Mithieux, G. (2013). Portal glucose influences the sensory, cortical and reward systems in rats. *Eur. J. Neurosci.* 38, 3476-3486.

## Articles de revue

**De Vadder, F.**, Gautier-Stein, A., et Mithieux, G. (2013). Satiety and the role of  $\mu$ -opioid receptors in the portal vein. *Curr. Opin. Pharmacol.* 13, 959–963.

**De Vadder, F.**, Gautier-Stein, A., et Mithieux G. (2013). Les récepteurs  $\mu$ -opioïdes de la veine porte – Messagers de la régulation de la satiété. *Med. Sci.* 29, 31-33.

## Communications

**De Vadder, F.**, Goncalves, D., Vinera, J., Zitoun, C., Duchamp, A. et Mithieux, G. Les acides gras à courte chaîne et les fibres alimentaires solubles améliorent l'homéostasie glucidique via une induction de la néoglucogenèse intestinale. *Congrès de la SFE*, Paris, 2-5 octobre 2013. Communication orale.

**De Vadder, F.**, Goncalves, D., Vinera, J., Zitoun, C., Duchamp, A. et Mithieux, G. Les acides gras à courte chaîne et les fibres alimentaires solubles améliorent l'homéostasie glucidique via une induction de la néoglucogenèse intestinale. *Congrès de la SFD*, Montpellier, 26-29 mars 2013. Communication affichée commentée.

**De Vadder, F.**, Goncalves, D., Vinera, J., Zitoun, C., Duchamp, A. et Mithieux, G. Short-chain fatty acids and soluble dietary fiber improve glucose homeostasis via intestinal gluconeogenesis. *EMBO-EMBL Symposium on diabetes and obesity*, Heidelberg, 13-16 septembre 2012. Communication affichée.



Duraffourd, C., **De Vadder, F.**, Goncalves, D., Delaere, F., Penhoat, A., Brusset, B., Rajas, F., Duchampt, A., Stefanutti, A., Gautier-Stein, A., et Mithieux, G. Les récepteurs  $\mu$ -opioïdes de la veine porte contrôlent l'homéostasie énergétique en initiant un mécanisme de communication entre l'intestin et le cerveau. *Réunion du groupe de travail G2L2*, Lyon, 30 mars 2012. Communication orale.

**De Vadder, F.**, Goncalves, D., Duchampt, A. et Mithieux, G. Effet d'un régime enrichi en acides gras à courte chaîne sur l'induction de la néoglucogenèse intestinale. *Congrès de la SFD*, Nice, 20-23 mars 2012. Communication affichée commentée.

**De Vadder, F.**, Goncalves, D., Duchampt, A. et Mithieux, G. Rôle des acides gras à courte chaîne sur l'homéostasie glucidique et la néoglucogenèse intestinale. *Congrès de la SFE*, Clermont-Ferrand, 10-13 octobre 2011. Communication orale.

## Prix

2014 : Prix AXA-Académie des sciences : Les grandes avancées françaises en biologie présentées par leurs auteurs

2013 : Prix de la meilleure communication orale, *Congrès de la SFE*, Paris, 2-5 octobre 2013.

2013 : Prix de recherche Louis Bonduelle



## **RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES**





- Abbott, C.R., Small, C.J., Kennedy, A.R., Neary, N.M., Sajedi, A., Ghatei, M.A., et Bloom, S.R. (2005a). Blockade of the neuropeptide Y Y2 receptor with the specific antagonist BIIE0246 attenuates the effect of endogenous and exogenous peptide YY(3-36) on food intake. *Brain Res.* *1043*, 139–144.
- Abbott, C.R., Monteiro, M., Small, C.J., Sajedi, A., Smith, K.L., Parkinson, J.R.C., Ghatei, M.A., et Bloom, S.R. (2005b). The inhibitory effects of peripheral administration of peptide YY(3-36) and glucagon-like peptide-1 on food intake are attenuated by ablation of the vagal-brainstem-hypothalamic pathway. *Brain Res.* *1044*, 127–131.
- Abbott, C.R., Small, C.J., Sajedi, A., Smith, K.L., Parkinson, J.R.C., Broadhead, L.L., Ghatei, M.A., et Bloom, S.R. (2006). The importance of acclimatisation and habituation to experimental conditions when investigating the anorectic effects of gastrointestinal hormones in the rat. *Int. J. Obes.* *2005* *30*, 288–292.
- Adan, R.A., Cone, R.D., Burbach, J.P., et Gispén, W.H. (1994). Differential effects of melanocortin peptides on neural melanocortin receptors. *Mol. Pharmacol.* *46*, 1182–1190.
- Akanji, A.O., et Hockaday, T.D. (1990). Acetate tolerance and the kinetics of acetate utilization in diabetic and nondiabetic subjects. *Am. J. Clin. Nutr.* *51*, 112–118.
- Aminov, R.I., Walker, A.W., Duncan, S.H., Harmsen, H.J.M., Welling, G.W., et Flint, H.J. (2006). Molecular diversity, cultivation, and improved detection by fluorescent in situ hybridization of a dominant group of human gut bacteria related to *Roseburia* spp. or *Eubacterium rectale*. *Appl. Environ. Microbiol.* *72*, 6371–6376.
- Anand, B.K., et Brobeck, J.R. (1951). Localization of a “feeding center” in the hypothalamus of the rat. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* *77*, 323–324.
- Anderson, J.W., et Bridges, S.R. (1984). Short-chain fatty acid fermentation products of plant fiber affect glucose metabolism of isolated rat hepatocytes. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* *177*, 372–376.
- Anderson, J.W., et Chen, W.J. (1979). Plant fiber. Carbohydrate and lipid metabolism. *Am. J. Clin. Nutr.* *32*, 346–363.
- Anderson, J.W., et Siesel, A.E. (1990). Hypocholesterolemic effects of oat products. *Adv. Exp. Med. Biol.* *270*, 17–36.
- Arora, T., Sharma, R., et Frost, G. (2011). Propionate. Anti-obesity and satiety enhancing factor? *Appetite* *56*, 511–515.
- Aschenbach, J.R., Kristensen, N.B., Donkin, S.S., Hammon, H.M., et Penner, G.B. (2010). Gluconeogenesis in dairy cows: the secret of making sweet milk from sour dough. *IUBMB Life* *62*, 869–877.
- Bäckhed, F., Ding, H., Wang, T., Hooper, L.V., Koh, G.Y., Nagy, A., Semenkovich, C.F., et Gordon, J.I. (2004). The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *101*, 15718–15723.
- Bäckhed, F., Manchester, J.K., Semenkovich, C.F., et Gordon, J.I. (2007). Mechanisms underlying the resistance to diet-induced obesity in germ-free mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *104*, 979–984.
- Baird, J.P., Grill, H.J., et Kaplan, J.M. (1997). Intake suppression after hepatic portal glucose infusion: all-or-none effect and its temporal threshold. *Am. J. Physiol.* *272*, R1454–1460.
- Baird, J.P., Travers, S.P., et Travers, J.B. (2001). Integration of gastric distension and gustatory responses in the parabrachial nucleus. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* *281*, R1581–1593.
- Baldwin, R.L., Wood, W.A., et Emery, R.S. (1963). Conversion of glucose-C(14) to propionate by the rumen microbiota. *J. Bacteriol.* *85*, 1346–1349.
- Batterham, R.L., Cowley, M.A., Small, C.J., Herzog, H., Cohen, M.A., Dakin, C.L., Wren, A.M., Brynes, A.E., Low, M.J., Ghatei, M.A., et al. (2002). Gut hormone PYY(3-36) physiologically inhibits food intake. *Nature* *418*, 650–654.



- Batterham, R.L., Cohen, M.A., Ellis, S.M., Le Roux, C.W., Withers, D.J., Frost, G.S., Ghatti, M.A., et Bloom, S.R. (2003). Inhibition of food intake in obese subjects by peptide YY3-36. *N. Engl. J. Med.* *349*, 941–948.
- Battezzati, A., Caumo, A., Martino, F., Sereni, L.P., Coppa, J., Romito, R., Ammatuna, M., Regalia, E., Matthews, D.E., Mazzaferro, V., et al. (2004). Nonhepatic glucose production in humans. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* *286*, E129–135.
- Belenguer, A., Duncan, S.H., Holtrop, G., Anderson, S.E., Lobley, G.E., et Flint, H.J. (2007). Impact of pH on lactate formation and utilization by human fecal microbial communities. *Appl. Environ. Microbiol.* *73*, 6526–6533.
- Benoy, M.P., et Elliott, K.A. (1937). The metabolism of lactic and pyruvic acids in normal and tumour tissues: Synthesis of carbohydrate. *Biochem. J.* *31*, 1268–1275.
- Bensaïd, A., Tomé, D., Gietzen, D., Even, P., Morens, C., Gausseres, N., et Fromentin, G. (2002). Protein is more potent than carbohydrate for reducing appetite in rats. *Physiol. Behav.* *75*, 577–582.
- Bensaïd, A., Tomé, D., L'Heureux-Bourdon, D., Even, P., Gietzen, D., Morens, C., Gaudichon, C., Larue-Achagiotis, C., et Fromentin, G. (2003). A high-protein diet enhances satiety without conditioned taste aversion in the rat. *Physiol. Behav.* *78*, 311–320.
- Berman, D.E., et Dudai, Y. (2001). Memory extinction, learning anew, and learning the new: dissociations in the molecular machinery of learning in cortex. *Science* *291*, 2417–2419.
- Berridge, K.C. (2009). “Liking” and “wanting” food rewards: brain substrates and roles in eating disorders. *Physiol. Behav.* *97*, 537–550.
- Berridge, K.C., et Robinson, T.E. (2003). Parsing reward. *Trends Neurosci.* *26*, 507–513.
- Berridge, K.C., Ho, C.-Y., Richard, J.M., et DiFeliceantonio, A.G. (2010). The tempted brain eats: pleasure and desire circuits in obesity and eating disorders. *Brain Res.* *1350*, 43–64.
- Berthoud, H.-R. (2002). Multiple neural systems controlling food intake and body weight. *Neurosci. Biobehav. Rev.* *26*, 393–428.
- Berthoud, H.-R. (2004). Anatomy and function of sensory hepatic nerves. *Anat. Rec. A. Discov. Mol. Cell. Evol. Biol.* *280*, 827–835.
- Berthoud, H.-R. (2008). Vagal and hormonal gut-brain communication: from satiation to satisfaction. *Neurogastroenterol. Motil.* *20 Suppl 1*, 64–72.
- Berthoud, H.-R., et Morrison, C. (2008). The brain, appetite, and obesity. *Annu. Rev. Psychol.* *59*, 55–92.
- Bi, S., et Moran, T.H. (2002). Actions of CCK in the controls of food intake and body weight: lessons from the CCK-A receptor deficient OLETF rat. *Neuropeptides* *36*, 171–181.
- Bindels, L.B., Porporato, P., Dewulf, E.M., Verrax, J., Neyrinck, A.M., Martin, J.C., Scott, K.P., Buc Calderon, P., Feron, O., Muccioli, G.G., et al. (2012). Gut microbiota-derived propionate reduces cancer cell proliferation in the liver. *Br. J. Cancer* *107*, 1337–1344.
- Bjursell, M., Admyre, T., Göransson, M., Marley, A.E., Smith, D.M., Oscarsson, J., et Bohlooly-Y, M. (2011). Improved glucose control and reduced body fat mass in free fatty acid receptor 2-deficient mice fed a high-fat diet. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* *300*, E211–220.
- Boesmans, W., Martens, M.A., Weltens, N., Hao, M.M., Tack, J., Cirillo, C., et Vanden Berghe, P. (2013). Imaging neuron-glia interactions in the enteric nervous system. *Front. Cell. Neurosci.* *7*, 183.
- Boirie, Y., Dangin, M., Gachon, P., Vasson, M.P., Maubois, J.L., et Beaufrère, B. (1997). Slow and fast dietary proteins differently modulate postprandial protein accretion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *94*, 14930–14935.



- Booth, D.A., Chase, A., et Campbell, A.T. (1970). Relative effectiveness of protein in the late stages of appetite suppression in man. *Physiol. Behav.* *5*, 1299–1302.
- Boston, B.A., Blaydon, K.M., Varnerin, J., et Cone, R.D. (1997). Independent and additive effects of central POMC and leptin pathways on murine obesity. *Science* *278*, 1641–1644.
- Bouali, S.M., Fournier, A., St-Pierre, S., et Jolicoeur, F.B. (1995). Effects of NPY and NPY2-36 on body temperature and food intake following administration into hypothalamic nuclei. *Brain Res. Bull.* *36*, 131–135.
- Bowman, R.H. (1970). Gluconeogenesis in the isolated perfused rat kidney. *J. Biol. Chem.* *245*, 1604–1612.
- Breen, D.M., Yang, C.S., et Lam, T.K.T. (2011). Gut-brain signalling: how lipids can trigger the gut. *Diabetes Metab. Res. Rev.* *27*, 113–119.
- Breen, D.M., Rasmussen, B.A., Kokorovic, A., Wang, R., Cheung, G.W.C., et Lam, T.K.T. (2012). Jejunal nutrient sensing is required for duodenal-jejunal bypass surgery to rapidly lower glucose concentrations in uncontrolled diabetes. *Nat. Med.* *18*, 950–955.
- Brinkworth, G.D., Noakes, M., Clifton, P.M., et Bird, A.R. (2009). Comparative effects of very low-carbohydrate, high-fat and high-carbohydrate, low-fat weight-loss diets on bowel habit and faecal short-chain fatty acids and bacterial populations. *Br. J. Nutr.* *101*, 1493–1502.
- Brobeck, J.R., Tepperman, J., et Long, C.N. (1943). Experimental Hypothalamic Hyperphagia in the Albino Rat. *Yale J. Biol. Med.* *15*, 831–853.
- Brown, A.J., Goldsworthy, S.M., Barnes, A.A., Eilert, M.M., Tcheang, L., Daniels, D., Muir, A.I., Wigglesworth, M.J., Kinghorn, I., Fraser, N.J., et al. (2003). The Orphan G protein-coupled receptors GPR41 and GPR43 are activated by propionate and other short chain carboxylic acids. *J. Biol. Chem.* *278*, 11312–11319.
- Buchan, A.M., Polak, J.M., Capella, C., Solcia, E., et Pearse, A.G. (1978). Electronimmunocytochemical evidence for the K cell localization of gastric inhibitory polypeptide (GIP) in man. *Histochemistry* *56*, 37–44.
- Buyse, M., Ovesjö, M.L., Goïot, H., Guilmeau, S., Péranzi, G., Moizo, L., Walker, F., Lewin, M.J., Meister, B., et Bado, A. (2001). Expression and regulation of leptin receptor proteins in afferent and efferent neurons of the vagus nerve. *Eur. J. Neurosci.* *14*, 64–72.
- Caesar, R., Reigstad, C.S., Bäckhed, H.K., Reinhardt, C., Ketonen, M., Lundén, G.Ö., Cani, P.D., et Bäckhed, F. (2012). Gut-derived lipopolysaccharide augments adipose macrophage accumulation but is not essential for impaired glucose or insulin tolerance in mice. *Gut* *61*, 1701–1707.
- Cani, P.D., Knauf, C., Iglesias, M.A., Drucker, D.J., Delzenne, N.M., et Burcelin, R. (2006). Improvement of glucose tolerance and hepatic insulin sensitivity by oligofructose requires a functional glucagon-like peptide 1 receptor. *Diabetes* *55*, 1484–1490.
- Cani, P.D., Neyrinck, A.M., Fava, F., Knauf, C., Burcelin, R.G., Tuohy, K.M., Gibson, G.R., et Delzenne, N.M. (2007). Selective increases of bifidobacteria in gut microflora improve high-fat-diet-induced diabetes in mice through a mechanism associated with endotoxaemia. *Diabetologia* *50*, 2374–2383.
- Cani, P.D., Possemiers, S., Van de Wiele, T., Guiot, Y., Everard, A., Rottier, O., Geurts, L., Naslain, D., Neyrinck, A., Lambert, D.M., et al. (2009). Changes in gut microbiota control inflammation in obese mice through a mechanism involving GLP-2-driven improvement of gut permeability. *Gut* *58*, 1091–1103.
- Capasso, A., Amodeo, P., Balboni, G., Guerrini, R., Lazarus, L.H., Temussi, P.A., et Salvadori, S. (1997). Design of mu selective opioid dipeptide antagonists. *FEBS Lett.* *417*, 141–144.
- Carr, R.D., Larsen, M.O., Winzell, M.S., Jelic, K., Lindgren, O., Deacon, C.F., et Ahrén, B. (2008). Incretin and islet hormonal responses to fat and protein ingestion in healthy men. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* *295*, E779–784.



- Cersosimo, E., Garlick, P., et Ferretti, J. (1999). Renal glucose production during insulin-induced hypoglycemia in humans. *Diabetes* 48, 261–266.
- Le Chatelier, E., Nielsen, T., Qin, J., Prifti, E., Hildebrand, F., Falony, G., Almeida, M., Arumugam, M., Batto, J.-M., Kennedy, S., et al. (2013). Richness of human gut microbiome correlates with metabolic markers. *Nature* 500, 541–546.
- Clore, J.N., Stillman, J., and Sugerma, H. (2000). Glucose-6-phosphatase flux in vitro is increased in type 2 diabetes. *Diabetes* 49, 969–974.
- Cochrane, J., et Ottaway, J.H. (1970). Glycerol metabolism in perfused rat liver. *Biochem. J.* 117, 33P–34P.
- Cone, R.D. (2005). Anatomy and regulation of the central melanocortin system. *Nat. Neurosci.* 8, 571–578.
- Cota, D., Proulx, K., Smith, K.A.B., Kozma, S.C., Thomas, G., Woods, S.C., et Seeley, R.J. (2006). Hypothalamic mTOR signaling regulates food intake. *Science* 312, 927–930.
- Cotillard, A., Kennedy, S.P., Kong, L.C., Prifti, E., Pons, N., Le Chatelier, E., Almeida, M., Quinquis, B., Levenez, F., Galleron, N., et al. (2013). Dietary intervention impact on gut microbial gene richness. *Nature* 500, 585–588.
- Covasa, M. (2010). Deficits in gastrointestinal responses controlling food intake and body weight. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 299, R1423–1439.
- Crawley, J.N., et Beinfeld, M.C. (1983). Rapid development of tolerance to the behavioural actions of cholecystokinin. *Nature* 302, 703–706.
- Croset, M., Rajas, F., Zitoun, C., Hurot, J.M., Montano, S., et Mithieux, G. (2001). Rat small intestine is an insulin-sensitive gluconeogenic organ. *Diabetes* 50, 740–746.
- Crouse, J.R., Gerson, C.D., DeCarli, L.M., et Lieber, C.S. (1968). Role of acetate in the reduction of plasma free fatty acids produced by ethanol in man. *J. Lipid Res.* 9, 509–512.
- Cummings, D.E. (2006). Ghrelin and the short- and long-term regulation of appetite and body weight. *Physiol. Behav.* 89, 71–84.
- Cummings, J.H., Pomare, E.W., Branch, W.J., Naylor, C.P., et Macfarlane, G.T. (1987). Short chain fatty acids in human large intestine, portal, hepatic and venous blood. *Gut* 28, 1221–1227.
- Date, Y., Murakami, N., Toshinai, K., Matsukura, S., Nijijima, A., Matsuo, H., Kangawa, K., et Nakazato, M. (2002). The role of the gastric afferent vagal nerve in ghrelin-induced feeding and growth hormone secretion in rats. *Gastroenterology* 123, 1120–1128.
- Davis, L.M.G., Martínez, I., Walter, J., Goin, C., et Hutkins, R.W. (2011). Barcoded pyrosequencing reveals that consumption of galactooligosaccharides results in a highly specific bifidogenic response in humans. *PloS One* 6, e25200.
- Dayan, P., et Balleine, B.W. (2002). Reward, motivation, and reinforcement learning. *Neuron* 36, 285–298.
- Delaere, F., Magnan, C., et Mithieux, G. (2010). Hypothalamic integration of portal glucose signals and control of food intake and insulin sensitivity. *Diabetes Metab.* 36, 257–262.
- Delaere, F., Duchampt, A., Mounien, L., Seyer, P., Duraffourd, C., Zitoun, C., Thorens, B., et Mithieux, G. (2012). The role of sodium-coupled glucose co-transporter 3 in the satiety effect of portal glucose sensing. *Mol. Metab.* 2, 47–53.
- Delaere, F., Akaoka, H., De Vadder, F., Duchampt, A., et Mithieux, G. (2013). Portal glucose influences the sensory, cortical and reward systems in rats. *Eur. J. Neurosci.* 38, 3476–3486.
- Delzenne, N.M., Cani, P.D., et Neyrinck, A.M. (2007). Modulation of glucagon-like peptide 1 and energy





metabolism by inulin and oligofructose: experimental data. *J. Nutr.* *137*, 2547S–2551S.

Depoortere, I. (2014). Taste receptors of the gut: emerging roles in health and disease. *Gut* *63*, 179–190.

Derrien, M., Vaughan, E.E., Plugge, C.M., et de Vos, W.M. (2004). *Akkermansia muciniphila* gen. nov., sp. nov., a human intestinal mucin-degrading bacterium. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* *54*, 1469–1476.

Derrien, M., Van Baarlen, P., Hooiveld, G., Norin, E., Müller, M., et de Vos, W.M. (2011). Modulation of Mucosal Immune Response, Tolerance, and Proliferation in Mice Colonized by the Mucin-Degrader *Akkermansia muciniphila*. *Front. Microbiol.* *2*, 166.

Desmedt, A., Hazvi, S., et Dudai, Y. (2003). Differential pattern of cAMP response element-binding protein activation in the rat brain after conditioned aversion as a function of the associative process engaged: taste versus context association. *J. Neurosci.* *23*, 6102–6110.

Dewulf, E.M., Cani, P.D., Neyrinck, A.M., Possemiers, S., Holle, A.V., Muccioli, G.G., Deldicque, L., Bindels, L.B., Pachikian, B.D., Sohet, F.M., et al. (2011). Inulin-type fructans with prebiotic properties counteract GPR43 overexpression and PPAR $\gamma$ -related adipogenesis in the white adipose tissue of high-fat diet-fed mice. *J. Nutr. Biochem.* *22*, 712–722.

Dewulf, E.M., Cani, P.D., Claus, S.P., Fuentes, S., Puylaert, P.G.B., Neyrinck, A.M., Bindels, L.B., de Vos, W.M., Gibson, G.R., Thissen, J.-P., et al. (2013). Insight into the prebiotic concept: lessons from an exploratory, double blind intervention study with inulin-type fructans in obese women. *Gut* *62*, 1112–1121.

Van Dijk, T.H., Grefhorst, A., Oosterveer, M.H., Bloks, V.W., Staels, B., Reijngoud, D.-J., et Kuipers, F. (2009). An increased flux through the glucose 6-phosphate pool in enterocytes delays glucose absorption in *Fxr*<sup>-/-</sup> mice. *J. Biol. Chem.* *284*, 10315–10323.

Dong, J., Peeters, T.L., De Smet, B., Moechars, D., Delporte, C., Vande Berghe, P., Coulie, B., Tang, M., et Depoortere, I. (2006). Role of endogenous ghrelin in the hyperphagia of mice with streptozotocin-induced diabetes. *Endocrinology* *147*, 2634–2642.

Donohoe, D.R., Garge, N., Zhang, X., Sun, W., O'Connell, T.M., Bunger, M.K., et Bultman, S.J. (2011). The microbiome and butyrate regulate energy metabolism and autophagy in the Mammalian colon. *Cell Metab.* *13*, 517–526.

Drucker, D.J. (2006). The biology of incretin hormones. *Cell Metab.* *3*, 153–165.

Dumas, M.-E., Barton, R.H., Toye, A., Cloarec, O., Blancher, C., Rothwell, A., Fearnside, J., Tatoud, R., Blanc, V., Lindon, J.C., et al. (2006). Metabolic profiling reveals a contribution of gut microbiota to fatty liver phenotype in insulin-resistant mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *103*, 12511–12516.

Duncan, S.H., Louis, P., et Flint, H.J. (2004). Lactate-utilizing bacteria, isolated from human feces, that produce butyrate as a major fermentation product. *Appl. Environ. Microbiol.* *70*, 5810–5817.

Duncan, S.H., Belenguer, A., Holtrop, G., Johnstone, A.M., Flint, H.J., et Lobley, G.E. (2007). Reduced dietary intake of carbohydrates by obese subjects results in decreased concentrations of butyrate and butyrate-producing bacteria in feces. *Appl. Environ. Microbiol.* *73*, 1073–1078.

Duncan, S.H., Lobley, G.E., Holtrop, G., Ince, J., Johnstone, A.M., Louis, P., et Flint, H.J. (2008). Human colonic microbiota associated with diet, obesity and weight loss. *Int. J. Obes.* *2005* *32*, 1720–1724.

Duraffourd, C., De Vadder, F., Goncalves, D., Delaere, F., Penhoat, A., Brusset, B., Rajas, F., Chassard, D., Duchamp, A., Stefanutti, A., et al. (2012). Mu-opioid receptors and dietary protein stimulate a gut-brain neural circuitry limiting food intake. *Cell* *150*, 377–388.

Duvernoy, H.M., et Risold, P.-Y. (2007). The circumventricular organs: an atlas of comparative anatomy and vascularization. *Brain Res. Rev.* *56*, 119–147.

Eberlein, G.A., Eysselein, V.E., Schaeffer, M., Layer, P., Grandt, D., Goebell, H., Niebel, W., Davis, M., Lee,



- T.D., et Shively, J.E. (1989). A new molecular form of PYY: structural characterization of human PYY(3-36) and PYY(1-36). *Peptides* 10, 797–803.
- Echo, J.A., Lamonte, N., Ackerman, T.F., et Bodnar, R.J. (2002). Alterations in food intake elicited by GABA and opioid agonists and antagonists administered into the ventral tegmental area region of rats. *Physiol. Behav.* 76, 107–116.
- Eisenstein, J., Roberts, S.B., Dallal, G., et Saltzman, E. (2002). High-protein weight-loss diets: are they safe and do they work? A review of the experimental and epidemiologic data. *Nutr. Rev.* 60, 189–200.
- Ekberg, K., Landau, B.R., Wajngot, A., Chandramouli, V., Efendic, S., Brunengraber, H., et Wahren, J. (1999). Contributions by kidney and liver to glucose production in the postabsorptive state and after 60 h of fasting. *Diabetes* 48, 292–298.
- El Aidy, S., Derrien, M., Merrifield, C.A., Levenez, F., Doré, J., Boekschoten, M.V., Dekker, J., Holmes, E., Zoetendal, E.G., van Baarlen, P., et al. (2013a). Gut bacteria-host metabolic interplay during conventionalisation of the mouse germfree colon. *ISME J.* 7, 743–755.
- El Aidy, S., Merrifield, C.A., Derrien, M., van Baarlen, P., Hooiveld, G., Levenez, F., Doré, J., Dekker, J., Holmes, E., Claus, S.P., et al. (2013b). The gut microbiota elicits a profound metabolic reorientation in the mouse jejunal mucosa during conventionalisation. *Gut* 62, 1306–1314.
- Everard, A., Belzer, C., Geurts, L., Ouwerkerk, J.P., Druart, C., Bindels, L.B., Guiot, Y., Derrien, M., Muccioli, G.G., Delzenne, N.M., et al. (2013). Cross-talk between *Akkermansia muciniphila* and intestinal epithelium controls diet-induced obesity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 9066–9071.
- Faipoux, R., Tomé, D., Gougis, S., Darcel, N., et Fromentin, G. (2008). Proteins activate satiety-related neuronal pathways in the brainstem and hypothalamus of rats. *J. Nutr.* 138, 1172–1178.
- Fernandes, J., Vogt, J., et Wolever, T.M.S. (2012). Intravenous acetate elicits a greater free fatty acid rebound in normal than hyperinsulinaemic humans. *Eur. J. Clin. Nutr.* 66, 1029–1034.
- Fichna, J., Janecka, A., Costentin, J., et Do Rego, J.-C. (2007). The endomorphin system and its evolving neurophysiological role. *Pharmacol. Rev.* 59, 88–123.
- Flint, H.J., Duncan, S.H., Scott, K.P., et Louis, P. (2007). Interactions and competition within the microbial community of the human colon: links between diet and health. *Environ. Microbiol.* 9, 1101–1111.
- Flint, H.J., Bayer, E.A., Rincon, M.T., Lamed, R., et White, B.A. (2008). Polysaccharide utilization by gut bacteria: potential for new insights from genomic analysis. *Nat. Rev. Microbiol.* 6, 121–131.
- Flint, H.J., Scott, K.P., Louis, P., et Duncan, S.H. (2012). The role of the gut microbiota in nutrition and health. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 9, 577–589.
- Floyd, J.C., Jr, Fajans, S.S., Pek, S., Thiffault, C.A., Knopf, R.F., et Conn, J.W. (1970). Synergistic effect of essential amino acids and glucose upon insulin secretion in man. *Diabetes* 19, 109–115.
- Flynn, F.W., Grill, H.J., Schulkin, J., et Norgren, R. (1991). Central gustatory lesions: II. Effects on sodium appetite, taste aversion learning, and feeding behaviors. *Behav. Neurosci.* 105, 944–954.
- Freeland, K.R., et Wolever, T.M.S. (2010). Acute effects of intravenous and rectal acetate on glucagon-like peptide-1, peptide YY, ghrelin, adiponectin and tumour necrosis factor-alpha. *Br. J. Nutr.* 103, 460–466.
- Freeman, S.L., Bohan, D., Darcel, N., et Raybould, H.E. (2006). Luminal glucose sensing in the rat intestine has characteristics of a sodium-glucose cotransporter. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 291, G439–445.
- Fulton, S., Pissios, P., Manchon, R.P., Stiles, L., Frank, L., Pothos, E.N., Maratos-Flier, E., et Flier, J.S. (2006). Leptin regulation of the mesoaccumbens dopamine pathway. *Neuron* 51, 811–822.
- Furet, J.-P., Kong, L.-C., Tap, J., Poitou, C., Basdevant, A., Bouillot, J.-L., Mariat, D., Corthier, G., Doré, J.,



- Henegar, C., et al. (2010). Differential adaptation of human gut microbiota to bariatric surgery-induced weight loss: links with metabolic and low-grade inflammation markers. *Diabetes* 59, 3049–3057.
- Furness, J.B. (2012). The enteric nervous system and neurogastroenterology. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 9, 286–294.
- Furness, J.B., Jones, C., Nurgali, K., et Clerc, N. (2004). Intrinsic primary afferent neurons and nerve circuits within the intestine. *Prog. Neurobiol.* 72, 143–164.
- Gannon, M.C., et Nuttall, F.Q. (2004). Effect of a high-protein, low-carbohydrate diet on blood glucose control in people with type 2 diabetes. *Diabetes* 53, 2375–2382.
- Gannon, M.C., Nuttall, F.Q., Saeed, A., Jordan, K., et Hoover, H. (2003). An increase in dietary protein improves the blood glucose response in persons with type 2 diabetes. *Am. J. Clin. Nutr.* 78, 734–741.
- Ganong, W.F. (2000). Circumventricular organs: definition and role in the regulation of endocrine and autonomic function. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 27, 422–427.
- Gao, Z., Yin, J., Zhang, J., Ward, R.E., Martin, R.J., Lefevre, M., Cefalu, W.T., et Ye, J. (2009). Butyrate improves insulin sensitivity and increases energy expenditure in mice. *Diabetes* 58, 1509–1517.
- Gauriau, C., et Bernard, J.-F. (2002). Pain pathways and parabrachial circuits in the rat. *Exp. Physiol.* 87, 251–258.
- Gautier-Stein, A., Zitoun, C., Lalli, E., Mithieux, G., et Rajas, F. (2006). Transcriptional regulation of the glucose-6-phosphatase gene by cAMP/vasoactive intestinal peptide in the intestine. Role of HNF4alpha, CREM, HNF1alpha, and C/EBPalpha. *J. Biol. Chem.* 281, 31268–31278.
- Gerald, C., Walker, M.W., Criscione, L., Gustafson, E.L., Batzl-Hartmann, C., Smith, K.E., Vaysse, P., Durkin, M.M., Laz, T.M., Linemeyer, D.L., et al. (1996). A receptor subtype involved in neuropeptide-Y-induced food intake. *Nature* 382, 168–171.
- Gietzen, D.W. (1993). Neural mechanisms in the responses to amino acid deficiency. *J. Nutr.* 123, 610–625.
- Gill, S.R., Pop, M., Deboy, R.T., Eckburg, P.B., Turnbaugh, P.J., Samuel, B.S., Gordon, J.I., Relman, D.A., Fraser-Liggett, C.M., et Nelson, K.E. (2006). Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome. *Science* 312, 1355–1359.
- Giuliano, C., Robbins, T.W., Nathan, P.J., Bullmore, E.T., et Everitt, B.J. (2012). Inhibition of opioid transmission at the  $\mu$ -opioid receptor prevents both food seeking and binge-like eating. *Neuropsychopharmacology* 37, 2643–2652.
- Glatzle, J., Sternini, C., Robin, C., Zittel, T.T., Wong, H., Reeve, J.R., Jr, et Raybould, H.E. (2002). Expression of 5-HT<sub>3</sub> receptors in the rat gastrointestinal tract. *Gastroenterology* 123, 217–226.
- Glaum, S.R., Hara, M., Bindokas, V.P., Lee, C.C., Polonsky, K.S., Bell, G.I., et Miller, R.J. (1996). Leptin, the obese gene product, rapidly modulates synaptic transmission in the hypothalamus. *Mol. Pharmacol.* 50, 230–235.
- Gourcerol, G., Million, M., Adelson, D.W., Wang, Y., Rivier, J., St-Pierre, D.H., et Taché, Y. (2006). Lack of interaction between peripheral injection of CCK and obestatin in the regulation of gastric satiety signaling in rodents. *Peptides* 27, 2811–2819.
- Greenwood-Van Meerveld, B., Gardner, C.J., Little, P.J., Hicks, G.A., et Dehaven-Hudkins, D.L. (2004). Preclinical studies of opioids and opioid antagonists on gastrointestinal function. *Neurogastroenterol. Motil.* 16 Suppl 2, 46–53.
- Greiner, T., et Bäckhed, F. (2011). Effects of the gut microbiota on obesity and glucose homeostasis. *Trends Endocrinol. Metab.* 22, 117–123.



- Grill, H.J., et Norgren, R. (1978). The taste reactivity test. II. Mimetic responses to gustatory stimuli in chronic thalamic and chronic decerebrate rats. *Brain Res.* *143*, 281–297.
- Grill, H.J., Ginsberg, A.B., Seeley, R.J., et Kaplan, J.M. (1998). Brainstem application of melanocortin receptor ligands produces long-lasting effects on feeding and body weight. *J. Neurosci.* *18*, 10128–10135.
- Guan, J.L., Saotome, T., Wang, Q.P., Funahashi, H., Hori, T., Tanaka, S., et Shioda, S. (2001). Orexinergic innervation of POMC-containing neurons in the rat arcuate nucleus. *Neuroreport* *12*, 547–551.
- Håkansson, M.L., Hulting, A.L., et Meister, B. (1996). Expression of leptin receptor mRNA in the hypothalamic arcuate nucleus--relationship with NPY neurones. *Neuroreport* *7*, 3087–3092.
- Halatchev, I.G., Ellacott, K.L.J., Fan, W., et Cone, R.D. (2004). Peptide YY3-36 inhibits food intake in mice through a melanocortin-4 receptor-independent mechanism. *Endocrinology* *145*, 2585–2590.
- Hall, W.L., Millward, D.J., Long, S.J., et 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.
- Harris, G.C., Wimmer, M., et Aston-Jones, G. (2005). A role for lateral hypothalamic orexin neurons in reward seeking. *Nature* *437*, 556–559.
- Hayes, M.T., Foo, J., Besic, V., Tychinskaya, Y., et Stubbs, R.S. (2011). Is intestinal gluconeogenesis a key factor in the early changes in glucose homeostasis following gastric bypass? *Obes. Surg.* *21*, 759–762.
- Hedner, T., et Cassuto, J. (1987). Opioids and opioid receptors in peripheral tissues. *Scand. J. Gastroenterol. Suppl.* *130*, 27–46.
- Henaoui-Mejia, J., Elinav, E., Jin, C., Hao, L., Mehal, W.Z., Strowig, T., Thaïss, C.A., Kau, A.L., Eisenbarth, S.C., Jurczak, M.J., et al. (2012). Inflammation-mediated dysbiosis regulates progression of NAFLD and obesity. *Nature* *482*, 179–185.
- Hildebrandt, M.A., Hoffmann, C., Sherrill-Mix, S.A., Keilbaugh, S.A., Hamady, M., Chen, Y.-Y., Knight, R., Ahima, R.S., Bushman, F., et Wu, G.D. (2009). High-fat diet determines the composition of the murine gut microbiome independently of obesity. *Gastroenterology* *137*, 1716–1724.e1–2.
- Hillsley, K., et Grundy, D. (1998). Sensitivity to 5-hydroxytryptamine in different afferent subpopulations within mesenteric nerves supplying the rat jejunum. *J. Physiol.* *509* (Pt 3), 717–727.
- Hisano, S., Kagotani, Y., Tsuruo, Y., Daikoku, S., Chihara, K., et Whitnall, M.H. (1988). Localization of glucocorticoid receptor in neuropeptide Y-containing neurons in the arcuate nucleus of the rat hypothalamus. *Neurosci. Lett.* *95*, 13–18.
- Holzer, P. (2009). Opioid receptors in the gastrointestinal tract. *Regul. Pept.* *155*, 11–17.
- Hommel, J.D., Trinko, R., Sears, R.M., Georgescu, D., Liu, Z.-W., Gao, X.-B., Thurmon, J.J., Marinelli, M., et DiLeone, R.J. (2006). Leptin receptor signaling in midbrain dopamine neurons regulates feeding. *Neuron* *51*, 801–810.
- Hong, Y.-H., Nishimura, Y., Hishikawa, D., Tsuzuki, H., Miyahara, H., Gotoh, C., Choi, K.-C., Feng, D.D., Chen, C., Lee, H.-G., et al. (2005). Acetate and propionate short chain fatty acids stimulate adipogenesis via GPCR43. *Endocrinology* *146*, 5092–5099.
- Hooper, L.V., et Macpherson, A.J. (2010). Immune adaptations that maintain homeostasis with the intestinal microbiota. *Nat. Rev. Immunol.* *10*, 159–169.
- Horino, M., Machlin, L.J., Hertelendy, F., et Kipnis, D.M. (1968). Effect of short-chain fatty acids on plasma insulin in ruminant and nonruminant species. *Endocrinology* *83*, 118–128.
- Høverstad, T., et Midtvedt, T. (1986). Short-chain fatty acids in germfree mice and rats. *J. Nutr.* *116*, 1772–1776.





- Hughes, J., Smith, T.W., Kosterlitz, H.W., Fothergill, L.A., Morgan, B.A., et Morris, H.R. (1975). Identification of two related pentapeptides from the brain with potent opiate agonist activity. *Nature* 258, 577–580.
- Hylemon, P.B., Zhou, H., Pandak, W.M., Ren, S., Gil, G., et Dent, P. (2009). Bile acids as regulatory molecules. *J. Lipid Res.* 50, 1509–1520.
- Janssen, P., Vos, R., Van Oudenhove, L., et Tack, J. (2011a). Influence of the 5-HT<sub>3</sub> receptor antagonist ondansetron on gastric sensorimotor function and nutrient tolerance in healthy volunteers. *Neurogastroenterol. Motil. Off. J. Eur. Gastrointest. Motil. Soc.* 23, 444–449, e175.
- Janssen, S., Laermans, J., Verhulst, P.-J., Thijs, T., Tack, J., et Depoortere, I. (2011b). Bitter taste receptors and  $\alpha$ -gustducin regulate the secretion of ghrelin with functional effects on food intake and gastric emptying. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 2094–2099.
- Jean, C., Fromentin, G., Tomé, D., et Larue-Achagiotis, C. (2002). Wistar rats allowed to self-select macronutrients from weaning to maturity choose a high-protein, high-lipid diet. *Physiol. Behav.* 76, 65–73.
- Kaczmarek, H.J., et Kiefer, S.W. (2000). Microinjections of dopaminergic agents in the nucleus accumbens affect ethanol consumption but not palatability. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 66, 307–312.
- Kakei, M., Yada, T., Nakagawa, A., et Nakabayashi, H. (2002). Glucagon-like peptide-1 evokes action potentials and increases cytosolic Ca<sup>2+</sup> in rat nodose ganglion neurons. *Auton. Neurosci.* 102, 39–44.
- Kalliomäki, M., Collado, M.C., Salminen, S., et Isolauri, E. (2008). Early differences in fecal microbiota composition in children may predict overweight. *Am. J. Clin. Nutr.* 87, 534–538.
- Kamegai, J., Tamura, H., Shimizu, T., Ishii, S., Sugihara, H., et Wakabayashi, I. (2000). Central effect of ghrelin, an endogenous growth hormone secretagogue, on hypothalamic peptide gene expression. *Endocrinology* 141, 4797–4800.
- Karlsson, F.H., Tremaroli, V., Nookaew, I., Bergström, G., Behre, C.J., Fagerberg, B., Nielsen, J., et Bäckhed, F. (2013). Gut metagenome in European women with normal, impaired and diabetic glucose control. *Nature* 498, 99–103.
- Kelley, A.E. (2004). Ventral striatal control of appetitive motivation: role in ingestive behavior and reward-related learning. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 27, 765–776.
- Kelley, A.E., Bless, E.P., et Swanson, C.J. (1996). Investigation of the effects of opiate antagonists infused into the nucleus accumbens on feeding and sucrose drinking in rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 278, 1499–1507.
- Kelley, A.E., Bakshi, V.P., Haber, S.N., Steininger, T.L., Will, M.J., et Zhang, M. (2002). Opioid modulation of taste hedonics within the ventral striatum. *Physiol. Behav.* 76, 365–377.
- Kimura, I., Inoue, D., Maeda, T., Hara, T., Ichimura, A., Miyauchi, S., Kobayashi, M., Hirasawa, A., et Tsujimoto, G. (2011). Short-chain fatty acids and ketones directly regulate sympathetic nervous system via G protein-coupled receptor 41 (GPR41). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 8030–8035.
- Kimura, I., Ozawa, K., Inoue, D., Imamura, T., Kimura, K., Maeda, T., Terasawa, K., Kashihara, D., Hirano, K., Tani, T., et al. (2013). The gut microbiota suppresses insulin-mediated fat accumulation via the short-chain fatty acid receptor GPR43. *Nat. Commun.* 4, 1829.
- Kinzig, K.P., Hargrave, S.L., Hyun, J., et Moran, T.H. (2007). Energy balance and hypothalamic effects of a high-protein/low-carbohydrate diet. *Physiol. Behav.* 92, 454–460.
- Kojima, M., et Kangawa, K. (2005). Ghrelin: structure and function. *Physiol. Rev.* 85, 495–522.
- Koopman, R., Wagenmakers, A.J.M., Manders, R.J.F., Zorenc, A.H.G., Senden, J.M.G., Gorselink, M., Keizer, H.A., et van Loon, L.J.C. (2005). Combined ingestion of protein and free leucine with carbohydrate increases postexercise muscle protein synthesis in vivo in male subjects. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 288, E645–



- Kosterlitz, H.W., et Paterson, S.J. (1980). Characterization of opioid receptors in nervous tissue. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* *210*, 113–122.
- Kozłowski, C.M., Green, A., Grundy, D., Boissonade, F.M., et Bountra, C. (2000). The 5-HT(3) receptor antagonist alosetron inhibits the colorectal distention induced depressor response and spinal c-fos expression in the anaesthetised rat. *Gut* *46*, 474–480.
- Kreil, G., Umbach, M., Brantl, V., et Teschemacher, H. (1983). Studies on the enzymatic degradation of beta-casomorphins. *Life Sci.* *33 Suppl 1*, 137–140.
- Kurokawa, K., Itoh, T., Kuwahara, T., Oshima, K., Toh, H., Toyoda, A., Takami, H., Morita, H., Sharma, V.K., Srivastava, T.P., et al. (2007). Comparative metagenomics revealed commonly enriched gene sets in human gut microbiomes. *DNA Res.* *14*, 169–181.
- Landau, B.R., Schumann, W.C., Chandramouli, V., Magnusson, I., Kumaran, K., et Wahren, J. (1993). 14C-labeled propionate metabolism in vivo and estimates of hepatic gluconeogenesis relative to Krebs cycle flux. *Am. J. Physiol.* *265*, E636–647.
- Larsen, T.M., Dalskov, S.-M., van Baak, M., Jebb, S.A., Papadaki, A., Pfeiffer, A.F.H., Martinez, J.A., Handjieva-Darlenska, T., Kunešová, M., Pihlsgård, M., et al. (2010). Diets with high or low protein content and glycemic index for weight-loss maintenance. *N. Engl. J. Med.* *363*, 2102–2113.
- Larsson, E., Tremaroli, V., Lee, Y.S., Koren, O., Nookaew, I., Fricker, A., Nielsen, J., Ley, R.E., et Bäckhed, F. (2012). Analysis of gut microbial regulation of host gene expression along the length of the gut and regulation of gut microbial ecology through MyD88. *Gut* *61*, 1124–1131.
- Latner, J.D., et Schwartz, M. (1999). The effects of a high-carbohydrate, high-protein or balanced lunch upon later food intake and hunger ratings. *Appetite* *33*, 119–128.
- Laurent, C., Simoneau, C., Marks, L., Braschi, S., Champ, M., Charbonnel, B., et Krempf, M. (1995). Effect of acetate and propionate on fasting hepatic glucose production in humans. *Eur. J. Clin. Nutr.* *49*, 484–491.
- Layden, B.T., Angueira, A.R., Brodsky, M., Durai, V., et Lowe, W.L., Jr (2013). Short chain fatty acids and their receptors: new metabolic targets. *Transl. Res.* *3*, 131–140.
- Leitch, E.C.M., Walker, A.W., Duncan, S.H., Holtrop, G., et Flint, H.J. (2007). Selective colonization of insoluble substrates by human faecal bacteria. *Environ. Microbiol.* *9*, 667–679.
- Levine, A.S., Morley, J.E., Brown, D.M., et Handwerker, B.S. (1982). Extreme sensitivity of diabetic mice to naloxone-induced suppression of food intake. *Physiol. Behav.* *28*, 987–989.
- Ley, R.E. (2010). Obesity and the human microbiome. *Curr. Opin. Gastroenterol.* *26*, 5–11.
- Ley, R.E., Bäckhed, F., Turnbaugh, P., Lozupone, C.A., Knight, R.D., et Gordon, J.I. (2005). Obesity alters gut microbial ecology. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *102*, 11070–11075.
- Ley, R.E., Turnbaugh, P.J., Klein, S., et Gordon, J.I. (2006). Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. *Nature* *444*, 1022–1023.
- Ley, R.E., Lozupone, C.A., Hamady, M., Knight, R., et Gordon, J.I. (2008). Worlds within worlds: evolution of the vertebrate gut microbiota. *Nat. Rev. Microbiol.* *6*, 776–788.
- Li, C., Chen, P., et Smith, M.S. (1999). Identification of neuronal input to the arcuate nucleus (ARH) activated during lactation: implications in the activation of neuropeptide Y neurons. *Brain Res.* *824*, 267–276.
- Li, Y., Hao, Y., Zhu, J., et Owyang, C. (2000). Serotonin released from intestinal enterochromaffin cells mediates luminal non-cholecystokinin-stimulated pancreatic secretion in rats. *Gastroenterology* *118*, 1197–1207.



- Li, Y., Kokrashvili, Z., Mosinger, B., et Margolskee, R.F. (2013). Gustducin couples fatty acid receptors to GLP-1 release in colon. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* *304*, E651–660.
- Lin, H.V., Frassetto, A., Kowalik, E.J., Jr, Nawrocki, A.R., Lu, M.M., Kosinski, J.R., Hubert, J.A., Szeto, D., Yao, X., Forrest, G., et al. (2012). Butyrate and Propionate Protect against Diet-Induced Obesity and Regulate Gut Hormones via Free Fatty Acid Receptor 3-Independent Mechanisms. *PLoS One* *7*, e35240.
- Linehan, B., Scheifinger, C.C., et Wolin, M.J. (1978). Nutritional Requirements of *Selenomonas ruminantium* for Growth on Lactate, Glycerol, or Glucose. *Appl. Environ. Microbiol.* *35*, 317–322.
- Little, T.J., et Feinle-Bisset, C. (2011). Effects of dietary fat on appetite and energy intake in health and obesity--oral and gastrointestinal sensory contributions. *Physiol. Behav.* *104*, 613–620.
- Van Loon, L.J.C., Kruijshoop, M., Menheere, P.P.C.A., Wagenmakers, A.J.M., Saris, W.H.M., et Keizer, H.A. (2003). Amino acid ingestion strongly enhances insulin secretion in patients with long-term type 2 diabetes. *Diabetes Care* *26*, 625–630.
- Lopez-Siles, M., Khan, T.M., Duncan, S.H., Harmsen, H.J.M., Garcia-Gil, L.J., et Flint, H.J. (2012). Cultured representatives of two major phylogroups of human colonic *Faecalibacterium prausnitzii* can utilize pectin, uronic acids, and host-derived substrates for growth. *Appl. Environ. Microbiol.* *78*, 420–428.
- Lopez-Valpuesta, F.J., Nyce, J.W., Griffin-Biggs, T.A., Ice, J.C., et Myers, R.D. (1996). Antisense to NPY-Y1 demonstrates that Y1 receptors in the hypothalamus underlie NPY hypothermia and feeding in rats. *Proc. Biol. Sci.* *263*, 881–886.
- Louis, P., et Flint, H.J. (2009). Diversity, metabolism and microbial ecology of butyrate-producing bacteria from the human large intestine. *FEMS Microbiol. Lett.* *294*, 1–8.
- Louis, P., Scott, K.P., Duncan, S.H., et Flint, H.J. (2007). Understanding the effects of diet on bacterial metabolism in the large intestine. *J. Appl. Microbiol.* *102*, 1197–1208.
- Louis, P., Young, P., Holtrop, G., et Flint, H.J. (2010). Diversity of human colonic butyrate-producing bacteria revealed by analysis of the butyryl-CoA:acetate CoA-transferase gene. *Environ. Microbiol.* *12*, 304–314.
- Lutz, T.A., Mollet, A., Rushing, P.A., Riediger, T., et Scharrer, E. (2001). The anorectic effect of a chronic peripheral infusion of amylin is abolished in area postrema/nucleus of the solitary tract (AP/NTS) lesioned rats. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* *25*, 1005–1011.
- Lynch, W.C., et Burns, G. (1990). Opioid effects on intake of sweet solutions depend both on prior drug experience and on prior ingestive experience. *Appetite* *15*, 23–32.
- Lynch, R.M., Tompkins, L.S., Brooks, H.L., Dunn-Meynell, A.A., et Levin, B.E. (2000). Localization of glucokinase gene expression in the rat brain. *Diabetes* *49*, 693–700.
- Macfarlane, S., et Macfarlane, G.T. (2003). Regulation of short-chain fatty acid production. *Proc. Nutr. Soc.* *62*, 67–72.
- Mackie, R.I., Sghir, A., et Gaskins, H.R. (1999). Developmental microbial ecology of the neonatal gastrointestinal tract. *Am. J. Clin. Nutr.* *69*, 1035S–1045S.
- MacLean, H. (1922). *Modern methods in the diagnosis and the treatment of glycosuria and diabetes* (London, Constable).
- Magnusson, I., Rothman, D.L., Katz, L.D., Shulman, R.G., et Shulman, G.I. (1992). Increased rate of gluconeogenesis in type II diabetes mellitus. A <sup>13</sup>C nuclear magnetic resonance study. *J. Clin. Invest.* *90*, 1323–1327.
- Manders, R.J.F., Wagenmakers, A.J.M., Koopman, R., Zorenc, A.H.G., Menheere, P.P.C.A., Schaper, N.C., Saris, W.H.M., et van Loon, L.J.C. (2005). Co-ingestion of a protein hydrolysate and amino acid mixture with carbohydrate improves plasma glucose disposal in patients with type 2 diabetes. *Am. J. Clin. Nutr.* *82*, 76–83.



- Martens, E.C., Koropatkin, N.M., Smith, T.J., et Gordon, J.I. (2009). Complex glycan catabolism by the human gut microbiota: the Bacteroidetes Sus-like paradigm. *J. Biol. Chem.* *284*, 24673–24677.
- Martin, B.C., Warram, J.H., Krolewski, A.S., Bergman, R.N., Soeldner, J.S., et Kahn, C.R. (1992). Role of glucose and insulin resistance in development of type 2 diabetes mellitus: results of a 25-year follow-up study. *Lancet* *340*, 925–929.
- Mawe, G.M., et Hoffman, J.M. (2013). Serotonin signalling in the gut--functions, dysfunctions and therapeutic targets. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* *10*, 473–486.
- Meisel, H., et FitzGerald, R.J. (2000). Opioid peptides encrypted in intact milk protein sequences. *Br. J. Nutr.* *84 Suppl 1*, S27–31.
- Meissner, W., Schmidt, U., Hartmann, M., Kath, R., et Reinhart, K. (2000). Oral naloxone reverses opioid-associated constipation. *Pain* *84*, 105–109.
- Membrez, M., Blancher, F., Jaquet, M., Bibiloni, R., Cani, P.D., Burcelin, R.G., Corthesy, I., Macé, K., et Chou, C.J. (2008). Gut microbiota modulation with norfloxacin and ampicillin enhances glucose tolerance in mice. *FASEB J.* *22*, 2416–2426.
- Mendeloff, A.I. (1977). Dietary fiber and human health. *N. Engl. J. Med.* *297*, 811–814.
- Mentlein, R., Gallwitz, B., et Schmidt, W.E. (1993). Dipeptidyl-peptidase IV hydrolyses gastric inhibitory polypeptide, glucagon-like peptide-1(7-36)amide, peptide histidine methionine and is responsible for their degradation in human serum. *Eur. J. Biochem.* *214*, 829–835.
- Mikkelsen, P.B., Toubro, S., et Astrup, A. (2000). Effect of fat-reduced diets on 24-h energy expenditure: comparisons between animal protein, vegetable protein, and carbohydrate. *Am. J. Clin. Nutr.* *72*, 1135–1141.
- Miller, G. (2006). Optogenetics. Shining new light on neural circuits. *Science* *314*, 1674–1676.
- Mithieux, G. (2012). Comment about intestinal gluconeogenesis after gastric bypass in human in relation with the paper by Hayes et al., *Obes. Surg.* 2011. *Obes. Surg.* *22*, 1920–1922; author reply 1923–1924.
- Mithieux, G. (2013). Nutrient control of hunger by extrinsic gastrointestinal neurons. *Trends Endocrinol. Metab.* *24*, 378–384.
- Mithieux, G., Bady, I., Gautier, A., Croset, M., Rajas, F., et Zitoun, C. (2004a). Induction of control genes in intestinal gluconeogenesis is sequential during fasting and maximal in diabetes. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* *286*, E370–375.
- Mithieux, G., Rajas, F., et Gautier-Stein, A. (2004b). A novel role for glucose 6-phosphatase in the small intestine in the control of glucose homeostasis. *J. Biol. Chem.* *279*, 44231–44234.
- Mithieux, G., Misery, P., Magnan, C., Pillot, B., Gautier-Stein, A., Bernard, C., Rajas, F., et Zitoun, C. (2005). Portal sensing of intestinal gluconeogenesis is a mechanistic link in the diminution of food intake induced by diet protein. *Cell Metab.* *2*, 321–329.
- Mithieux, G., Gautier-Stein, A., Rajas, F., et Zitoun, C. (2006). Contribution of intestine and kidney to glucose fluxes in different nutritional states in rat. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* *143*, 195–200.
- Mithieux, G., Andreelli, F., et Magnan, C. (2009). Intestinal gluconeogenesis: key signal of central control of energy and glucose homeostasis. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* *12*, 419–423.
- Miyawaki, K., Yamada, Y., Ban, N., Ihara, Y., Tsukiyama, K., Zhou, H., Fujimoto, S., Oku, A., Tsuda, K., Toyokuni, S., et al. (2002). Inhibition of gastric inhibitory polypeptide signaling prevents obesity. *Nat. Med.* *8*, 738–742.
- Moran, T.H. (2000). Cholecystokinin and satiety: current perspectives. *Nutrition* *16*, 858–865.





- Moriarty, P., Dimaline, R., Thompson, D.G., et Dockray, G.J. (1997). Characterization of cholecystokininA and cholecystokininB receptors expressed by vagal afferent neurons. *Neuroscience* 79, 905–913.
- Moritoki, H., Takei, M., Kotani, M., Kiso, Y., Ishida, Y., et Endoh, K. (1984). Tripeptides acting on opioid receptors in rat colon. *Eur. J. Pharmacol.* 100, 29–39.
- Morrison, C.D., Xi, X., White, C.L., Ye, J., et Martin, R.J. (2007). Amino acids inhibit *Agrp* gene expression via an mTOR-dependent mechanism. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 293, E165–171.
- Mountjoy, K.G., Mortrud, M.T., Low, M.J., Simerly, R.B., et Cone, R.D. (1994). Localization of the melanocortin-4 receptor (MC4-R) in neuroendocrine and autonomic control circuits in the brain. *Mol. Endocrinol.* 8, 1298–1308.
- Muroya, S., Yada, T., Shioda, S., et Takigawa, M. (1999). Glucose-sensitive neurons in the rat arcuate nucleus contain neuropeptide Y. *Neurosci. Lett.* 264, 113–116.
- Murphy, K.G., et Bloom, S.R. (2006). Gut hormones and the regulation of energy homeostasis. *Nature* 444, 854–859.
- Nakagawa, A., Satake, H., Nakabayashi, H., Nishizawa, M., Furuya, K., Nakano, S., Kigoshi, T., Nakayama, K., et Uchida, K. (2004). Receptor gene expression of glucagon-like peptide-1, but not glucose-dependent insulinotropic polypeptide, in rat nodose ganglion cells. *Auton. Neurosci.* 110, 36–43.
- Neyrinck, A.M., Possemiers, S., Verstraete, W., De Backer, F., Cani, P.D., et Delzenne, N.M. (2012). Dietary modulation of clostridial cluster XIVa gut bacteria (*Roseburia* spp.) by chitin-glucan fiber improves host metabolic alterations induced by high-fat diet in mice. *J. Nutr. Biochem.* 23, 51–59.
- Nilsson, L.H. (1973). Liver glycogen content in man in the postabsorptive state. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 32, 317–323.
- Nogueiras, R., Pfluger, P., Tovar, S., Arnold, M., Mitchell, S., Morris, A., Perez-Tilve, D., Vázquez, M.J., Wiedmer, P., Castañeda, T.R., et al. (2007). Effects of obestatin on energy balance and growth hormone secretion in rodents. *Endocrinology* 148, 21–26.
- Nordlie, R.C., Foster, J.D., et Lange, A.J. (1999). Regulation of glucose production by the liver. *Annu. Rev. Nutr.* 19, 379–406.
- Nuttall, F.Q., Mooradian, A.D., Gannon, M.C., Billington, C., et Krezowski, P. (1984). Effect of protein ingestion on the glucose and insulin response to a standardized oral glucose load. *Diabetes Care* 7, 465–470.
- Nuttall, F.Q., Gannon, M.C., Wald, J.L., et Ahmed, M. (1985). Plasma glucose and insulin profiles in normal subjects ingesting diets of varying carbohydrate, fat, and protein content. *J. Am. Coll. Nutr.* 4, 437–450.
- Ollmann, M.M., Wilson, B.D., Yang, Y.K., Kerns, J.A., Chen, Y., Gantz, I., et Barsh, G.S. (1997). Antagonism of central melanocortin receptors in vitro and in vivo by agouti-related protein. *Science* 278, 135–138.
- Paintal, A.S. (1954). A study of gastric stretch receptors; their role in the peripheral mechanism of satiation of hunger and thirst. *J. Physiol.* 126, 255–270.
- Pallotta, J.A., et Kennedy, P.J. (1968). Response of plasma insulin and growth hormone to carbohydrate and protein feeding. *Metabolism.* 17, 901–908.
- Palmer, C., Bik, E.M., DiGiulio, D.B., Relman, D.A., et Brown, P.O. (2007). Development of the human infant intestinal microbiota. *PLoS Biol.* 5, e177.
- Parks, B.W., Nam, E., Org, E., Kostem, E., Norheim, F., Hui, S.T., Pan, C., Civelek, M., Rau, C.D., Bennett, B.J., et al. (2013). Genetic control of obesity and gut microbiota composition in response to high-fat, high-sucrose diet in mice. *Cell Metab.* 17, 141–152.



- Van Passel, M.W.J., Kant, R., Zoetendal, E.G., Plugge, C.M., Derrien, M., Malfatti, S.A., Chain, P.S.G., Woyke, T., Palva, A., de Vos, W.M., et al. (2011). The genome of *Akkermansia muciniphila*, a dedicated intestinal mucin degrader, and its use in exploring intestinal metagenomes. *PLoS One* 6, e16876.
- Paynter, M.J., et Elsdén, S.R. (1970). Mechanism of propionate formation by *Selenomonas ruminantium*, a rumen micro-organism. *J. Gen. Microbiol.* 61, 1–7.
- Peciña, S., et Berridge, K.C. (2005). Hedonic hot spot in nucleus accumbens shell: where do mu-opioids cause increased hedonic impact of sweetness? *J. Neurosci.* 25, 11777–11786.
- Penhoat, A., Mutel, E., Amigo-Correig, M., Pillot, B., Stefanutti, A., Rajas, F., et Mithieux, G. (2011). Protein-induced satiety is abolished in the absence of intestinal gluconeogenesis. *Physiol. Behav.* 105, 89–93.
- Pillot, B., Soty, M., Gautier-Stein, A., Zitoun, C., et Mithieux, G. (2009). Protein feeding promotes redistribution of endogenous glucose production to the kidney and potentiates its suppression by insulin. *Endocrinology* 150, 616–624.
- Pillot, B., Duraffourd, C., Bégeot, M., Joly, A., Luquet, S., Houberton, I., Naville, D., Vigier, M., Gautier-Stein, A., Magnan, C., et al. (2011). Role of hypothalamic melanocortin system in adaptation of food intake to food protein increase in mice. *PLoS One* 6, e19107.
- Pomare, E.W., Branch, W.J., et Cummings, J.H. (1985). Carbohydrate fermentation in the human colon and its relation to acetate concentrations in venous blood. *J. Clin. Invest.* 75, 1448–1454.
- Prentiss, P.G., Rosen, H., Brown, N., Horowitz, R.E., Malmud, O.J., et Levenson, S.M. (1961). The metabolism of choline by the germfree rat. *Arch. Biochem. Biophys.* 94, 424–429.
- Prieto, J.C., Laburthe, M., et Rosselin, G. (1979). Interaction of vasoactive intestinal peptide with isolated intestinal epithelial cells from rat. I. Characterization, quantitative aspects and structural requirements of binding sites. *Eur. J. Biochem.* 96, 229–237.
- Pullar, J.D., et Webster, A.J. (1977). The energy cost of fat and protein deposition in the rat. *Br. J. Nutr.* 37, 355–363.
- Raben, A., Agerholm-Larsen, L., Flint, A., Holst, J.J., et Astrup, A. (2003). Meals with similar energy densities but rich in protein, fat, carbohydrate, or alcohol have different effects on energy expenditure and substrate metabolism but not on appetite and energy intake. *Am. J. Clin. Nutr.* 77, 91–100.
- Rajas, F., Bruni, N., Montano, S., Zitoun, C., et Mithieux, G. (1999). The glucose-6 phosphatase gene is expressed in human and rat small intestine: regulation of expression in fasted and diabetic rats. *Gastroenterology* 117, 132–139.
- Rajas, F., Croset, M., Zitoun, C., Montano, S., et Mithieux, G. (2000). Induction of PEPCK gene expression in insulinopenia in rat small intestine. *Diabetes* 49, 1165–1168.
- Rajas, F., Jourdan-Pineau, H., Stefanutti, A., Mrad, E.A., Iynedjian, P.B., et Mithieux, G. (2007). Immunocytochemical localization of glucose 6-phosphatase and cytosolic phosphoenolpyruvate carboxykinase in gluconeogenic tissues reveals unsuspected metabolic zonation. *Histochem. Cell Biol.* 127, 555–565.
- Ramírez-Farías, C., Slezak, K., Fuller, Z., Duncan, A., Holtrop, G., et Louis, P. (2009). Effect of inulin on the human gut microbiota: stimulation of *Bifidobacterium adolescentis* and *Faecalibacterium prausnitzii*. *Br. J. Nutr.* 101, 541–550.
- Ramsay, A.G., Scott, K.P., Martin, J.C., Rincon, M.T., and Flint, H.J. (2006). Cell-associated alpha-amylases of butyrate-producing Firmicute bacteria from the human colon. *Microbiology* 152, 3281–3290.
- Rasmussen, B.A., Breen, D.M., et Lam, T.K.T. (2012). Lipid sensing in the gut, brain and liver. *Trends Endocrinol. Metab.* 23, 49–55.
- Ray, T.K., Mansell, K.M., Knight, L.C., Malmud, L.S., Owen, O.E., et Boden, G. (1983). Long-term effects of



- dietary fiber on glucose tolerance and gastric emptying in noninsulin-dependent diabetic patients. *Am. J. Clin. Nutr.* *37*, 376–381.
- Raybould, H.E., Glatzle, J., Robin, C., Meyer, J.H., Phan, T., Wong, H., et Sternini, C. (2003). Expression of 5-HT<sub>3</sub> receptors by extrinsic duodenal afferents contribute to intestinal inhibition of gastric emptying. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* *284*, G367–372.
- Reimer, K., Hopp, M., Zenz, M., Maier, C., Holzer, P., Mikus, G., Bosse, B., Smith, K., Buschmann-Kramm, C., et Leyendecker, P. (2009). Meeting the challenges of opioid-induced constipation in chronic pain management - a novel approach. *Pharmacology* *83*, 10–17.
- Rinaman, L. (2003). Hindbrain noradrenergic lesions attenuate anorexia and alter central cFos expression in rats after gastric viscerosensory stimulation. *J. Neurosci.* *23*, 10084–10092.
- Ritter, S., Dinh, T.T., et Zhang, Y. (2000). Localization of hindbrain glucoreceptive sites controlling food intake and blood glucose. *Brain Res.* *856*, 37–47.
- Roberfroid, M., Gibson, G.R., Hoyles, L., McCartney, A.L., Rastall, R., Rowland, I., Wolvers, D., Watzl, B., Szajewska, H., Stahl, B., et al. (2010). Prebiotic effects: metabolic and health benefits. *Br. J. Nutr.* *104 Suppl 2*, S1–63.
- Robertson, M.D., Currie, J.M., Morgan, L.M., Jewell, D.P., et Frayn, K.N. (2003). Prior short-term consumption of resistant starch enhances postprandial insulin sensitivity in healthy subjects. *Diabetologia* *46*, 659–665.
- Robertson, M.D., Bickerton, A.S., Dennis, A.L., Vidal, H., et Frayn, K.N. (2005). Insulin-sensitizing effects of dietary resistant starch and effects on skeletal muscle and adipose tissue metabolism. *Am. J. Clin. Nutr.* *82*, 559–567.
- Rolls, B.J., Hetherington, M., et Burley, V.J. (1988). The specificity of satiety: the influence of foods of different macronutrient content on the development of satiety. *Physiol. Behav.* *43*, 145–153.
- Romero-Picó, A., Vázquez, M.J., González-Touceda, D., Folgueira, C., Skibicka, K.P., Alvarez-Crespo, M., Van Gestel, M.A., Velásquez, D.A., Schwarzer, C., Herzog, H., et al. (2013). Hypothalamic  $\kappa$ -opioid receptor modulates the orexigenic effect of ghrelin. *Neuropsychopharmacology* *38*, 1296–1307.
- Ropelle, E.R., Pauli, J.R., Fernandes, M.F.A., Rocco, S.A., Marin, R.M., Morari, J., Souza, K.K., Dias, M.M., Gomes-Marcondes, M.C., Gontijo, J.A.R., et al. (2008). A central role for neuronal AMP-activated protein kinase (AMPK) and mammalian target of rapamycin (mTOR) in high-protein diet-induced weight loss. *Diabetes* *57*, 594–605.
- Russell, W.R., Gratz, S.W., Duncan, S.H., Holtrop, G., Ince, J., Scobbie, L., Duncan, G., Johnstone, A.M., Lobley, G.E., Wallace, R.J., et al. (2011). High-protein, reduced-carbohydrate weight-loss diets promote metabolite profiles likely to be detrimental to colonic health. *Am. J. Clin. Nutr.* *93*, 1062–1072.
- Saberi, M., Bohland, M., et Donovan, C.M. (2008). The locus for hypoglycemic detection shifts with the rate of fall in glycemia: the role of portal-superior mesenteric vein glucose sensing. *Diabetes* *57*, 1380–1386.
- Samuel, B.S., et Gordon, J.I. (2006). A humanized gnotobiotic mouse model of host-archaeal-bacterial mutualism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *103*, 10011–10016.
- Samuel, B.S., Shaito, A., Motoike, T., Rey, F.E., Bäckhed, F., Manchester, J.K., Hammer, R.E., Williams, S.C., Crowley, J., Yanagisawa, M., et al. (2008). Effects of the gut microbiota on host adiposity are modulated by the short-chain fatty-acid binding G protein-coupled receptor, Gpr41. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *105*, 16767–16772.
- Savastano, D.M., et Covasa, M. (2007). Intestinal nutrients elicit satiation through concomitant activation of CCK(1) and 5-HT(3) receptors. *Physiol. Behav.* *92*, 434–442.
- Sayin, S.I., Wahlström, A., Felin, J., Jäntti, S., Marschall, H.-U., Bamberg, K., Angelin, B., Hyötyläinen, T., Orešič, M., et Bäckhed, F. (2013). Gut Microbiota Regulates Bile Acid Metabolism by Reducing the Levels of



- Tauro-beta-muricholic Acid, a Naturally Occurring FXR Antagonist. *Cell Metab.* *17*, 225–235.
- Scheppach, W., Wiggins, H.S., Halliday, D., Self, R., Howard, J., Branch, W.J., Schrezenmeir, J., et Cummings, J.H. (1988). Effect of gut-derived acetate on glucose turnover in man. *Clin. Sci. (Lond.)* *75*, 363–370.
- Schwartz, A., Taras, D., Schäfer, K., Beijer, S., Bos, N.A., Donus, C., and Hardt, P.D. (2010). Microbiota and SCFA in lean and overweight healthy subjects. *Obesity (Silver Spring)* *18*, 190–195.
- Scott, K.P., Martin, J.C., Campbell, G., Mayer, C.-D., et Flint, H.J. (2006). Whole-genome transcription profiling reveals genes up-regulated by growth on fucose in the human gut bacterium “*Roseburia inulinivorans*.” *J. Bacteriol.* *188*, 4340–4349.
- Scott, K.P., Martin, J.C., Chassard, C., Clerget, M., Potrykus, J., Campbell, G., Mayer, C.-D., Young, P., Rucklidge, G., Ramsay, A.G., et al. (2011). Substrate-driven gene expression in *Roseburia inulinivorans*: importance of inducible enzymes in the utilization of inulin and starch. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *108 Suppl 1*, 4672–4679.
- Sekirov, I., Russell, S.L., Antunes, L.C.M., et Finlay, B.B. (2010). Gut microbiota in health and disease. *Physiol. Rev.* *90*, 859–904.
- Shah, M., Law, J.H., Micheletto, F., Sathananthan, M., Dalla Man, C., Cobelli, C., Rizza, R.A., Camilleri, M., Zinsmeister, A.R., et Vella, A. (2014). Contribution of Endogenous Glucagon-Like Peptide 1 to Glucose Metabolism After Roux-en-Y Gastric Bypass. *Diabetes* *63*, 483–493.
- Shin, A.C., Pistell, P.J., Phifer, C.B., et Berthoud, H.R. (2010). Reversible suppression of food reward behavior by chronic mu-opioid receptor antagonism in the nucleus accumbens. *Neuroscience* *170*, 580–588.
- Shiomi, H., Ueda, H., et Takagi, H. (1981). Isolation and identification of an analgesic opioid dipeptide kyotorphin (Tyr-Arg) from bovine brain. *Neuropharmacology* *20*, 633–638.
- Sinal, C.J., Tohkin, M., Miyata, M., Ward, J.M., Lambert, G., et González, F.J. (2000). Targeted disruption of the nuclear receptor FXR/BAR impairs bile acid and lipid homeostasis. *Cell* *102*, 731–744.
- Smith, E.A., et Macfarlane, G.T. (1997). Dissimilatory amino Acid metabolism in human colonic bacteria. *Anaerobe* *3*, 327–337.
- Smith, K.S., et Berridge, K.C. (2007). Opioid limbic circuit for reward: interaction between hedonic hotspots of nucleus accumbens and ventral pallidum. *J. Neurosci.* *27*, 1594–1605.
- Smith, G.P., Jerome, C., et Norgren, R. (1985). Afferent axons in abdominal vagus mediate satiety effect of cholecystokinin in rats. *Am. J. Physiol.* *249*, R638–641.
- Sonnenburg, J.L., Xu, J., Leip, D.D., Chen, C.-H., Westover, B.P., Weatherford, J., Buhler, J.D., et Gordon, J.I. (2005). Glycan foraging in vivo by an intestine-adapted bacterial symbiont. *Science* *307*, 1955–1959.
- Spector, A.C. (1995). Gustatory function in the parabrachial nuclei: implications from lesion studies in rats. *Rev. Neurosci.* *6*, 143–175.
- Spencer, M.D., Hamp, T.J., Reid, R.W., Fischer, L.M., Zeisel, S.H., et Fodor, A.A. (2011). Association between composition of the human gastrointestinal microbiome and development of fatty liver with choline deficiency. *Gastroenterology* *140*, 976–986.
- Sternini, C. (2001). Receptors and transmission in the brain-gut axis: potential for novel therapies. III. Mu-opioid receptors in the enteric nervous system. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* *281*, G8–15.
- Sternini, C., Patierno, S., Selmer, I.-S., et Kirchgessner, A. (2004). The opioid system in the gastrointestinal tract. *Neurogastroenterol. Motil.* *16 Suppl 2*, 3–16.
- Stoddart, L.A., Smith, N.J., et Milligan, G. (2008). International Union of Pharmacology. LXXI. Free fatty acid receptors FFA1, -2, and -3: pharmacology and pathophysiological functions. *Pharmacol. Rev.* *60*, 405–417.





- Stumvoll, M., Meyer, C., Perriello, G., Kreider, M., Welle, S., et Gerich, J. (1998). Human kidney and liver gluconeogenesis: evidence for organ substrate selectivity. *Am. J. Physiol.* *274*, E817–826.
- Stumvoll, M., Perriello, G., Meyer, C., et Gerich, J. (1999). Role of glutamine in human carbohydrate metabolism in kidney and other tissues. *Kidney Int.* *55*, 778–792.
- Sun, Y., Asnicar, M., Saha, P.K., Chan, L., et Smith, R.G. (2006). Ablation of ghrelin improves the diabetic but not obese phenotype of ob/ob mice. *Cell Metab.* *3*, 379–386.
- Swann, J.R., Want, E.J., Geier, F.M., Spagou, K., Wilson, I.D., Sidaway, J.E., Nicholson, J.K., et Holmes, E. (2011). Systemic gut microbial modulation of bile acid metabolism in host tissue compartments. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *108 Suppl 1*, 4523–4530.
- Sykes, N.P. (1996). An investigation of the ability of oral naloxone to correct opioid-related constipation in patients with advanced cancer. *Palliat. Med.* *10*, 135–144.
- Tazoe, H., Otomo, Y., Karaki, S.-I., Kato, I., Fukami, Y., Terasaki, M., et Kuwahara, A. (2009). Expression of short-chain fatty acid receptor GPR41 in the human colon. *Biomed. Res.* *30*, 149–156.
- Terskiy, A., Wannemacher, K.M., Yadav, P.N., Tsai, M., Tian, B., et Howells, R.D. (2007). Search of the human proteome for endomorphin-1 and endomorphin-2 precursor proteins. *Life Sci.* *81*, 1593–1601.
- Teschemacher, H., Umbach, M., Hamel, U., Praetorius, K., Ahnert-Hilger, G., Brantl, V., Lottspeich, F., et Henschen, A. (1986). No evidence for the presence of beta-casomorphins in human plasma after ingestion of cows' milk or milk products. *J. Dairy Res.* *53*, 135–138.
- Thomas, C., Gioiello, A., Noriega, L., Strehle, A., Oury, J., Rizzo, G., Macchiarulo, A., Yamamoto, H., Matak, C., Pruzanski, M., et al. (2009). TGR5-mediated bile acid sensing controls glucose homeostasis. *Cell Metab.* *10*, 167–177.
- Thorens, B., et Larsen, P.J. (2004). Gut-derived signaling molecules and vagal afferents in the control of glucose and energy homeostasis. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* *7*, 471–478.
- Timper, K., Grisouard, J., Sauter, N.S., Herzog-Radimerski, T., Dembinski, K., Peterli, R., Frey, D.M., Zulewski, H., Keller, U., Müller, B., et al. (2013). Glucose-dependent insulinotropic polypeptide induces cytokine expression, lipolysis, and insulin resistance in human adipocytes. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* *304*, E1–13.
- Tolhurst, G., Heffron, H., Lam, Y.S., Parker, H.E., Habib, A.M., Diakogiannaki, E., Cameron, J., Grosse, J., Reimann, F., et Gribble, F.M. (2012). Short-chain fatty acids stimulate glucagon-like peptide-1 secretion via the G-protein-coupled receptor FFAR2. *Diabetes* *61*, 364–371.
- Tordoff, M.G., Tluczek, J.P., et Friedman, M.I. (1989). Effect of hepatic portal glucose concentration on food intake and metabolism. *Am. J. Physiol.* *257*, R1474–1480.
- Trayhurn, P., et Wood, I.S. (2005). Signalling role of adipose tissue: adipokines and inflammation in obesity. *Biochem. Soc. Trans.* *33*, 1078–1081.
- Trinh, K.Y., O'Doherty, R.M., Anderson, P., Lange, A.J., et Newgard, C.B. (1998). Perturbation of fuel homeostasis caused by overexpression of the glucose-6-phosphatase catalytic subunit in liver of normal rats. *J. Biol. Chem.* *273*, 31615–31620.
- Troy, S., Soty, M., Ribeiro, L., Laval, L., Migrenne, S., Fioramonti, X., Pillot, B., Fauveau, V., Aubert, R., Viollet, B., et al. (2008). Intestinal gluconeogenesis is a key factor for early metabolic changes after gastric bypass but not after gastric lap-band in mice. *Cell Metab.* *8*, 201–211.
- Turnbaugh, P.J., Ley, R.E., Mahowald, M.A., Magrini, V., Mardis, E.R., et Gordon, J.I. (2006). An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature* *444*, 1027–1031.



- Turnbaugh, P.J., Bäckhed, F., Fulton, L., et Gordon, J.I. (2008). Diet-induced obesity is linked to marked but reversible alterations in the mouse distal gut microbiome. *Cell Host Microbe* 3, 213–223.
- Turnbaugh, P.J., Hamady, M., Yatsunenko, T., Cantarel, B.L., Duncan, A., Ley, R.E., Sogin, M.L., Jones, W.J., Roe, B.A., Affourtit, J.P., et al. (2009a). A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature* 457, 480–484.
- Turnbaugh, P.J., Ridaura, V.K., Faith, J.J., Rey, F.E., Knight, R., et Gordon, J.I. (2009b). The effect of diet on the human gut microbiome: a metagenomic analysis in humanized gnotobiotic mice. *Sci. Transl. Med.* 1, 6ra14.
- De Vadder, F., Kovatcheva-Datchary, P., Goncalves, D., Vinera, J., Zitoun, C., Duchamp, A., Bäckhed, F., et Mithieux, G. (2014). Microbiota-Generated Metabolites Promote Metabolic Benefits via Gut-Brain Neural Circuits. *Cell* 156, 84–96.
- Vahl, T.P., Tauchi, M., Durler, T.S., Elfers, E.E., Fernandes, T.M., Bitner, R.D., Ellis, K.S., Woods, S.C., Seeley, R.J., Herman, J.P., et al. (2007). Glucagon-like peptide-1 (GLP-1) receptors expressed on nerve terminals in the portal vein mediate the effects of endogenous GLP-1 on glucose tolerance in rats. *Endocrinology* 148, 4965–4973.
- Vance, D.E. (2008). Role of phosphatidylcholine biosynthesis in the regulation of lipoprotein homeostasis. *Curr. Opin. Lipidol.* 19, 229–234.
- Velagapudi, V.R., Hezaveh, R., Reigstad, C.S., Gopalacharyulu, P., Yetukuri, L., Islam, S., Felin, J., Perkins, R., Borén, J., Oresic, M., et al. (2010). The gut microbiota modulates host energy and lipid metabolism in mice. *J. Lipid Res.* 51, 1101–1112.
- Vernia, P., Caprilli, R., Latella, G., Barbetti, F., Magliocca, F.M., et Cittadini, M. (1988). Fecal lactate and ulcerative colitis. *Gastroenterology* 95, 1564–1568.
- Walker, A.W., Duncan, S.H., McWilliam Leitch, E.C., Child, M.W., et Flint, H.J. (2005). pH and peptide supply can radically alter bacterial populations and short-chain fatty acid ratios within microbial communities from the human colon. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 3692–3700.
- Walker, A.W., Duncan, S.H., Harmsen, H.J.M., Holtrop, G., Welling, G.W., et Flint, H.J. (2008). The species composition of the human intestinal microbiota differs between particle-associated and liquid phase communities. *Environ. Microbiol.* 10, 3275–3283.
- Walker, A.W., Ince, J., Duncan, S.H., Webster, L.M., Holtrop, G., Ze, X., Brown, D., Stares, M.D., Scott, P., Bergerat, A., et al. (2011). Dominant and diet-responsive groups of bacteria within the human colonic microbiota. *ISME J.* 5, 220–230.
- Wang, A., Si, H., Liu, D., et Jiang, H. (2012). Butyrate Activates the cAMP-Protein Kinase A-cAMP Response Element-Binding Protein Signaling Pathway in Caco-2 Cells. *J. Nutr.* 142, 1–6.
- Wang, Z., Klipfell, E., Bennett, B.J., Koeth, R., Levison, B.S., Dugar, B., Feldstein, A.E., Britt, E.B., Fu, X., Chung, Y.-M., et al. (2011). Gut flora metabolism of phosphatidylcholine promotes cardiovascular disease. *Nature* 472, 57–63.
- Warram, J.H., Martin, B.C., Krolewski, A.S., Soeldner, J.S., et Kahn, C.R. (1990). Slow glucose removal rate and hyperinsulinemia precede the development of type II diabetes in the offspring of diabetic parents. *Ann. Intern. Med.* 113, 909–915.
- West, D.B., Fey, D., et Woods, S.C. (1984). Cholecystokinin persistently suppresses meal size but not food intake in free-feeding rats. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 246, R776–R787.
- West, D.B., Greenwood, M.R., Sullivan, A.C., Prescod, L., Marzullo, L.R., et Triscari, J. (1987). Infusion of cholecystokinin between meals into free-feeding rats fails to prolong the intermeal interval. *Physiol. Behav.* 39, 111–115.
- Westerterp-Plantenga, M.S., Rolland, V., Wilson, S.A., et Westerterp, K.R. (1999). Satiety related to 24 h diet-induced thermogenesis during high protein/carbohydrate vs high fat diets measured in a respiration chamber.



Eur. J. Clin. Nutr. 53, 495–502.

Van Wey, A.S., Cookson, A.L., Roy, N.C., McNabb, W.C., Soboleva, T.K., et Shorten, P.R. (2011). Bacterial biofilms associated with food particles in the human large bowel. *Mol. Nutr. Food Res.* 55, 969–978.

Will, M.J., Franzblau, E.B., et Kelley, A.E. (2003). Nucleus accumbens mu-opioids regulate intake of a high-fat diet via activation of a distributed brain network. *J. Neurosci.* 23, 2882–2888.

Williams, D.L., Kaplan, J.M., et Grill, H.J. (2000). The role of the dorsal vagal complex and the vagus nerve in feeding effects of melanocortin-3/4 receptor stimulation. *Endocrinology* 141, 1332–1337.

Wolever, T.M., Spadafora, P., et Eshuis, H. (1991). Interaction between colonic acetate and propionate in humans. *Am. J. Clin. Nutr.* 53, 681–687.

Wostmann, B.S. (1973). Intestinal bile acids and cholesterol absorption in the germfree rat. *J. Nutr.* 103, 982–990.

Wostmann, B.S., Larkin, C., Moriarty, A., et Bruckner-Kardoss, E. (1983). Dietary intake, energy metabolism, and excretory losses of adult male germfree Wistar rats. *Lab. Anim. Sci.* 33, 46–50.

Wright, R.S., Anderson, J.W., et Bridges, S.R. (1990). Propionate inhibits hepatocyte lipid synthesis. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 195, 26–29.

Wu, X., Ma, C., Han, L., Nawaz, M., Gao, F., Zhang, X., Yu, P., Zhao, C., Li, L., Zhou, A., et al. (2010). Molecular characterisation of the faecal microbiota in patients with type II diabetes. *Curr. Microbiol.* 61, 69–78.

Wyvell, C.L., et Berridge, K.C. (2000). Intra-accumbens amphetamine increases the conditioned incentive salience of sucrose reward: enhancement of reward “wanting” without enhanced “liking” or response reinforcement. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 20, 8122–8130.

Ximenes, H.M.A., Hirata, A.E., Rocha, M.S., Curi, R., et Carpinelli, A.R. (2007). Propionate inhibits glucose-induced insulin secretion in isolated rat pancreatic islets. *Cell Biochem. Funct.* 25, 173–178.

Yamashita, H., Fujisawa, K., Ito, E., Idei, S., Kawaguchi, N., Kimoto, M., Hiemori, M., et Tsuji, H. (2007). Improvement of obesity and glucose tolerance by acetate in Type 2 diabetic Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) rats. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 71, 1236–1243.

Yeomans, M.R., et Gray, R.W. (2002). Opioid peptides and the control of human ingestive behaviour. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 26, 713–728.

Zadina, J.E., Hackler, L., Ge, L.J., et Kastin, A.J. (1997). A potent and selective endogenous agonist for the mu-opiate receptor. *Nature* 386, 499–502.

Zhang, H., DiBaise, J.K., Zuccolo, A., Kudrna, D., Braidotti, M., Yu, Y., Parameswaran, P., Crowell, M.D., Wing, R., Rittmann, B.E., et al. (2009). Human gut microbiota in obesity and after gastric bypass. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 2365–2370.

Zhang, J.V., Ren, P.-G., Avsian-Kretchmer, O., Luo, C.-W., Rauch, R., Klein, C., et Hsueh, A.J.W. (2005). Obestatin, a peptide encoded by the ghrelin gene, opposes ghrelin’s effects on food intake. *Science* 310, 996–999.

Zhu, J.X., Zhu, X.Y., Owyang, C., et Li, Y. (2001). Intestinal serotonin acts as a paracrine substance to mediate vagal signal transmission evoked by luminal factors in the rat. *J. Physiol.* 530, 431–442.

Zimmerman, R.P., Gates, T.S., Mantyh, C.R., Vigna, S.R., Welton, M.L., Passaro, E.P., Jr, et Mantyh, P.W. (1989). Vasoactive intestinal polypeptide receptor binding sites in the human gastrointestinal tract: localization by autoradiography. *Neuroscience* 31, 771–783.

Zioudrou, C., Streaty, R.A., et Klee, W.A. (1979). Opioid peptides derived from food proteins. The exorphins. *J. Biol. Chem.* 254, 2446–2449.







## RÉSUMÉ en français

La production endogène de glucose est une fonction cruciale de l'organisme, permettant de maintenir l'homéostasie glycémique. Alors que la production accrue de glucose par le foie a des effets délétères, la néoglucogenèse intestinale (NGI) exerce des effets bénéfiques sur l'équilibre métabolique de l'organisme.

Les régimes hyperprotéiques sont connus pour leurs effets de satiété. Grâce à des travaux physiologiques et moléculaires chez le rat et la souris, nous montrons dans une première partie que l'effet bénéfique des régimes hyperprotéiques passe par une induction de la NGI. Lors de la digestion des protéines alimentaires, des di- et tri-peptides sont libérés dans la veine porte. Ces molécules agissent comme des antagonistes des récepteurs  $\mu$ -opioïdes de la veine porte, initiant un arc réflexe intestin-cerveau induisant la NGI et la satiété.

Dans un deuxième temps, nous proposons un modèle rendant compte des effets bénéfiques des régimes riches en fibres, tels que l'amélioration de la sensibilité à l'insuline et l'induction de la dépense énergétique. Les fibres solubles sont fermentées par le microbiote intestinal, produisant des acides gras à chaîne courte (AGCC), acétate, propionate et butyrate, à l'origine des effets métaboliques observés. Nous montrons que le butyrate active directement les gènes de la NGI dans les entérocytes, et que le propionate se lie aux récepteurs FFAR3 dans le système nerveux périportal, initiant un mécanisme de communication entre l'intestin et le cerveau induisant la NGI. De plus, nous montrons que la modification de la composition du microbiote par les fibres alimentaires n'est pas suffisante en soi pour induire les effets bénéfiques en absence de NGI.

---

## TITRE en anglais

**Portal detection of nutrients and control of energy homeostasis by the gut-brain neural axis**

---

## RÉSUMÉ en anglais

Endogenous glucose production is a crucial function for the organism, accounting for the maintenance of glucose homeostasis. While an increase in hepatic glucose production has deleterious effects, intestinal gluconeogenesis (IGN) has beneficial effects on the metabolic balance of the organism.

Protein-rich diets are known for their satiety effects. Thanks to physiological and molecular studies on rats and mice, we first show that the beneficial effects of protein-rich diets are dependent on activation of IGN. When dietary protein is digested, di- and tri-peptides are released into the portal vein. These molecules act as  $\mu$ -opioid receptor antagonists in the portal vein, initiating a gut-brain neural reflex arc inducing IGN and satiety.

In a second study, we propose a model accounting for the beneficial effects of fiber-enriched diets, such as increased insulin sensitivity and induction of energy expenditure. Soluble dietary fiber is fermented by the gut microbiota, producing short-chain fatty acids (SCFAs), acetate, propionate and butyrate, which are responsible for the observed metabolic effects. We show that butyrate directly activates IGN in the enterocytes, while propionate binds to FFAR3 receptors in the portal vein nervous system, initiating a gut-brain neural communication mechanism inducing IGN. Moreover, we show that modifications in the microbiota composition by dietary fiber are not sufficient to induce metabolic beneficial effects in the absence of IGN.

---

## DISCIPLINE

**Nutrition et neurosciences**

---

## MOTS-CLÉS

Détection des nutriments, axe intestin-cerveau, système nerveux périphérique, métabolisme énergétique, régimes hyperprotéiques, régimes riches en fibres, microbiote intestinal, néoglucogenèse intestinale

*Nutrient sensing, gut-brain axis, peripheral nervous system, energy metabolism, protein-rich diet, fiber-rich diet, gut microbiota, intestinal gluconeogenesis*

---

## INTITULÉ ET ADRESSE DU LABORATOIRE :

**INSERM U855 Nutrition et Cerveau**

**Faculté de médecine Laennec**

**7-11 rue Guillaume Paradin**

**69372 Lyon cedex 08**

---